



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EMERSON MICHELL DA SILVA SIQUEIRA

***Spondias tuberosa* Arr. (UMBU): ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

NATAL,
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EMERSON MICHELL DA SILVA SIQUEIRA

***Spondias tuberosa* Arr. (UMBU): ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª: Silvana Maria Zucolotto Langassner

CO-ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª: Raquel Brandt Giordani

NATAL,
2015

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Siqueira, Emerson Michell da Silva.

Spondias tuberosa Arr. umbu: estudo fitoquímico e avaliação do potencial anti-inflamatório / Emerson Michell da Silva Siqueira. - Natal, 2015.

101f: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana Maria Zucolotto Langassner.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Anacardiaceae - Dissertação. 2. Anti-inflamatório - Dissertação. 3. *Spondias tuberosa* - Dissertação. I. Langassner, Silvana Maria Zucolotto. II. Título.

RN/UF/BSA01

CDU 582.746.66

EMERSON MICHEL DA SILVA SIQUEIRA

***Spondias tuberosa* Arr. (UMBU): ESTUDO FITOQUÍMICO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

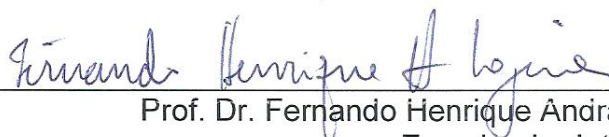
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner
Presidente – UFRN



Prof. Dra. Thais Guaratini
Examinador Externo – USP



Prof. Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira
Examinador Interno – UFRN

Natal, 26 de janeiro de 2015

NATAL / RN

2015

DEDICATÓRIA

A toda minha família, em especial minha filha Maysa e minha esposa Pâmela, por serem minha base e meu incentivo.

Aos meus pais, Irineu e Ioneide, minha avó, Ivaneide e minha irmã, Sara, pela torcida, incentivo e confiança.

As professoras Sílvana e Raquel pela dedicação, apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Silvana Zucolotto**, por ter me dado a oportunidade de iniciar na pesquisa, pelos ensinamentos, paciência e confiança que tem me dedicado.

À minha co-orientadora, **Prof. Raquel Giordani**, pela ajuda durante todo o mestrado, pela confiança no meu trabalho e pelos aprendizados de docência.

Ao **Prof. Matheus Pedrosa**, pela importante colaboração nos ensaios de atividade biológica.

Às Profas. **Maria das Graças Almeida, Ana Paula Gomes e Renata Mendonça** pelas importantes contribuições na banca do Exame de Qualificação de Mestrado.

Aos **professores da pós-graduação**, os quais contribuíram grandemente para minha formação e crescimento profissional.

Aos **alunos do Grupo PNBio** pelo bom convívio, pelo compartilhamento de conhecimento, experiência e ajuda, sou grato a todos. Em especial aos alunos que participaram diretamente da composição desse trabalho. Agradeço aos amigos **Themístocles Negreiros, Thaciane Soares e Júlia Moraes**, os quais estão comigo desde o início do PNBio, agradeço pela amizade e o companheirismo. Muito obrigado às alunas **Lorena Araújo e Bárbara Cabral**, pela amizade e suas contribuições nesse trabalho. Ao **Walteçá Silveira, Samara Alves, Gustavo Brandão, Fernanda Priscila e Gabrielle Pereira**, obrigado pela força, amizade, companhia e incentivo. Agradeço a todos os **outros amigos e colegas de trabalho**, os quais foram sempre boas companhias e tornaram menos difícil essa jornada.

Aos **alunos do TecBioFar**, em especial a **Juliana Félix**, pela grande ajuda na realização das atividades biológicas, pelo aprendizado e pela atenção. Agradeço também a **Jacyra Antunes** pela colaboração e pela dedicação do seu tempo para me ajudar.

Aos **alunos do LabMult**, especialmente **Leandro Vinícius** na sua ajuda e atenção, e a Profa. **Maria da Graças Almeida**, por ter abrido às portas do laboratório.

Agradeço ao **programa de pós-graduação** e a **CAPES** pela bolsa de estudos e pelos auxílios financeiros.

Agradeço aos **meus familiares**, minha esposa **Pâmela**, pela força, apoio, motivação e estar sempre presente nos momentos difíceis. À minha filha **Maysa**, que é minha inspiração e motivação para dar meu melhor todos os dias. À minha mãe **Ioneide**, que apesar da distância está sempre presente na minha vida com seus

conselhos, amor e atenção. A minha avó **Ivaneide**, minha segunda mãe, pelo apoio e confiança sempre. Ao meu pai **Irineu**, por ser meu espelho, por seus conselhos e por sempre estar presente apesar da distância. À minha irmã **Sara**, por sempre estar torcendo por mim e querendo o meu melhor. A **toda minha família e amigos** que são minha sustentação em todos os momentos.

Agradeço a todas outras pessoas que não foram citadas, que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

“SE NÃO PUDER VOAR, CORRA. SE NÃO
PUDER CORRER, ANDE. SE NÃO PUDER
ANDAR, RASTEJE, MAS CONTINUE EM
FRENTE DE QUALQUER JEITO”.

MARTIN LUTHER KING

RESUMO

Spondias tuberosa Arruda (Anacardiaceae) é uma árvore frutífera conhecida popularmente no Brasil como umbuzeiro, tapereba ou umbu. A planta é nativa e endêmica do Brasil, distribuída por todos estados do nordeste brasileiro. Essa espécie tem grande importância na medicina popular do semi-árido nordestino, onde é utilizada principalmente para tratar condições inflamatórias, problemas digestivos assim como infecções virais e bacterianas. No entanto, apesar da vasta utilização na medicina tradicional, existem poucos estudos farmacológicos e fitoquímicos que dêem embasamento científico a sua utilização popular. Diante disto, este trabalho buscou caracterizar os marcadores químicos e avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato das folhas de *Spondias tuberosa*. O extrato das folhas foi preparado por maceração em etanol:água (70:30, v/v). A avaliação do perfil fitoquímico do extrato foi realizada preliminarmente por Cromatografia em Camada Delgada e em seguida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Na análise por Cromatografia em Camada Delgada foi observada a presença dos flavonoides rutina e isoquercitrina, o que foi corroborado pela análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência que ainda indicou a presença dos ácidos fenólicos, ácido clorogênico e ácido caféico. Adicionalmente, foi desenvolvido e validado um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência segundo as normas da RDC 899/2003 da ANVISA e ICH Guidelines 2005, para avaliar o teor dos compostos identificados no extrato. Para avaliação do efeito anti-inflamatório foram utilizados os modelos de peritonite e de edema de pata induzidos por carragenina, administração via intraperitoneal, em camundongos. A avaliação do efeito anti-inflamatório *in vivo* demonstrou que o extrato das folhas, nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/kg, apresentou uma diminuição do influxo de leucócitos para o local da inflamação, do diâmetro do edema e do nível da enzima mieloperoxidase, quando comparado ao fármaco utilizado como controle dexametasona (2 mg/kg, via i.p.). Em suma, em nosso trabalho foi verificado que o extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias tuberosa* apresentou atividade anti-inflamatória importante nos dois modelos ensaiados, o que torna a planta uma potencial espécie para este uso, justificando o seu uso popular. No que se refere à caracterização de marcadores, os compostos fenólicos, ácido clorogênico, ácido caféico, rutina e isoquercitrina, identificados no extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias tuberosa* podem ser utilizados no controle de qualidade da matéria-prima e de extratos obtidos com a espécie.

Palavras chaves: Anacardiaceae, *Spondias tuberosa*, anti-inflamatório, fenólicos e marcadores.

ABSTRACT

Spondias tuberosa Arruda (Anacardiaceae) is a fruitful tree popularly known as umbuzeiro, tapereba or umbu. It is a native and endemic species from Brazil, widespread in Brazilian Northeast. The species is important in folk medicine of the semi-arid Northeast, where it is mainly used to treat various inflammatory conditions, digestive problems as well as viral and bacterial infections. However, despite the common use in folk medicine, there are scarce pharmacological and phytochemicals studies that afford scientific evidence to its popular use. Therefore, this study aimed to characterize the chemical markers in *S. tuberosa* leaves extract, obtained by maceration ethanol:water (70:30, [v/v]), and evaluate its anti-inflammatory potential *in vivo*. The phytochemical profile in TLC analysis suggested the occurrence of the flavonoids rutin and isoquercitrin. HPLC analysis enabled us to confirm the presence of flavonoids and also, were detected the phenolic acids, chlorogenic acid and caffeic acid. In addition was developed and validated a HPLC method to evaluate the content of the identified compounds in *S. tuberosa* leaves extract according to RDC 899/2003 of ANVISA and ICH Guidelines 2005. In order to evaluate the anti-inflammatory potential of *S. tuberosa* leaves extract, the peritonitis and paw edema models induced by carrageenan were used, administration i.p. in mice. The results highlighted the anti-inflammatory property *in vivo* at 125, 250 and 500 mg/kg since a decrease in leukocyte influx to the site of inflammation, diameter of the edema and the level of myeloperoxidase were observed when compared to the drug control dexamethasone (2 mg/kg, i.p. route). Taken together, the results pointed out *S. tuberosa* as a potential species for developing phytotherapeutic derivatives in according to its popular use. With regard to the characterization markers, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin and isoquercitrin were identified and quantified in *Spondias tuberosa* leaves extract so they could be used in quality control analyses of the raw material and extracts of this species.

Keywords: Anacardiaceae, *Spondias tuberosa*, anti-inflammatory, phenolics and markers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Árvore de <i>Spondias tuberosa</i>	23
Figura 2 Frutos e folhas de <i>Spondias tuberosa</i>	23
Figura 3 Estruturas químicas de quercetina, rutina e ácido elágico, identificados no extrato metanólico das folhas de <i>S. tuberosa</i>	25
Figura 4 Estrutura básica dos ácidos fenólicos: a) ácidos hidroxibenzóicos; b) ácidos hidroxicinâmicos	46
Figura 5 Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração	47
Figura 6 Esquema geral da biossíntese das principais classes de flavonoides	48
Figura 7 Principais classes de flavonoides	49
Figura 8 Esquema da estrutura química dos flavonoides e sua relação com o espectro de absorção na luz UV	51
Figura 9 Esquema do processo de purificação de A1 e C1	65
Figura 10 Cromatografia em Camada Delgada do extrato e frações de <i>S. tuberosa</i> . Extrato=Extrato hidroetanólico, Fração Éter de petróleo, CHCl ₃ =Fração clorofórmio, AcOEt=fração acetato de etila, BuOH=fração <i>n</i> -butanol e Residual=fração residual aquosa.	74
Figura 11 Cromatograma obtido por CLAE-DAD (a 340 nm) do extrato hidroetanólico das folhas de <i>S. tuberosa</i> : ácido clorogênico (1), ácido caféico (3), rutina (5) e isoquercitrina (6). Ver as condições cromatográficas no item 4.6.....	75
Figura 12 Efeito do extrato de <i>S. tuberosa</i> no edema da pata induzido por carragenina em camundongos. O edema foi determinado como a diferença entre os valores iniciais (basais, antes da injeção de carragenina) e a espessura final da pata traseira obtida após diferentes períodos de tempo (1, 2, 3 e 4 horas) após a administração de λ -carragenina (500 μ g / pata). * Valores expressos em média \pm SEM com n = 5. *** P <0,001 quando comparado ao grupo controle (tratado com veículo) por <i>two-way</i> ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. PBS= solução salina; Car=Carragenina 500 μ g/pata, via subplantar; Dexa=Dexametasona 2 mg/kg, via i.p.; Extrato= 125, 250 e 500 mg/kg, via i.p., do extrato hidroetanólico de <i>S. tuberosa</i>	81
Figura 13 Efeito do extrato de <i>S. tuberosa</i> sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO) no modelo de edema de pata induzido por carragenina nas patas traseiras dos camundongos. A atividade enzimática foi medida em amostras colhidas 4 h após a administração de carragenina. Uma unidade de atividade MPO (UMPO) foi definida como aquela que degrada um micromol de peróxido por minuto. LP: pata esquerda (controle de valores basais). * Os valores são expressos como média \pm SEM com n = 5. *** P <0,001 quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo) por <i>one-way</i> ANOVA seguida pelo teste de Tukey. PBS= solução salina; Car=Carragenina 500 μ g/pata, via subplantar; Dexa=Dexametasona 2 mg/kg, via i.p.; Extrato= 125, 250 e 500 mg/kg, via i.p., do extrato hidroetanólico de <i>S. tuberosa</i>	83
Figura 14 Efeito do extrato de <i>S. tuberosa</i> sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos. A contagem de	

células da lavagem peritoneal recolhida na quarta hora após a administração de carragenina (1000 μg / cavidade). * Os valores são expressos como média \pm SEM com n = 5. *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo) por *one-way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey. PBS= solução salina; Carrag=Carragenina 1000 μg /cavidade, via i.p.; Dexa=Dexametasona 2 mg/kg, via i.p.; Extrato= 125, 250 e 500 mg/kg, via i.p., do extrato hidroetanólico de *S. tuberosa*; PMN=leucócitos polimorfonucleares; MN=células monocucleares..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais compostos isolados de <i>Spondias mombin</i> descritos na literatura	28
Tabela 2 Estudos farmacológicos <i>in vitro</i> de <i>Spondias mombin</i> descritos na literatura.....	29
Tabela 3 Estudos farmacológicos <i>in vivo</i> de <i>Spondias mombin</i> descritos na literatura	31
Tabela 4 Estudos farmacológicos <i>in vitro</i> de <i>Spondias pinnata</i> descritos na literatura	36
Tabela 5 Estudos farmacológicos <i>in vivo</i> de <i>Spondias pinnata</i> descritos na literatura	39
Tabela 6 Espectro de UV e tempo de retenção dos compostos fenólicos no extrato de <i>S. tuberosa</i>	76
Tabela 10 Parâmetros de adequabilidade	76
Tabela 7 Conteúdo dos compostos fenólicos no extrato hidroetanólico de <i>S. tuberosa</i> ^a	77
Tabela 8 Dados da calibração, LOD e LOQ dos padrões de compostos fenólicos	78
Tabela 9 Dados de repetibilidade, precisão intermediária e exatidão dos padrões de compostos fenólicos	79
Tabela 11 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de <i>S. tuberosa</i> no edema de pata e de peritonite induzida por carragenina em camundongos	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AcForm	Ácido fórmico
AcOEt	Acetato de Etila
Anova	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BuOH	<i>n</i> -Butanol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatográfica clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CHCl ₃	Clorofórmio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia Líquida à vácuo
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DENV-2	Vírus da Dengue tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ED ₅₀	Dose Efetiva Abortiva de 50%
EH	Extrato hidroetanólico
H ₂ O	Água
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
i.p.	Intraperitoneal
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD ₅₀	Dose Letal de 50%
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MF	Medicamento fitoterápico
MN	Células nononucleares
MPO	Mieloperoxidase
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> (brometo de

	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão salina-fosfato)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PTF	Produto tradicional fitoterápico
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
<i>Rf</i>	<i>Retention factor</i> (fator de retenção)
R.S.D.	desvio padrão relativo
s.c.	subcutânea
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
s.pl.	subplantar
SUS	Sistema Único de Saúde
TEAC	Atividade antioxidante equivalente ao Trolox
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (fator de necrose tumoral α)
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 FAMÍLIA ANACARDIACEAE.....	22
2.2 ESPÉCIE <i>Spondias tuberosa</i>	22
2.2.1 Descrição botânica	23
2.2.2 Uso popular	24
2.2.3 Composição Química	24
2.2.4 Atividades biológicas	25
2.3 DEMAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Spondias</i>	26
2.3.1 <i>Spondias mombin</i>	26
2.3.1.1 Informação Botânica.....	26
2.3.1.2 Uso popular.....	26
2.3.1.3 Composição química	27
2.3.1.4 Atividades biológicas	27
2.3.2 <i>Spondias pinnata</i>	34
2.3.2.1 Informação Botânica.....	34
2.3.2.2 Uso popular.....	34
2.3.2.3 Composição química	34
2.3.2.4 Atividades biológicas	36
2.3.3 <i>Spondias purpurea</i>	41
2.3.4 <i>Spondias dulcis</i>	42
2.4 COMPARAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Spondias</i>	43
2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	44
2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS	46
2.6.1 Flavonoides	47
2.7 LEGISLAÇÃO SOBRE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	51
2.8 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO E ADEQUABILIDADE DO SISTEMA.....	54
2.8.1 Parâmetros de Validação.....	54
2.8.2 Parâmetros de Adequabilidade (<i>System Suitability</i>).....	57
2.9 PROCESSO INFLAMATÓRIO	57
2.9.1 Modelos de inflamação	59
2.9.1.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	59

2.9.1.2 Peritonite induzida por carragenina	60
3 OBJETIVOS	61
3.1 OBJETIVO GERAL	62
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4 METODOLOGIA	63
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	64
4.2 EXTRAÇÃO	64
4.3 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO	64
4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	66
4.6 ANÁLISE DO EXTRATO DE <i>S. tuberosa</i> POR CLAE.....	66
4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	67
4.8 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	69
4.8.1 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	69
4.8.1.1 Animais.....	69
4.8.1.2 Edema de pata induzido por carragenina.....	70
4.8.1.3 Determinação dos níveis enzimáticos de mieloperoxidase (MPO).....	70
4.8.1.4 Peritonite induzida por carragenina.....	71
4.8.1.5 Análise estatística.....	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 ANÁLISES FITOQUÍMICAS	74
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	79
6 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS	88
TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO. Erro! Indicador não definido.	
ANEXO A..... Erro! Indicador não definido.	

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A medicina popular à base de plantas tem tido importante papel nas diferentes civilizações ao longo da história. É provável que os seres humanos, assim que chegaram à fase de raciocínio, tenham descoberto, pelo processo de tentativa e erro, que as plantas tinham um valor medicinal. O tratamento de doenças com drogas vegetais foi o alicerce de todo tratamento médico, até meados do século XIX. Embora diversas civilizações antigas já utilizassem plantas medicinais para tratamento de doenças, a aplicação da medicina tradicional e das plantas medicinais, principalmente em países em desenvolvimento, continua sendo amplamente utilizado como base normativa para a manutenção da saúde (UNESCO, 1996). No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

O gênero *Spondias* (Anacardiaceae) compreende cerca de 40 espécies, com 12 variedades, tendo distribuição principalmente nas Américas e em alguns países da África (TROPICOS, 2014). No Brasil, existem 7 espécies: *Spondias dulcis* (cajarana), *Spondias macrocarpa* (cajá-redondo), *Spondias mombin* (cajá), *Spondias purpurea* (siriguela), *Spondias testudinis* (cajarana-da-mata), *Spondias venulosa* (cajá miúda) e a espécie do presente estudo *Spondias tuberosa* (umbu) (SILVA-LUZ e PIRANI, 2014).

A espécie *Spondias tuberosa* Arruda, conhecida popularmente como umbuzeiro, tapereba ou umbu, caracteriza-se por ser uma planta frutífera nativa e endêmica do Brasil e distribuída por toda região Nordeste e pelo estado de Minas Gerais (SILVA-LUZ e PIRANI, 2014).

As folhas de *S. tuberosa* são utilizadas popularmente como um anti-inflamatório, para combater a diarreia, disenteria e vermes (MATOS, 1999). A casca do caule é utilizada em problemas oftálmicos, na qual a decocção obtida a partir de um copo do farmacógeno em um litro de água é usada como lavagem para os olhos infectados. Também é usada a casca do caule como digestivo e laxante. Já os frutos tem seu uso como tônico geral e como fonte de vitaminas. É bebido como suco de frutos maduros ou como uma bebida regional chamada “Umbuzada”, que é feita com os frutos verdes, cozidos e amassados e misturados com leite e açúcar (AGRA et. Al., 2007a).

Considerando-se o conhecimento tradicional, esta espécie é utilizada para tratar vários tipos de inflamação (LINS-NETO et al., 2010), no entanto carece de estudos

químicos e farmacológicos, assim, este estudo tem como objetivo investigar o potencial anti-inflamatório do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias tuberosa* através de modelos *in vivo*. Além disso, objetiva-se desenvolver uma metodologia analítica validada que nos permita discutir os principais constituintes do extrato e sua correlação com o efeito farmacológico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA ANACARDIACEAE

A família Anacardiaceae é distribuída principalmente pela América do Sul e Central, sul da América do Norte e algumas regiões da África e Ásia. No Brasil existem 53 espécies e 8 variedades distribuídas em 14 gêneros, dentre eles destaca-se o gênero *Spondias* L. (SILVA-LUZ e PIRANI, 2014).

O gênero *Spondias* possui aproximadamente 40 espécies distribuídas pelas Américas, principalmente do Sul e Central, e algumas regiões da África (TROPICOS, 2014). No Brasil, existem 7 espécies: *Spondias dulcis* (cajarana), *Spondias macrocarpa* (cajá-redondo), *Spondias mombin* (cajá), *Spondias purpurea* (siriguela), *Spondias testudinis* (cajarana-da-mata), *Spondias venulosa* (cajá miúda) e a espécie do presente estudo *Spondias tuberosa* (umbu) (SILVA-LUZ e PIRANI, 2014).

2.2 ESPÉCIE *Spondias tuberosa*

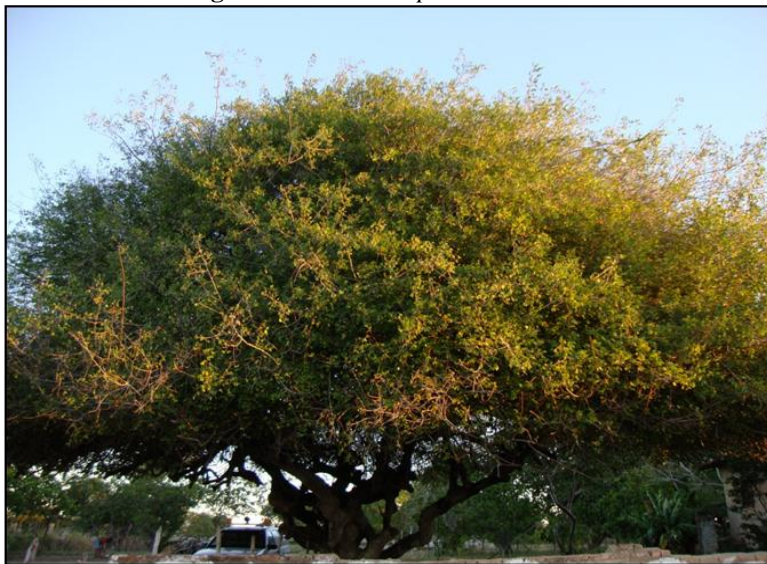
Spondias tuberosa (Anacardiaceae) é uma planta frutífera nativa e endêmica do Brasil distribuída em todo Nordeste brasileiro e pelo estado de Minas Gerais, é conhecida popularmente como umbuzeiro, taperebá ou umbu (SILVA-LUZ e PIRANI, 2014).

A espécie é adaptada às condições climáticas adversas do semiárido nordestino, pois floresce e frutifica na estação seca dessa região, representando uma importante fonte de renda para as populações rurais no período da estiagem da Caatinga (CAVALCANTI et al., 2000). Seus frutos são comestíveis e bem apreciados pela população local, e são utilizados na forma fresca, na forma de suco ou na forma de polpa cozida com leite (conhecido popularmente por umbuzada) (CAVALCANTI, 1999 apud LINS-NETO, 2008).

2.2.1 Descrição botânica

De acordo com Lima (1996) a árvore de *S. tuberosa* mede em torno de 7 m de altura por 10 m de diâmetro, possui copa ampla e arredondada, com tronco atrofiado e retorcido (Figura 1). Suas folhas são compostas, alternas, pinadas, glabras quando adultas, com folíolos ovalados (Figura 2). Enquanto que os frutos são uma drupa medindo de 12 a 15 cm, com 10 a 20 g, redondo ovoide ou oblongo, amarelo-esverdeado quando maduro, de pericarpo coriáceo e polpa branco-esverdeada, mole, succulento, sabor agri-doce, com uma semente (caroço) grande (Figura 2).

Figura 1 Árvore de *Spondias tuberosa*



Fonte: O autor.

Figura 2 Frutos e folhas de *Spondias tuberosa*



Fonte: O autor.

2.2.2 Uso popular

Diversas partes da planta são utilizadas na medicina popular, tais como cascas, entrecasca, frutos, raízes, resina e folhas os quais são utilizados para tratar uma variedade de doenças como infecções, doenças venéreas, doenças digestivas, diarreia, diabetes e distúrbios menstruais, também são utilizados como anti-emético e tônico (ALBUQUERQUE et al., 2007), em condições inflamatórias dos rins, cortes inflamados e dores de dente (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2011).

Lins-Neto et al. (2010) descreveram o uso popular da decocção das cascas/entrecasca ou infusão, tintura ou xarope das cascas para uso medicinal no tratamento de diabetes, colesterol, congestão, diarreia, inflamações, afecções uterinas, dor de estômago e herpes labial. Além disso, a decocção da casca do tronco é usada para lavar os olhos infectados (AGRA et al., 2007a; MATOS, 1999).

Os frutos são usados como tônico geral e como fonte de vitaminas (AGRA et al., 2007a; MATOS, 1999).

Quanto às folhas de *S. tuberosa*, objeto deste estudo, elas são popularmente utilizadas como anti-inflamatório, contra diarreia, disenteria e vermes (AGRA et al., 2007a; MATOS, 1999).

2.2.3 Composição Química

Existem poucos estudos químicos para a espécie *S. tuberosa*, principalmente para as folhas.

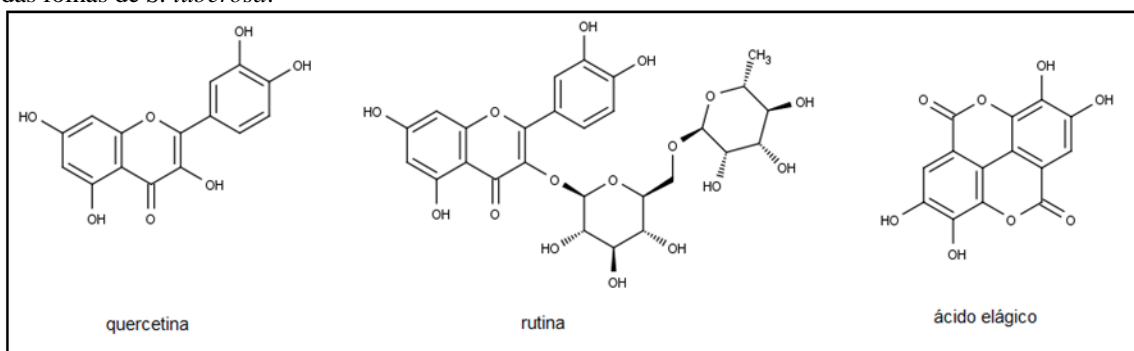
Numa análise fitoquímica de um extrato etanólico da entrecasca foram detectados fenóis, taninos, triterpenos e quinonas (ALMEIDA et al., 2005), bem como os flavonoides (4,41 mg/500 mg) e taninos (24,11 mg/500 mg) que foram quantificadas no extrato metanólico das cascas (ARAÚJO et al. 2008).

Em relação aos frutos, no extrato do fruto fresco, verificou-se a presença de vitamina C (18,4%), antocianinas (0,3%), flavonoides (6,9%) e carotenoides (1,0%) (RUFINO et al., 2010). Num estudo semelhante encontrou-se ácido ascórbico (12,1%), antocianinas (0,46%) e compostos fenólicos (44,6%) na polpa da fruta fresca.

No que diz respeito às folhas, existe apenas um estudo sobre a composição química, onde foram identificados, preliminarmente, compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis, flavonas, flavonoides, leucoantocianidinas e saponinas; identificou-se

também a presença de três compostos fenólicos: quercetina, rutina e ácido elágico (Figura 3) no extrato metanólico das folhas através de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) (SILVA et al., 2011).

Figura 3 Estruturas químicas de quercetina, rutina e ácido elágico, identificados no extrato metanólico das folhas de *S. tuberosa*.



Fonte: SILVA et al., 2011

2.2.4 Atividades biológicas

Apesar de sua ampla utilização na medicina popular, os estudos farmacológicos com *S. tuberosa* são escassos e até agora não suportam o uso empírico. Em uma pesquisa sobre plantas do nordeste brasileiro com potencial anticancerígeno, o extrato hidroetanólico das cascas de *S. tuberosa* mostrou uma inibição tumoral estatisticamente insignificante *in vitro* (PESSOA et al., 2006). Enquanto que o extrato metanólico das folhas de *S. tuberosa* demonstrou atividade antimicrobiana *in vitro* contra várias cepas de bactérias Gram-negativas, o mesmo extrato mostrou uma atividade discreta contra o Vírus da Dengue tipo 2 (DENV-2) no modelo de célula de mosquito *in vitro* (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Alguns estudos atentam para a atividade antioxidante dos frutos e folhas de *S. tuberosa* por meio de ensaios colorimétricos *in vitro* e correlacionam com a presença de compostos fenólicos (ALMEIDA et al., 2011; GREGORIS et al., 2013; SILVA et al., 2012; MELO; ANDRADE, 2010; RUFINO et al., 2010; VISSOTO et al., 2013; ZIELINSKI et al., 2014).

Neste trabalho, como proposta adicional à avaliação do potencial anti-inflamatório, o qual é a principal indicação de uso de *S. tuberosa* na medicina popular,

foi avaliada a atividade antiviral contra DENV-2 de *S. tuberosa*. Até o momento, não foram encontrados ensaios não-clínicos *in vivo* com *S. tuberosa*.

2.3 DEMAIS ESPÉCIES DO GÊNERO *Spondias*

Dentre as espécies encontradas no Brasil, as mais relatadas na literatura, além de *Spondias tuberosa*, são *Spondias mombin*, *Spondias purpurea* e *Spondias dulcis*. A espécie *Spondias pinnata*, a qual é encontrada raramente no país, também tem sido muito estudada. Tendo em vista a importância dessas espécies e a literatura limitada de *S. tuberosa* foi feita uma revisão sobre as demais espécies do gênero.

2.3.1 *Spondias mombin*

2.3.1.1 Informação Botânica

Spondias mombin Linnaeus é uma planta frutífera, nativa e não endêmica do Brasil. Sua distribuição se dá, geralmente, pelas Américas tropicais. A espécie é encontrada abundantemente no Brasil especialmente nas regiões norte e nordeste. Também há relatos do cajá do sul do México ao Peru, assim como relatos da espécie nos continentes asiático e africano (MATTIETTO; MATTA, 2011; SILVA-LUZ; PIRANI, 2015).

No Brasil, a espécie é popularmente conhecida como cajá, cajá-mirim, cajarana, cajazeira, cajazinho e taperebá (SILVA-LUZ; PIRANI, 2015).

A árvore pode chegar a medir 30 m de altura, os frutos são ovais ou oblongos e apresentam uma cor amarela brilhante com uma pequena camada de polpa recobrendo um caroço volumoso. As folhas são compostas e alternas, com 5-11 pares de folíolos, as lâminas dos folíolos são oblongas, com as margens lisas e um vértice agudo (FILGUEIRAS et al., 2000; MATTIETTO; MATTA, 2011).

2.3.1.2 *Uso popular*

A planta é utilizada popularmente para tosse, ferimentos, conjuntivite (folhas). O suco do fruto é bebido como diurético e antipirético. A decocção das cascas da planta serve como emético, para tratar diarreia, disenteria, hemorroidas, gonorreia e leucorreia.

A casca pulverizada é aplicada em feridas como cicatrizante. Um chá feito a partir das flores e folhas é utilizado para aliviar dores de estômago, uretrite, cistite e inflamações nos olhos e gargantas. O suco das folhas é usado como cataplasma para feridas e inflamações. As folhas são também mencionadas como abortivas e estimulantes de parto (AYOKA et al., 2008; ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007).

2.3.1.3 Composição química

Preliminarmente, já foi relatada a presença das seguintes classes de metabólitos em *Spondias mombin*: taninos, ácidos fenólicos, saponinas, antraquinonas, esteroides, terpenos, glicosídeos cardiotônicos, alcaloides e flavonoides (CORTHOUT et al., 1991; CORTHOUT et al., 1992; CORTHOUT et al., 1994; ABO et al., 1999; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; AKINMOLADUN et al., 2010).

Os principais compostos isolados em *S. mombin* estão dispostos na Tabela 1.

2.3.1.4 Atividades biológicas

Entre as espécies mais importantes do gênero *Spondias*, *S. mombin* tem sido a mais estudada até o momento. Suas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* já relatadas estão resumidas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. A espécie também foi investigada quanto ao seu potencial antioxidante *in vitro* frente aos métodos de DPPH, ABTS, TEAC (Atividade antioxidante equivalente ao Trolox), Sequestro de hidroxila, Peroxidação lipídica e Poder redutor. As folhas e frutos de *Spondias mombin* têm demonstrado elevados valores de capacidade antioxidante na maioria dos testes em que foram avaliados, tornando a espécie relevante nesse aspecto. Os valores obtidos pelos ensaios com os frutos permite classifica-los como fruto com capacidade antioxidante acima da média (AKINMOLADUN et al., 2010; TIBURSKI et al., 2011; SILVA et al., 2012; AKINMOLADUN et al., 2014).

Tabela 1 Principais compostos isolados de *Spondias mombin* descritos na literatura

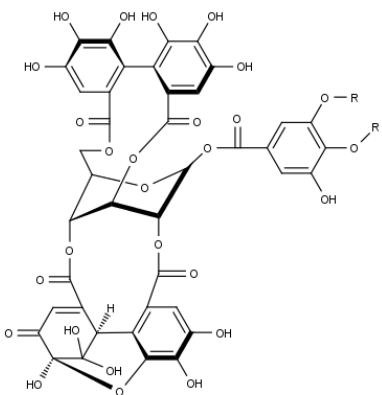
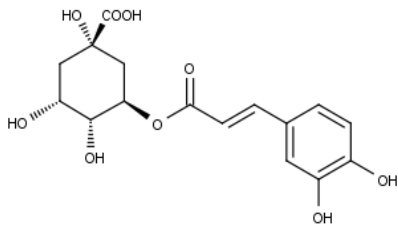
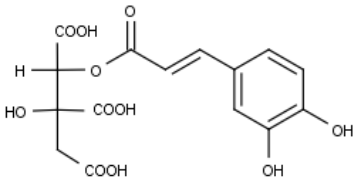
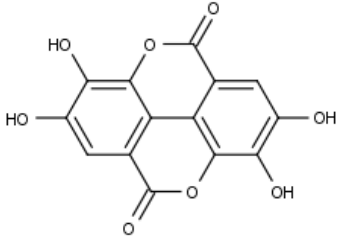
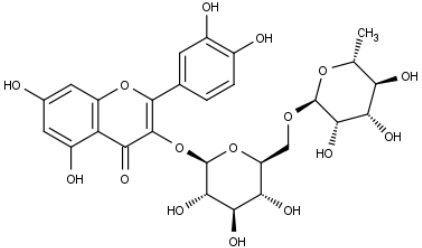
Classe	Composto	Parte da planta	Atividade biológica	Referência
Taninos (elagitaninos)	 <p>Geraniina, R = H, H Galoilgeraniina, R = H, galoil</p>	Folhas e caules	Antiviral contra <i>Coxsackie</i> e <i>Herpes simplex</i> vírus	(CORTHOUT et al., 1991)
Ácidos fenólicos	 <p>Ácido clorogênico</p>  <p>Éster cafeicol (Ácido hidroxicítrico 2-O cafeíco)</p>	Folhas e caules	Antiviral contra <i>Coxsackie</i> e <i>Herpes simplex</i> vírus	(CORTHOUT et al., 1992)
Taninos e flavonoides	 <p>Ácido elágico</p>  <p>Rutina</p>	Folhas	Antiviral e antimicrobiana	(SILVA et al. 2011; 2012)

Tabela 2 Estudos farmacológicos *in vitro* de *Spondias mombin* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antimicrobiana	Folhas	Aquoso e etanólico (5, 10, 20, 25 e 50%)	Os extratos foram testados contra diversas cepas de bactérias gram-positivas e negativas: <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> spp. e <i>Salmonella</i> spp pelo método de Difusão em Placa. Os extratos testados mostraram atividade contra todas as cepas testadas, sendo o mais ativo o etanólico 50%. O extrato etanólico mostrou-se mais ativo que o aquoso.	(AJAO; SHONUKAN, 1985)
Antiviral	Folhas e caules	Elagitaninos isolados do extrato etanólico 80%: geraniina e galoilgeraniina	Os isolados foram testados <i>in vitro</i> contra os vírus <i>Coxsackie B₂</i> e <i>Herpes simplex</i> tipo 1 na concentração de 50 µg/mL no ensaio de formação de placas. Os isolados possuíram atividade significativa contra os vírus testados, ambos compostos tiveram fraca atividade contra <i>Enterobacter aeruginosa</i> e <i>Proteus vulgaris</i> em 500 µg/mL.	(CORTHOUT et al, 1991)
Antiviral	Folhas e caules	Ácidos fenólicos isolados da fração <i>n</i> -butanol: 2-butanona (1:1) do extrato etanólico 80%: ácido clorogênico, ácido clorogênico butil éster e éster cafeoil	Os isolados foram testados <i>in vitro</i> contra os vírus <i>Coxsackie B₂</i> e <i>Herpes simplex</i> tipo 1 na concentração de 100 µg/mL no ensaio de formação de placas. Ácido clorogênico butil éster (acredita-se que foi um artefato da extração) mostrou atividade contra o vírus <i>Herpes simplex</i> tipo 1, enquanto que o Éster cafeoil mostrou atividade contra o <i>Coxsackie B₂</i> . O ácido clorogênico não apresentou atividade.	(CORTHOUT et al, 1992)
Antimicrobiana e Moluscicida	Folhas e caules	Ácidos fenólicos isolados do extrato etanólico 80%: três ácidos 6-alquenil-salicílicos (ácido pelandjuaico)	Os isolados foram testados <i>in vitro</i> contra diversas cepas de bactérias pelo método de Concentração Bactericida Mínima (CBM) e avaliado seu efeito moluscicida. Os isolados apresentaram efeito antibacteriano pronunciado contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> e <i>Mycobacterium fortuitum</i> (CBM em uma concentração de 3-25 µg/mL) e elevado efeito moluscicida contra o caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> .	(CORTHOUT et al, 1994)
Inibitória da β-lactamase	Partes aéreas	Hexânico e isolado derivado do ácido anacárdico (ácido 6-(heptadecatrieno-8(Z),11(Z),14(Z)-il)-2-hidroxibenzoico)	O extrato e o composto isolado foram avaliados <i>in vitro</i> no ensaio de inibição da β-lactamase. O composto isolado teve atividade contra as duas enzimas utilizadas no ensaio com um IC ₅₀ de 5 µg/mL.	(COATES et al., 1994)

Continuação Tabela 2 Estudos farmacológicos *in vitro* de *Spondias mombin* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antimicrobiano	Folhas e cascas	Metanólico	Os extratos de três espécies foram testados (25, 50 e 100 mg/mL) contra cepas de algumas bactérias pelo método de difusão em ágar e diluição de cultura de bactérias. O extrato das folhas de <i>S. mombin</i> apresentou atividade antibacteriana significativa contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Shigella dysenteriae</i> , enquanto que as cascas foram ativas contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> . <i>S. mombin</i> não teve atividade contra os fungos testados.	(ABO et al., 1999)
Leishmanicida	Folhas	Metanólico e suas frações	As frações obtidas a partir do extrato metanólico foram testadas <i>in vitro</i> nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL contra as formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> . O extrato metanólico e a fração acetato: metanol (80:20) foram as mais ativas contra a forma promastigota. As frações acetato: metanol (70:30 e 80:20, v:v) foram as mais ativas contra a forma amastigota.	(ACCIOLY, 2001)
Antidiabética	Folhas	Metanólico, fração éter dietílico e triterpeno isolado (3β-olean-12-en-3-il(9z)-hexadec-9-enoato)	O extrato metanólico, fração éter dietílico e um composto isolado (3β-olean-12-en-3-il(9z)-hexadec-9-enoato) exibiram significativa atividade inibitória contra enzima α-amilase de <i>Aspergillus oryzae</i> no ensaio inibitório da α-amilase.	(FRED-JAIYESIMI et al., 2009)
Antimicrobiana	Cascas	Metanólico, frações e isolado semipuro (triterpenos)	O extrato e frações semipurificadas foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pelo ensaio Baseado em Microplaca. Três frações semipurificadas (uma delas rica em terpenos) mostraram-se significativamente efetivas contra a bactéria de maneira dose-dependente com uma potencia acima de 90%.	(OLUGBUYIRO et al., 2009)
Antiviral	Folhas	Metanólico 80% padrões identificados e	O extrato e os compostos identificados na espécie (padrões) foram avaliados <i>in vitro</i> contra o Vírus da Dengue tipo 2. Dos compostos identificados (ácido elágico e quercetina) apenas a quercetina (IC ₅₀ de 500 µg/mL) teve atividade significativa contra o vírus, o extrato não teve atividade significativa.	(SILVA et al., 2011)

Continuação Tabela 2 Estudos farmacológicos *in vitro* de *Spondias mombin* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antimicrobiana	Folhas	Metanólico 80%	O extrato foi avaliado contra diversas cepas de bactérias pelos métodos de Difusão em Ágar por Poço e Concentração Inibitória Mínima (CIM). O extrato foi ativo contra as cepas de <i>Serratia marcescens</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> .	(SILVA et al., 2012)
Antimicrobiana	Folhas	Metanólico, acetona, etanólico e aquoso	Todos os tipos de extratos testados mostraram-se ativos contra as bactérias testadas, sendo os resultados mais relevantes do extrato aquoso que mostrou a melhor atividade contra <i>Serratia marcescens</i> e o extrato etanólico que apresentou a melhor atividade contra <i>Staphylococcus aureus</i> . A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos esteve entre 10-90 mg/mL.	(AROMALAN; BADEJO, 2014)

Tabela 3 Estudos farmacológicos *in vivo* de *Spondias mombin* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antifertilidade	Folhas	Aquoso	O extrato foi administrado i.p. em camundongos fêmeas e ratas grávidas nas doses de 750 e 1500 mg/kg e foi verificado os efeitos danosos aos fetos e as grávidas e a dose efetiva abortiva (ED ₅₀) e a dose letal 50% (LD ₅₀). A dose abortiva efetiva foi de 750 mg/kg e a letal foi de 1863 mg/kg.	(OFFIAH; ANYANWU, 1989)
Anti-inflamatória	Cascas	Etanólico	O extrato foi administrado oralmente em ratos machos Sprague-Dawley na dose equivalente à de 1,5 g de planta seca/kg de peso corporal no modelo de inflamação de artrite com a técnica da carragenina-adjuvante. O extrato mostrou resultado significativo apenas na redução da inflamação aguda após 3 h, não tendo efeito significativo em 5 h nem no tratamento crônico após 24 h.	(ABAD et al., 1996)
Cicatrizante	—	—	O extrato foi administrado (0,05 mL de uma suspensão a 100 mg/mL) topicamente em feridas feitas em camundongos e a atividade cicatrizante foi avaliada. No entanto, o extrato não apresentou uma atividade significativa.	(VILLEGAS et al., 1997)
Anti-helmíntica	Folhas	Etanólico e aquoso	O extrato foi administrado oralmente nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg em ovelhas naturalmente infectadas com nematódeos gastrintestinais. O extrato apresentou controle nos helmintos uma vez que a contagem dos nematódeos apresentou diminuição significativa nos grupos tratados de maneira dose-dependente.	(ADEMOLA et al., 2005)

Continuação Tabela 3 Estudos farmacológicos *in vivo* de *Spondias mombin* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antipsicótica	Folhas	Aquoso, metanólico e etanólico	A intensidade do comportamento estereotipado induzido por anfetamina e apomorfina foi avaliado em ratos após administração dos extratos i.p. nas doses de 12,5-100 mg/kg. Todos extratos diminuíram o comportamento estereotipado sendo o extrato mais potente o extrato etanólico.	(AYOKA et al., 2006)
Sedativa e Ansiolítica	Folhas	Aquoso, metanólico e etanólico	Os extratos foram administrados i.p. em camundongos e ratos. Os extratos metanólico e etanólico (12,5-100 mg/kg) foram ativos nos dois modelos de avaliação utilizados (tempo de sono induzido pelo hexobarbital e comportamento exploratório induzido por <i>novelty</i>), enquanto que o extrato aquoso foi ativo apenas nas doses de 50 e 100 mg/kg. Os extratos tiveram suas ações bloqueadas pelo flumazenil, indicando que os extratos possuíam efeito sedativo e antidopaminérgicos.	(AYOKA et al., 2006)
Anticonvulsivante	Folhas	Aquoso, metanólico e etanólico	Os extratos foram administrados i.p. em camundongos nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg sobre o efeito convulsivo induzido por estriçnicina e picrotoxina. Os extratos metanólico e etanólico protegeram contra convulsões induzidas por picrotoxina nas doses de 50 e 100 mg/kg, enquanto que o aquoso não apresentou ação. Os extratos não tiveram efeito na convulsão induzida por estriçnicina.	(AYOKA et al., 2006)
Antifertilidade	Cascas	Aquoso	O extrato foi administrado intragastricamente em ratos albinos machos nas doses de 8,4; 16,8 e 33,6 mg/kg/dia por quatro semanas. Os resultados sugeriram que o extrato teve ação antifertilidade reversível e que os testículos e epidídimo seriam os sítios de ação primordiais.	(RAJI et al., 2006)
Abortiva	Folhas	Metanólico	O extrato foi administrado i.p. nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg em camundongos fêmeas grávidas para avaliar o efeito abortivo. A dose abortiva efetiva (ED ₅₀) foi de 105,33 mg/kg.	(NWORU et al., 2007)
Antimicrobiana	Folhas	Metanólico 60%	O extrato foi administrado oralmente em ratos após infecções induzidas por <i>Bacillus cereus</i> e <i>Clostridium sporogenes</i> . O extrato teve efeito sobre os parâmetros hematológicos nos ratos sugerindo possível atividade antibacteriana <i>in vivo</i> sobre a patogênese.	(OLADUNMOYE et al., 2007)

Continuação Tabela 3 Estudos farmacológicos *in vivo* de *Spondias mombin* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antifertilidade	Folhas	Etanol:água (70:30)	O extrato foi administrado (dose de 800 mg/kg i.p. para anticonceptivo/abortivo e 500 mg/kg s.c. para estrogênica) em ratas grávidas para avaliar o efeito anticonceptivo, abortivo e atividade estrogênica. O extrato apresentou atividade anticonceptiva, mas não abortiva e não exibiu atividade estrogênica.	(UCHENDU; ISEK, 2008)
Antifertilidade	Folhas	Etanólico 75%	O extrato foi administrado i.p. em camundongos fêmeas grávidas em doses de 250-1500 mg/kg para avaliar o efeito abortivo. O extrato apresentou dose efetiva sobre aborto (ED ₅₀) de 753,96 mg/kg.	(IGWE et al., 2011)
Anti-inflamatória	Folhas	Metanólico	O extrato foi pré-administrado oralmente nos animais nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e causou uma inibição dose-dependente no modelo de edema causado pela carragenina num período de 4 h.	(NWORU et al., 2011)
Antifertilidade	Folhas	Etanólico	Foi avaliado a histologia da hipófise anterior, ovário e útero e dosagem dos hormônios sexuais de ratas Wistar adultas após administração dos fármacos. O extrato foi administrado oralmente nas doses de 250, 350 e 500 mg/kg por 14 dias. Foram observadas alterações histológicas danosas nos tecidos avaliados e redução sérica dos hormônios sexuais das ratas tratadas em relação ao controle, evidenciando que o extrato apresenta propriedade antifertilidade justificando seu uso como contraceptivo local.	(ASUQUO et al., 2013)

2.3.2 *Spondias pinnata*

2.3.2.1 *Informação Botânica*

Spondias pinnata (sin. *Mangifera pinnata* ou *Spondias mangifera*) é uma planta decídua distribuída pelos países do Centro e Sul da Ásia, principalmente China e Índia. Também é cultivada em algumas ilhas da América Central como Cuba e República Dominicana. Há relatos de sua presença na Venezuela e Suriname e, raramente, no Brasil e em outras partes da América tropical (TROPICOS, 2015; HAFIZ, 2014).

É conhecida popularmente como cajamangueira, cajá-manga e imbú manga, ou em diversos países como “wild mango”, “hog-plum” e “amara” (BADONI; BISHT, 2009; HAFIZ, 2014).

Sua árvore cresce em média 10 m de altura, ela possui um tronco reto de coloração cinza suave. Suas folhas são verdes, brilhantes, com 30-40 cm com folíolos dispostos alternadamente. Os frutos tem a forma arredondada, oval ou elíptica e possui um sabor azedo (HAZRA, 2008; HAFIZ, 2014).

2.3.2.2 *Uso popular*

Na medicina popular, a casca é utilizada para tratar disenteria e diarreia, e também para prevenir vômitos. Já as raízes são relatadas como úteis na regulação menstrual. A planta é relatada como anti-tuberculosa e como diurética. As folhas são também utilizadas como anti-inflamatória (HAZRA, 2008; BADONI; BISHT, 2009; DADUANG et al., 2011; HAFIZ, 2014).

2.3.2.3 *Composição química*

Na fitoquímica preliminar de *Spondias pinnata* foi verificada a presença de flavonoides, taninos, alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas e terpenos (MONDAL; DASH, 2009; DAS et al., 2011; MANIK et al., 2013).

Numa análise por Cromatografia Líquida acoplada a Espectro de Massas dos extratos acetona: água (70:30, v/v) e metanol: água (70:30, v/v) dos frutos de *Spondias pinnata* foi identificado a presença de ácido gálico, ácido salicílico, ácido clorogênico,

ácido elágico, *p*-cumárico, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, quercetina, catequina, rutina e mirecetina (SATPATHY et al., 2011).

2.3.2.4 Atividades biológicas

As atividades biológicas de *Spondias pinnata* estão dispostas nas Tabelas 4 e 5. A atividade antioxidante de *S. pinnata* também foi investigada. O extrato das raízes de *S. pinnata* apresentou excelente resultado pelos testes de DPPH e poder redutor (DAS et al., 2011). A fração acetato de etila do extrato etanólico do exocarpo dos frutos foram promissores pelo ensaio do DPPH, poder redutor e capacidade antioxidante total (MANIK et al., 2013).

Tabela 4 Estudos farmacológicos *in vitro* de *Spondias pinnata* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antimicrobiana	Cascas do tronco	Etanólico 80%	Os extratos de 78 plantas selecionadas foram avaliados <i>in vitro</i> em diversas doses (1,56-25 mg/mL) contra quatro cepas de bactérias: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelo método de Difusão em Poços e contra dois fungos: <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus niger</i> . <i>S. pinnata</i> foi ativa contra <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> nas concentrações de 25 e 6,25 mg/ mL, respectivamente. A planta não mostrou atividade contra os fungos testados.	(VALSARAJ et al., 1997)
Inibidora da alfa-glicosidase	Frutos	Aquoso e metanólico	Extratos de várias espécies usadas popularmente para tratar diabetes foram investigados quanto sua atividade de inibição da alfa-glicosidase <i>in vitro</i> pelo ensaio de inibição da alfa-glicosidase na concentração de 1,0 mg/mL. Das doze plantas escolhidas, <i>S. pinnata</i> estava entre as cinco espécies mais ativas que mostraram uma inibição acima de 60%.	(ABESUNDARA et al., 2004)
Leishmanicida	—	Metanólico	Os extratos de diversas plantas foram testados de acordo com sua atividade leishmanicida pelo teste de MTT sobre as formas promastigotas. O extrato de <i>S. pinnata</i> foi considerado ineficaz nesse teste.	(TAKAHASHI et al., 2004)
Antiplasmodial	Raízes	Aquoso, metanólico e diclorometano	Os extratos de diversas plantas foram testados <i>in vitro</i> contra cepas de <i>Plasmodium falciparum</i> resistentes a cloroquina nas concentrações de 1-50 µg/mL. Os extratos de <i>S. pinnata</i> foram considerados inativos.	(HOUT et al., 2006)

Continuação Tabela 4 Estudos farmacológicos *in vitro* de *Spondias pinnata* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Anti-helmíntica	Cascas e caule interno	Metanólico	A atividade anti-helmíntica dos extratos (10-100 mg/mL) foi avaliada <i>in vitro</i> contra a espécie <i>Pheretima posthuma</i> . Os extratos apresentaram atividade anti-helmíntica concentração-dependente. O extrato das cascas foi mais efetivo na paralisação e morte dos vermes. Os resultados para as concentrações mais elevadas de 80 e 100 mg/mL foram próximas ao controle piperazina.	(GANGARAO; JAYARAJU, 2009)
Antimicrobiana	Resina	Metanol, etanol, acetato de etila, clorofórmio, benzeno, éter de petróleo e hexano	A atividade antimicrobiana do extrato da resina foi avaliada contra os microorganismos <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> pelos métodos de Difusão em Disco e ensaio de Macrodiluição. Os extratos foram ativos contra o <i>Bacillus subtilis</i> (Gram +), mas não inibiram o crescimento das bactérias Gram (-) nem do fungo <i>S. cerevisiae</i> .	(GUPTA et al., 2010)
Antimicrobiana citotoxicidade	e Raízes	Clofórmio e etanólico	Os dois tipos de extratos foram avaliados quanto sua atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco na concentração de 0,1 mg/disco com oito bactérias e potencial citotóxico pelo bioensaio de letalidade de ovos de camarão. Ambos os extratos tiveram a atividade antibacteriana de boa a moderada quando comparados com o padrão canamicina. O extrato etanólico foi mais ativo contra <i>Salmonella typhi</i> e <i>Vibrio cholerae</i> , enquanto que o clorofórmio foi mais ativo apenas contra <i>Salmonella typhi</i> .	(DAS et al., 2011)
Anticancerígena antimicrobiana	e Folhas	Etanol 70%	Extratos de diversas espécies foram avaliados quanto sua atividade anticancerígena contra células de carcinoma da cavidade oral e atividade antibacteriana pelo método de difusão em poços contra as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Escherichia coli</i> . O extrato de <i>S. pinnata</i> mostrou uma atividade antibacteriana promissora quando comparado ao padrão cloranfenicol para todas as cepas testadas e principalmente <i>Staphylococcus aureus</i> , no entanto, não apresentou atividade anticâncer para a linhagem celular.	(DADUANG et al., 2011)

Continuação Tabela 4 Estudos farmacológicos *in vitro* de *Spondias pinnata* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Antimicrobiana e citotóxica	Frutos	Etanólico 80%	A atividade antibacteriana e citotóxica do extrato foi avaliada pelo método de difusão em disco e pelo bioensaio de letalidade de camarões, respectivamente. O extrato do fruto exibiu atividade antibacteriana moderada na concentração de 500 µg/disco, mostrando resultados promissores para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> . O extrato exerceu forte citotoxicidade por este método com LC ₅₀ de 2,12 µg/mL.	(MUHAMMAD et al., 2011)
Anti-HIV	Frutos	Hexânico	Os extratos hexânicos de algumas espécies foram avaliados enquanto sua atividade anti-HIV por sua ação contra a transcriptase reversa. O extrato de <i>S. pinnata</i> apresentou inibição inferior a 20% sendo considerada uma inibição fraca quando comparada com as outras espécies testadas.	(SILPRASIT et al., 2011)
Antimicrobiana e trombolítica	Exocarpo dos frutos	Etanólico e frações	O extrato e frações foram investigados quanto sua atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco contra diversas 13 cepas (bactérias gram (+) e (-) e fungos) e seu potencial trombolítico <i>in vitro</i> . As frações acetato de etila e aquosa foram inativas contra a maioria das cepas, exceto <i>Shigella dysentery</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , enquanto que as frações <i>n</i> -hexano e diclorometano foram mais ativas. Todas as frações apresentaram atividade trombolítica significativa.	(MANIK et al., 2013)
Anticancerígena	Cascas	Metanólico 70%	O extrato teve sua atividade anticancerígena investigada, em diversas concentrações, na promoção da apoptose frente a linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão e de mama humanos. O extrato mostrou boa atividade contra ambas linhagens celulares com IC ₅₀ próximo a 150 µg/mL, enquanto que não demonstrou toxicidade contra células normais.	(GHATE et al., 2014)

Tabela 5 Estudos farmacológicos *in vivo* de *Spondias pinnata* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Hipoglicemiante	Cascas	Clorofórmio, metanólico e aquoso	Vários extratos foram avaliados quanto sua atividade hipoglicemiante em ratos Wistar nas doses de 300 mg/kg via oral pelo método de hiperglicemia induzida por aloxano. Entre os extratos o metanólico apresentou efeitos promissores (reduziu 34,97% os níveis de açúcar no sangue) quando comparado ao controle utilizado (glibenclamida 2,5 mg/kg) que reduziu 47% 6 h após o tratamento.	(MONDAL; DASH, 2009)
Analgésica	Entrecasca	Etanólico	O extrato etanólico da entrecasca de <i>Spondias pinnata</i> apresentou propriedades analgésicas dose-dependentes (50-100 mg/kg, via oral) quando avaliado <i>in vivo</i> em camundongos Swiss no teste de dor induzida por ácido acético e teste da resposta nociceptiva induzida por formalina quando comparado com o controle ácido acetilsalicílico (20 mg/kg).	(PANDA et al., 2009)
Anti-inflamatória	Cascas	Metanólico e Acetato de etila	O extrato metanólico e acetato de etila da casca interna de <i>Spondias pinnata</i> foi avaliado quanto sua atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata induzido por carragenina. O extrato acetato de etila apresentou inibição significativa da inflamação nas doses de 200 e 400 mg/kg após administração oral, enquanto que o extrato metanólico foi ativo apenas na dose de 400 mg/kg.	(RAO et al., 2009)
Anti-inflamatória	Cascas	Fração acetato de etila e <i>n</i> -butanol do extrato etanólico	A atividade anti-inflamatória e analgésica da fração acetato de etila e <i>n</i> -butanol do extrato alcoólico das cascas de <i>Spondias mangifera</i> (sin. de <i>S. pinnata</i>) foi avaliada <i>in vivo</i> em ratos Wistar nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e método da retirada de pata do calor, respectivamente. As duas frações foram administradas oralmente nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg e mostraram redução no edema da pata e prolongaram o tempo de latência da pata nos animais testados quando comparados ao controle.	(SACHAN et al., 2011)

Continuação Tabela 5 Estudos farmacológicos *in vivo* de *Spondias pinnata* descritos na literatura

Atividade farmacológica	Parte da planta	Extrato/ fração	Detalhes	Referência
Hipoglicemiante, Antilipidêmico e efeito regenerativo de células β	Cascas do caule	Aquoso	O extrato foi avaliado (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 2,00g/kg via oral) quanto seu efeito hipoglicemiante, antilipidêmico e regenerativo de células B em ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina. O percentual de hemoglobina glicada diminuiu nos animais tratados com <i>S. pinnata</i> , assim como, houve uma melhora nos parâmetros lipídicos e regeneração das células da ilhota. O efeito do extrato foi dose dependente e a dose ótima foi 1,0 g/kg, a qual teve 29% de aumento da tolerância à glicose, enquanto que o controle glibenclamida (0,5 mg/kg) teve um aumento de 41% na tolerância .	(ATTANAYAKE et al., 2014)

2.3.3 *Spondias purpurea*

Spondias purpurea é uma planta frutífera distribuída por vários países da América do Sul como Bolívia, Brasil, Peru e Equador, também é encontrada em alguns países da América Central e pelo México (TROPICOS, 2015). No Brasil, geralmente é encontrada na região nordeste do país (CEVA-ANTUNES et al., 2006). A espécie é conhecida popularmente como seriguela, “jocote”, “red mombin” e “ciruela” (ENGELS et al., 2012).

Em relação ao seu uso popular, uma decocção das folhas é utilizada para tratar diarreia e disenteria. O suco das folhas é tomado oralmente para tratar glândulas inchadas e traumas, as folhas esmagadas são utilizadas na forma de banho para dor de cabeça. O fruto é consumido em grandes quantidades para tratar constipação. Diversas partes da planta são utilizadas em preparações para tratar dor de garganta e por seus efeitos antibacterianos. Na forma de infuso é utilizada como cicatrizante e para tratar hepatite (AGRA et al., 2007b; ORWA et al., 2009; BIESKI et al., 2012)

Em um estudo sobre a composição química de *Spondias purpurea* foram identificados ácidos fenólicos e flavonóis *O*-glicosilados extraídos das cascas do fruto e caracterizados por *UHPLC-DAD-ESI-MS*. No total foram identificados 21 compostos fenólicos sendo eles derivados *O*-glicosilados de quercetina, canferol, canferídeo e ramnetina. O exocarpo foi extraído com acetona/ácido fórmico 0,1% na proporção 80:20, v/v e em seguida analisado por *UHPLC* com uso de padrões (ENGELS, 2012). Foi encontrado apenas esse estudo sobre sua composição química na literatura.

A atividade antimicrobiana das folhas e cascas de *S. purpurea* foi avaliada *in vitro* contra as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Bacillus cereus* pelo método de difusão em ágar e concentração inibitória mínima. O extrato hexânico das folhas mostrou-se ativo contra as três cepas estudadas, enquanto que o extrato etanólico e as cascas foram inativos (MIRANDA-CRUZ et al., 2012).

Não foram encontrados estudos *in vivo* com a espécie.

2.3.4 *Spondias dulcis*

Spondias dulcis (sin. *Spondias cytherea*) é uma frutífera distribuída em alguns países do norte da América do Sul, como Brasil, Venezuela e Equador e alguns países da América Central (TROPICOS, 2015). É conhecida popularmente como cajá-anão, taperebá-do-sertão, cajá-manga ou cajarana (OLIVEIRA, 2011).

Na medicina tradicional, uma infusão da planta é citada para o tratamento oral e tópico de escabiose. As cascas são utilizadas para tratar diarreia. *S. dulcis* também é usada para melhoria da visão e infecções oculares. Os frutos são citados para tratar coceira, úlceras gástricas, dor de garganta e inflamação na pele (BIESKI et al., 2012; ISLAM et al., 2013).

O extrato metanólico e frações diclorometano e clorofórmio das folhas e frutos de *S. dulcis* foi avaliado quanto ao seu potencial antioxidante, antimicrobiano, citotoxicidade e potencial trombolítico. A atividade antioxidante foi investigada pelo poder redutor, método DPPH e capacidade antioxidante total, onde o extrato metanólico dos frutos apresentou o melhor perfil. A metodologia para o ensaio antimicrobiano foi o teste de difusão em disco contra treze cepas (onze bactérias e dois fungos), todos os extratos tiveram atividade moderada contra as bactérias e fraca ou nenhuma contra os fungos. Na citotoxicidade, no bioensaio de letalidade de camarões todos os extratos tiveram valores muito abaixo dos valores de corte para citotoxicidade. Todos os extratos possuíram atividade trombolítica significativa (ISLAM et al., 2013).

Na investigação da atividade antidiabética *in vitro* do extrato das folhas de *S. dulcis* a espécie apresentou a melhor atividade quando comparada com outras espécies também usadas popularmente para tratar diabetes (JANTAN, 2010).

Não foram encontrados estudos *in vivo* e sobre sua constituição química na literatura.

Uma vez que este trabalho objetiva-se a identificar constituintes químicos que possam ser utilizados como marcadores para a espécie e avaliar o potencial anti-inflamatório de *Spondias tuberosa*, faz-se necessário revisar a legislação inerente a medicamentos fitoterápicos e validação da metodologia analítica, assim como o processo biológico de inflamação e os modelos de atividade anti-inflamatória realizados no presente estudo.

2.4 COMPARAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO *Spondias*

As espécies do gênero *Spondias* nativas do Brasil apresentam características bem semelhantes, principalmente em relação aos seus frutos, o que torna a identificação botânica bem difícil para o gênero. Quase todas as espécies de *Spondias* têm um endocarpo fibroso e folíolos com veias intra-marginais. Os frutos de *Spondias tuberosa*, *S. mombim* e *S. purpurea* tem características bem próximas, sendo os das duas primeiras em geral mais arredondados ou ovais, enquanto que o da última é geralmente no formato oblongo. O fruto do umbu é de coloração esverdeada e apresenta um mesocarpo mais duro, enquanto que o fruto do cajá apesar de tamanho e formato parecido tem coloração em geral amarela brilhante e textura do mesocarpo mais mole. Os frutos da seriguela são geralmente alaranjados e de textura de mesocarpo mole, todas as três espécies tem frutos com caroços grandes. A árvore de *S. tuberosa* apresenta uma copa arredondada e ampla (em torno de 7 m de altura por 10 m de diâmetro), enquanto que *S. mombim* apresenta uma árvore geralmente mais alta do que larga, podendo chegar até 30 m de altura, e que é menos densa do que o umbuzeiro. Já *S. purpurea* tem uma árvore de porte mais baixo dentre as três (entre 3-10 m) e com uma copa menos densa em folhagem do que o umbuzeiro. Os frutos de *S. purpurea* tem um sabor mais adocicado, enquanto que o fruto de *S. mombim* tem um sabor mais ácido e o de *S. tuberosa* seria uma mescla entre o ácido e o doce. As características das folhas são bem similares, pois ambas são compostas e com extensões semelhantes, no entanto, os folíolos de *S. tuberosa* são em geral oblongos e com ápice arredondado, enquanto que *S. mombim* e *S. tuberosa* apresentam folíolos em geral ovais e com ápice acuminado. O que difere as folhas de *S. tuberosa* de *S. mombim* é que a primeira apresenta folíolos com um carácter mais ovalado enquanto que a segunda se apresenta mais no formato lanceolado (SOUZA et al., 1995; LIMA, 1996; FILGUEIRAS et al., 2000; COSTA et al., 2001; LORENZI, 2002; MILLER; SCHAAL, 2005; NASCIMENTO-SILVA; PAIVA, 2007; SANTOS; OLIVEIRA, 2008; MONTE et al., 2011; MATTIETTO; MATTA, 2011).

Através da revisão realizada sobre o gênero *Spondias* foi possível verificar que a maioria dos trabalhos se concentra em três espécies principais: *Spondias tuberosa*, *Spondias mombim* e *Spondias pinnata*, as quais ilustram aproximadamente 80% das publicações no gênero. As duas primeiras são nativas do Brasil, já a última raramente é encontrada no país, no entanto, já é bem estudada na literatura, uma vez que a mesma é

bem distribuída por países asiáticos os quais são conhecidos por fazer uso na medicina tradicional (*referências dos tópicos 2.2 e 2.3*).

As afirmações para o uso tradicional de *S. mombin* são principalmente para processos infecciosos, inflamatórios e como abortivo (ou estimulante de parto), adicionalmente, nos estudos já realizados na literatura dá-se destaque para a atividade antimicrobiana *in vitro* e o massivo número de estudos de atividade antifertilidade ou abortiva da espécie. Em contrapartida, *S. pinnata* é conhecida por uma utilização na medicina popular mais diversificada, que vai desde tratamento de diarreia e disenteria a uso como antituberculoso; nos estudos *in vitro* onde a maioria investiga o potencial antimicrobiano da espécie, a maior atenção é voltada para um estudo anticancerígeno onde a planta apresentou boa atividade contra as células malignas e não afetou as células saudáveis. O vasto uso de *S. dulcis* na medicina tradicional para tratar infecções de pele, que é visto na maioria das literaturas investigadas sobre etnofarmacologia, o que aumenta a importância desse uso popular e atenta para a necessidade de comprovação de estudos para a espécie, que pode ser promissora em tratamentos de infecções de pele (*referências dos tópicos 2.2 e 2.3*).

Apesar do expressivo uso popular das espécies do gênero *Spondias* para processos inflamatórios, poucos estudos são voltados para esse potencial, havendo relatos apenas para as espécies *S. pinnata* e *S. mombin*, e nenhum para *S. tuberosa*. Esta espécie também apresenta um uso popular diversificado, dentre os quais se destacam os tratamentos inflamatórios e infecciosos com diversas partes da planta. Das três principais espécies, *S. tuberosa* é a que mais carece de estudos farmacológicos pré-clínicos para comprovação das suas propriedades ditas medicinais, tornando a espécie uma planta em potencial para estudos posteriores.

Tendo em vista que um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver e validar um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para avaliar os marcadores do extrato das folhas de *S. tuberosa*, será apresentada uma revisão sobre CLAE.

2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), ou do inglês *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, é uma forma específica de cromatografia em coluna geralmente utilizada na bioquímica e nas análises para separar,

identificar e quantificar os compostos. Na análise de produtos naturais, a CLAE é uma poderosa e versátil técnica cromatográfica de separação que pode ser utilizada para matrizes complexas, tais como os extratos brutos, para detecção seletiva e quantificação ou análise do perfil geral. A metodologia é amplamente difundida e tem sido adaptada a uma gama de produtos naturais (WOLFENDER, 2009; BANSAL, 2010). A CLAE desempenha um papel fundamental como uma técnica analítica para controle de qualidade e padronização de fármacos e fitoterápicos. Sendo assim, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é essencial para a padronização de extratos vegetais, identificação do material vegetal e desenvolvimento de novos medicamentos a base de plantas (MARSTON, 2007; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA, 2010).

A técnica de CLAE é amplamente aplicada em protocolos farmacopeicos oficiais dentro de métodos gerais de análises para avaliar qualitativa e/ou quantitativamente a composição química de grande parte dos produtos das monografias (BRASIL, 2010; USP, 2007; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). Portanto, constitui uma das técnicas utilizadas na identificação de espécies, na mensuração de contaminantes bacteriológicos, na avaliação da potência, e na certificação de análise de matérias-primas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA, 2010).

Entre os métodos químicos usados para avaliação de plantas, a análise cromatográfica desempenha um importantíssimo papel, e tem sido introduzida por todas as farmacopeias modernas. Devido às numerosas vantagens dos métodos cromatográficos (tais como sua especificidade e a possibilidade de utiliza-los em análises sensíveis qualitativas e quantitativas), compreendem uma técnica de suma importância na análise de plantas medicinais, que geralmente constituem amostras complexas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA, 2010).

Nas análises de controle de qualidade de fármacos e fitoterápicos por CLAE os detectores mais frequentemente utilizados são os espectrofotométricos (UV/Vis). Tais detectores são utilizados para detectar compostos com grupamento cromóforo. Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorbância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD), os quais registram os dados de absorbância por toda faixa de espectro do UV selecionada e podem gerar um espectro para cada pico registrado no cromatograma (BRASIL, 2010).

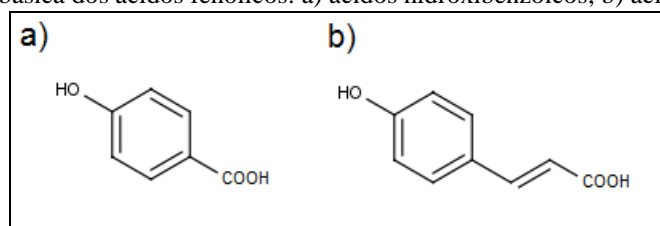
Uma vez que na revisão da literatura foi visto que o gênero *Spondias* apresenta uma grande ocorrência de fenólicos e flavonoides, maiores informações serão dadas sobre essas classes de metabólitos e suas características químicas.

2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de origem natural, caracterizados por ter ao menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas ligados. Eles são amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas. Os fenólicos são geralmente envolvidos na defesa contra a radiação UV ou agressão por patógenos, parasitas e predadores, bem como contribuir para as cores das plantas. Os fenólicos compreendem de compostos aromáticos simples de baixo peso molecular a grandes e complexos taninos e derivados polifenólicos. Eles podem ser classificados pelo número e arranjo dos carbonos e são comumente conjugados a açúcares e ácidos orgânicos (CROZIER et al., 2009; DAI; MUMPER, 2010).

Dentre os principais grupos de fenólicos, destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis, sendo os flavonoides os mais abundantes. Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 4). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C₆-C₁. Enquanto os ácidos hidroxicinâmicos (fenilpropanoides), são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns (ANGELO; JORGE, 2006; DAI; MUMPER, 2010; IBRAHIM; BARRON, 2012; PYRZYNSKA; SENTKOWSKA, 2014).

Figura 4 Estrutura básica dos ácidos fenólicos: a) ácidos hidroxibenzóicos; b) ácidos hidroxicinâmicos

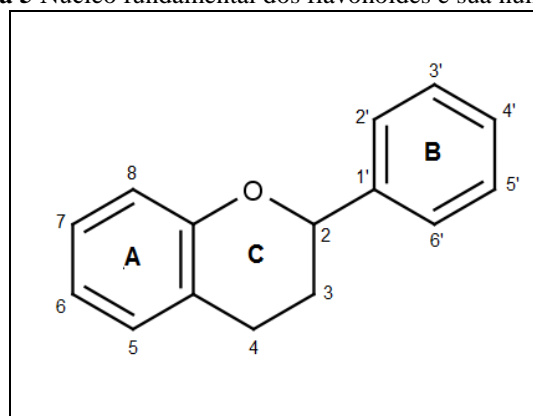


Os fenilpropanoídeos são moléculas precursoras para biossíntese de numerosos polifenóis de origem vegetal (ácidos fenólicos simples, flavonoides, isoflavonoides, estilbenos, cumarinas, curcuminoides, lignanas, etc.). Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a essa classe de metabolitos como antioxidantes, proteção UV, anticancerígeno, antiviral, anti-inflamatório, cicatrizante, e agentes antibacterianos (KORKINA et al., 2011).

2.6.1 Flavonoides

Flavonoides são compostos fenólicos de baixo peso molecular, provenientes do metabolismo secundário das plantas, amplamente distribuídos pelo reino vegetal. Sua estrutura carbônica é caracterizada por um esqueleto $C_6-C_3-C_3$, também conhecido como esqueleto fenilbenzopirano, que é dividido em três anéis denominados A, B e C (Figura 5) (DAIGLE; CONKERTON, 1988; GROTEWOLD, 2006).

Figura 5 Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração

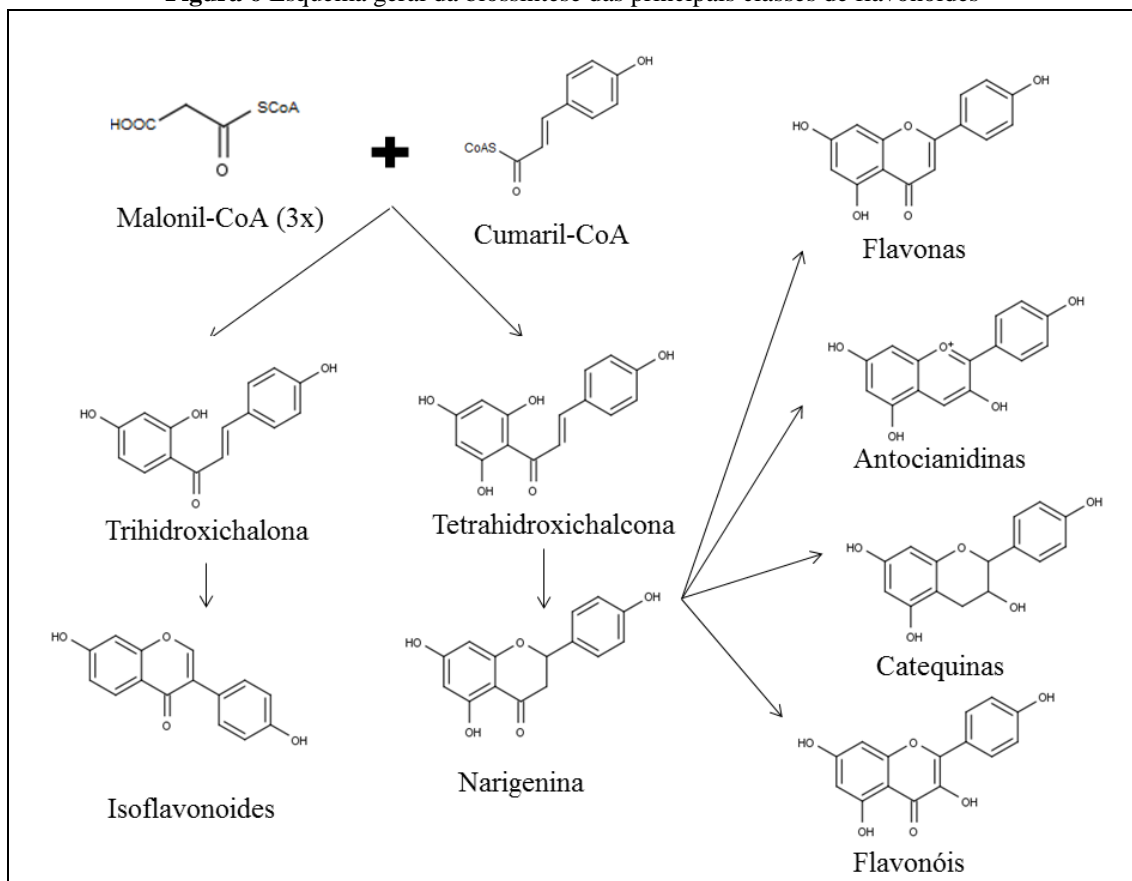


Os flavonoides são onipresentes no reino vegetal e têm diversas funções para as plantas incluindo defesa contra patógenos, proteção UV, controle hormonal, alelopatia e coloração das flores (BUER et al., 2010). Aproximadamente, 15.000 flavonoides diferentes já foram isolados e identificados a partir de fontes vegetais (XIAO et al., 2014).

As classes de flavonoides são produzidas a partir da via do ácido chiquímico e partem de dois precursores comuns que são o 3-malonil-CoA e o 4-cumaril-CoA. Através da trihidroxichalcona é produzida a classe dos isoflavonoides (funções de defesa). A tetrahidroxichalcona é precursora da narigenina, que por sua vez origina as

flavonas (função de defesa), e por meio de hidroxilações a narigenina também origina as antocianidinas (pigmentação para recrutamento de polinizadores), as catequinas e os flavonóis (pigmentação, proteção UV, sinalização) (WINKEL-SHIRLEY, 2002; CELI, 2011). Um esquema geral da biossíntese das principais classes de flavonoides está exposto na Figura 6.

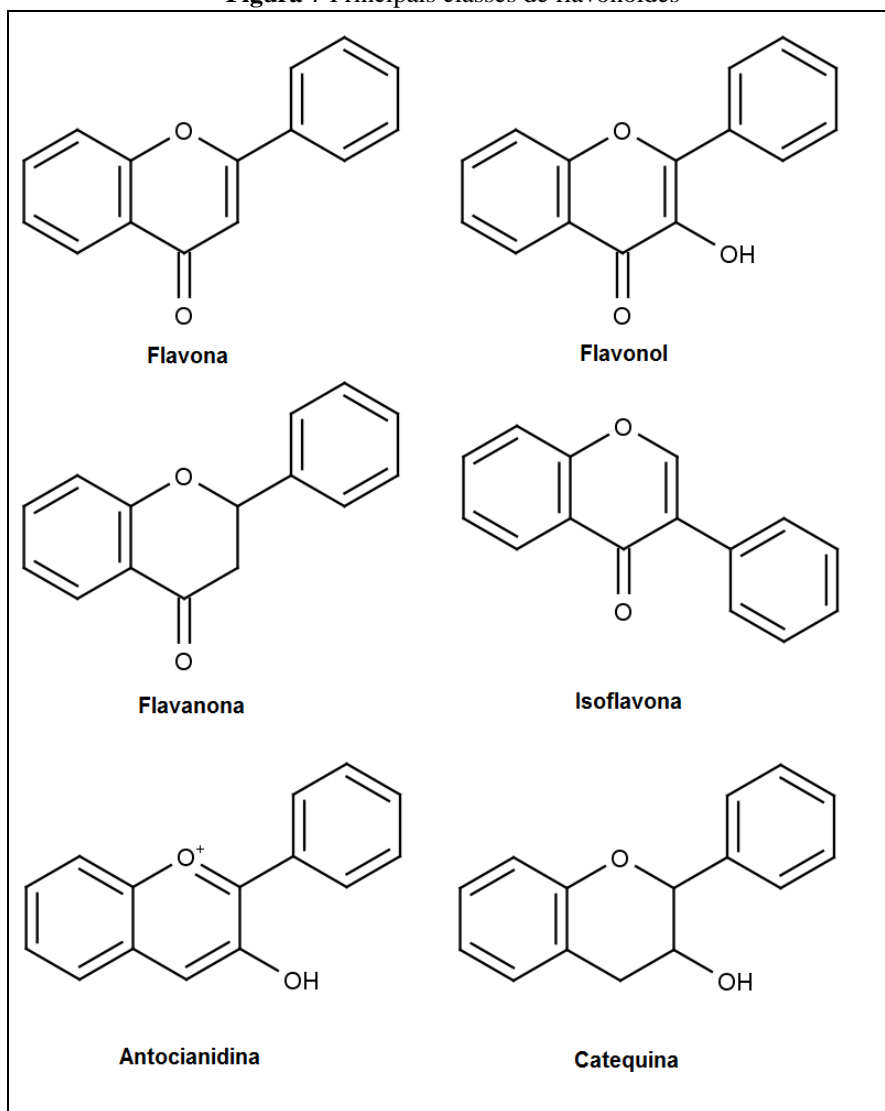
Figura 6 Esquema geral da biossíntese das principais classes de flavonoides



Os flavonoides são divididos em seis classes principais, que são elas: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas e catequinas (Figura 7) que variam a sua estrutura de acordo com características no anel heterocíclico C. Tais metabólitos podem ocorrer naturalmente na forma de aglicona (sem açúcar) ou na forma de glicosídeos (com açúcar ligado). Nos flavonoides glicosilados, a ligação glicosídica pode acontecer por meio do oxigênio, nos chamados *O*-glicosilados, ou por meio de ligação carbono-carbono, nos chamados *C*-glicosilados. Os açúcares frequentemente encontrados são *D*-glicose, *L*-ramnose, glicoramnose, galactose ou arabinose (HAVSTEEN, 1983; BECCHI; FRAISSE, 1989).

O esqueleto básico dos flavonoides pode apresentar numerosos substituintes. Grupos hidroxilas usualmente estão presentes ligados aos carbonos 3', 4', 5 e 7, e menos frequentemente aos carbonos 5', 6 e 8. Os açúcares são muito comuns e frequentemente os flavonoides encontram-se naturalmente na forma de glicosídeos. No caso dos flavonóis as conjugações com açúcares frequentemente ocorrem na posição 3 do anel C, mas também podem ocorrer nos carbonos 5, 7, 4', 3' e 5'. A maioria das flavonas ocorre na forma de 7-*O*-glicosídeo. Os flavonoides também podem apresentar *O*-metilações, e menos frequentemente outros tipos de substituições (HEIM et al., 2002; CROZIER et al., 2009).

Figura 7 Principais classes de flavonoides



Os flavonoides desempenham um importante papel na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Numerosos estudos epidemiológicos tem mostrado uma correlação inversa entre o consumo de flavonoides e a ocorrência de doenças crônicas degenerativas (ZIBERNA et al., 2014). Alguns flavonoides são conhecidos como agentes antidiabéticos, antihiperlipidêmicos e por seu efeito antioxidante (BANSAL et al., 2012; UNNIKRISHNAN et al., 2014). Além disso, já se tem observado sua atuação em diversas outras atividades como atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anticoagulante, antiplaquetária, antitripanossoma, antiviral, imunomoduladora e antituberculose (XIAO et al., 2014).

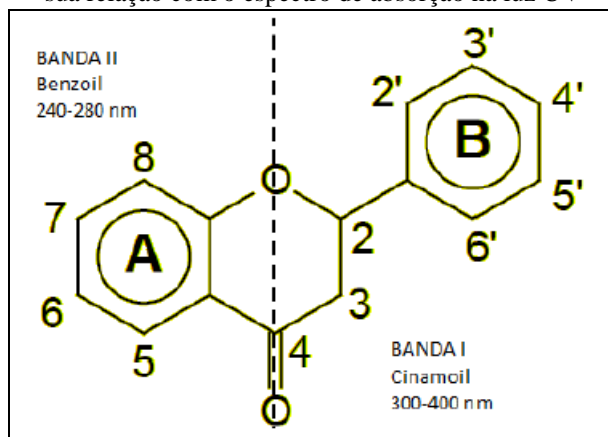
A atividade anti-inflamatória para essa classe de metabólitos tem sido amplamente relatada (IOANNONE et al., 2013; GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 2014). Tal efeito pode ser devido à capacidade de inibir a produção de óxido nítrico, supressão na produção de citocinas, incluindo o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), algumas interleucinas e inibição da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) em processos neuro-inflamatórios (SPENCER et al., 2012). O mecanismo para a atividade anti-inflamatória geral dos flavonoides pode estar ligada a diversos fatores como: a inibição de enzimas geradoras de eicosanóides, incluindo a fosfolipase A2, ciclo-oxigenases e as lipoxigenases, reduzindo a concentração de prostanóides e leucotrienos. Outros mecanismos incluem a inibição da liberação de histamina, da fosfodiesterases e proteínas quinases (RATHE et al., 2009).

Em relação à análise por CLAE de flavonoides, as colunas são quase que exclusivamente de fase reversa (*RP-HPLC*), com extensão de 100 a 300 mm de comprimento e usualmente 4,6 mm de diâmetro interno. Os sistemas de eluição são frequentemente binários com um solvente aquoso polar acidificado (p.e. ácido acético ou fórmico) e um solvente menos polar como metanol e acetonitrila, geralmente em gradiente. O tempo de análise usualmente é cerca de uma hora (dependendo da matriz e da complexidade do extrato) com fluxos de 1,0 ou 1,5 mL/min (MERKEN; BEECHER, 2000).

Na detecção por ultravioleta, os flavonoides apresentam duas bandas de absorção características. A primeira delas, a banda II, encontra-se entre 240 e 280 nm, correspondendo à absorção do grupo benzóila, relacionada ao anel A. A banda I, possui absorção entre 300 e 380 nm, correspondente ao grupo cinamoil e relacionada aos anéis B e C (Figura 8). A análise por UV constitui uma ferramenta muito útil na identificação do núcleo básico dos flavonoides. Usualmente, a banda I também providencia

informações sobre o tipo do flavonoide, ajudando a distinguir entre flavona e flavonol. A banda I das flavonas ocorre no intervalo entre 304-350 nm, enquanto que, a banda I dos flavonóis acontece em comprimento mais longo (352-385 nm). Entretanto, em flavonóis com o grupo 3-OH substituído (metilado ou glicosilado), a banda I (328-357 nm) sobrepõe à região da banda I de flavonas (MABRY et al., 1970).

Figura 8 Esquema da estrutura química dos flavonoides e sua relação com o espectro de absorção na luz UV



Fonte: MABRY et al., 1970

Os flavonoides encontrados no gênero *Spondias* até o momento são do tipo flavonol *O*-glicosilados, geralmente derivados dos núcleos da quercetina, canferol, canferídeo ou ramnetina, ou suas respectivas agliconas (SATPATHY et al., 2011; SILVA et al., 2011; ENGELS, 2012).

2.7 LEGISLAÇÃO SOBRE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda aos estados membros uma prática de políticas nacionais voltadas à integração da medicina tradicional aos sistemas oficiais de saúde, como é o caso do SUS. No Brasil, a implantação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, aprovada em 2006, veio trazer as diretrizes e ações para inserção de serviços e produtos relacionados à medicina tradicional e ao uso de plantas medicinais e fitoterapia. A PNPIC contempla diretrizes para plantas medicinais e fitoterapia no SUS que visa ampliar as opções terapêuticas aos seus usuários com garantia de acesso aos produtos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2012).

Neste sentido, com os avanços da PNPIC foi instituída a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que contemplam o desenvolvimento de toda cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos. Após a aprovação da política nacional, e com vista à implementação das diretrizes desta, foi elaborado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovado em 2008, que em conformidade com as diretrizes da política nacional visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2012).

A partir dessas políticas públicas foram publicadas e/ou reformuladas várias relações de plantas com importância na rede de assistência à saúde, uma delas é a RENISUS (Relação de Plantas Medicinais de interesse ao SUS) que desde 2009 contempla 71 espécies vegetais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2009).

Para a obtenção de registro dos medicamentos provenientes de plantas medicinais que são comercializados no país, existe uma legislação que orienta e regulamenta essa classe. Tal legislação é a RDC 26, de 13 de maio de 2014 da ANVISA, que dispõe sobre medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos no Brasil. Ela regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). Nesta norma quando tratam de fitoterápicos, referem-se tanto ao Medicamento Fitoterápico (MF) quanto ao Produto Tradicional Fitoterápico (PTF) (BRASIL, 2014a).

Por conseguinte, é considerado Medicamento fitoterápico (MF) aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Enquanto que, Produtos tradicionais fitoterápicos (PTF) são os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. A principal diferença entre essas duas classes é que o MF comprova sua segurança e eficácia por meio de estudos clínicos, enquanto o PTF comprova a segurança e efetividade pela demonstração do tempo de uso na literatura técnico-científica (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014b).

Para critério de controle de qualidade desses produtos, é necessário que os mesmos apresentem parâmetros que comprovem sua autenticidade, um desses parâmetros é a presença de um marcador. Sendo o marcador definido como “substância ou classe de substâncias (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo” (BRASIL, 2014a).

Um dos requisitos para registro de medicamento fitoterápico é o relatório de controle de qualidade no qual deve-se apresentar os constituintes químicos tidos considerados como marcadores químicos para a espécie através de metodologia analítica validada de acordo com o Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, publicado pela Anvisa na RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2014a).

O objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado para a sua finalidade (ICH, 2005), sendo o método de validação uma das medidas universalmente reconhecidas como uma parte necessária de um sistema completo de garantia de qualidade (IUPAC, 2002).

A RE nº 899, de 29 de maio de 2003 determina o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” que regulamenta e direciona o processo de validação analítica, inclusive de fitoterápicos. Uma das técnicas a qual se aplica essa resolução é a CLAE para testes quantitativos para a determinação do teor de princípio (s) ativo (s) em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Segundo a legislação, os parâmetros que devem ser avaliados são especificidade, linearidade, intervalo, precisão repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003). Tais parâmetros serão mais bem detalhados no próximo tópico.

Dentro desse contexto, torna-se claro a necessidade de estimular a realização de estudos científicos que auxiliem no controle de qualidade de matérias-primas vegetais, extratos e produtos acabados, para garantir o uso seguro dos produtos de origem vegetal. Sendo assim, esse trabalho visa contribuir na identificação de marcadores para o extrato das folhas de *S. tuberosa*, uma vez que a espécie carece deste tipo de estudo. Somado a isso, tem-se a difícil identificação das espécies do gênero *Spondias* pela semelhança morfológica.

Para critério de controle de qualidade de derivados da espécie vegetal, faz-se necessário um breve esclarecimento sobre o processo de validação de metodologia analítica, que será realizado a fim de se obter uma metodologia analítica reprodutível e com resultados confiáveis.

2.8 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO E ADEQUABILIDADE DO SISTEMA

2.8.1 Parâmetros de Validação

Os parâmetros para validação foram selecionados de acordo com os preconizados pela legislação brasileira, através da RDC 899, de 2003. Segundo a legislação, os parâmetros que devem ser avaliados para categoria I (testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas) são seletividade (especificidade), linearidade, intervalo, precisão, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez (BRASIL, 2003). Além desses também foram avaliados os limites de detecção e limites de quantificação.

Seletividade

A seletividade (também conhecida por especificidade) é a capacidade do método em determinar exatamente um analito em detrimento de outras substâncias interferentes (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2004).

A especificidade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Uma maneira de avaliar a especificidade é através da avaliação com detectores como o de arranjo de diodos, onde o pico é dividido em três partes iguais e essas partes têm que apresentar os mesmo espectros de absorção, sendo assim o pico considerado puro (RIBANI et al., 2004; USP, 2008).

Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é sua capacidade de apresentar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004; USP, 2008).

A relação de linearidade pode ser obtida pela utilização de um intervalo de concentração preparada pela diluição de uma solução estoque do padrão analítico. Os

resultados obtidos na análise cromatográfica, frequentemente a área do pico ou sua altura, através de métodos estatísticos apropriados, tem de apresentar uma relação linear com as concentrações utilizadas. Os intervalos de concentrações utilizados podem ser de 50-150% da concentração provável a ser encontrada. São recomendadas cinco concentrações diferentes, injetadas no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD) entre as injeções até 5% (IUPAC, 2002; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005).

Intervalo

O intervalo (ou intervalo de confiança) é a variação na concentração que pode ser aplicada ao analito em que se consigam resultados considerados adequados. É estabelecido pelos limites de quantificação superior e inferior (LANÇAS, 2004; ICH, 2005).

É estabelecido pela confirmação de que o intervalo fornece um grau aceitável de linearidade, exatidão e precisão quando aplicado a amostras contendo quantidades do analito dentro ou nos extremos da faixa especificada do procedimento analítico (RIBANI et al., 2004; ICH, 2005).

Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de proximidade entre uma série de resultados obtido de análises repetidas de uma mesma amostra (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A precisão pode ser considerada em vários níveis, os que foram avaliados nesse trabalho foram a precisão por repetibilidade e a precisão intermediária:

Precisão por repetibilidade (intra-corrída ou intra-dia): é a precisão obtida utilizando as mesmas condições de medição em repetições da análise feitas em um curto intervalo de tempo (mesmo dia) e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). É recomendado que se utilize três níveis de concentração em triplicata (RIBANI et al., 2004; ICH, 2005);

Precisão intermediária (inter-corrída ou inter-dia): é a precisão que indica o efeito de variações no mesmo laboratório, obtida por meio de análises realizadas em dias diferentes, analistas diferentes ou equipamentos diferentes. Pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (RSD) (LANÇAS, 2004; RIBANI et a., 2004).

Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) indica a menor concentração do analito que pode ser detectada, a qual não precisa necessariamente ser quantificada (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2004; ICH, 2005).

Existem diversas abordagens para determinar o limite de detecção, uma delas é baseada na relação sinal-ruído, onde é encontrada a concentração mínima do analito que apresenta uma relação com o sinal do ruído da linha de base de 3:1 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) representa a concentração mínima do analito que pode ser determinada com precisão aceitável entre as análises (IUPAC, 2002; RIBANI et al., 2004).

É determinado através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível que apresente precisão aceitável. Ele pode ser determinado pelo desvio padrão relativo da triplicata da concentração analisada (BRASIL, 2003; IUPAC, 2002).

Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos valores obtidos nas análises com o valor tido como real ou valor de referência (LANÇAS, 2004; ICH, 2005).

Existem várias metodologias para determinação da exatidão, uma delas é o ensaio de recuperação (RIBANI et al., 2004). O ensaio pode ser feito por fortificação, onde um padrão de referência que se deseja avaliar é adicionado a matriz contendo o analito, a recuperação é medida como o resultado obtido na fortificação dividido pelas somas das análises individuais do padrão e da matriz, os valores são expressos em porcentagem. Recomenda-se uma recuperação que esteja dentro do intervalo de 80-120% (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004).

Robustez

Robustez é a capacidade do método em resistir a variações dos parâmetros analíticos sem que haja alterações significativas nos resultados obtidos (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2004).

A robustez de um método é testada pela introdução deliberada de pequenas mudanças no procedimento e examinada o efeito dessas mudanças nos resultados. Exemplos de parâmetros que podem ser alterados são o instrumento, o operador, a marca do reagente, pH do solvente, temperatura, etc. (IUPAC, 2002; BRASIL, 2003).

2.8.2 Parâmetros de Adequabilidade (*System Suitability*)

A adequação do sistema visa verificar a validação do instrumento e da metodologia analítica simultaneamente. A adequação do sistema é estabelecida para garantir que a validade do procedimento analítico é mantida sempre que utilizada. Ela é importante especialmente no caso de procedimentos cromatográficos. Os parâmetros frequentemente avaliados são resolução, eficiência e assimetria, sendo todos calculados para cada pico do cromatograma analisado. Tipicamente pelo menos dois critérios de adequação são requeridos para garantir a conformidade do sistema (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004; USP, 2008).

A resolução determina o poder de separação entre dois analitos (dois picos próximos), a qual deve apresentar valor acima de 2. Já a eficiência, que é medida à partir do número de pratos teóricos, indica a eficiência do sistema, ela depende diretamente da largura do pico e seu valor, sendo uma eficiência adequada aquela com número de pratos teóricos acima de 2000. Por último, a assimetria (ou fator de cauda) é ocasionada pelo aparecimento de caudas no pico devido adsorção do analito na coluna, é recomendado que seu valor não exceda 2 (LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

A seguir será apresentada uma revisão sobre inflamação, tendo em vista, que neste estudo, foi avaliado o efeito anti-inflamatório *in vivo* do extrato das folhas de *S. mombin*.

2.9 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta do tecido a um agente infeccioso, a um antígeno ou mesmo a um estímulo irritante de natureza física, química ou traumática. Essa resposta visa eliminar tanto a causa inicial da lesão celular, bem como as células necróticas e tecidos resultantes do estímulo inicial. A resposta se manifesta com o aparecimento de rubor (eritema), calor (na região inflamada), tumor (formação de edema), dor e perda da função do tecido ou órgão afetado. A inflamação é um processo que protege o indivíduo

e é vital para a saúde, mas quando a inflamação aguda sofre um descontrole na sua amplitude ou duração, pode acarretar diversas doenças (LAPA et al., 2008; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ, 2012; LEVY; SERHAN, 2014).

Entre os primeiros eventos de sinalização após a infecção microbiana ou lesão tecidual, é a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como leucotrienos e prostaglandinas que lançam uma série de cascatas de sinalização com o objetivo final de destruir os patógenos invasores e reparar o tecido danificado. Assim, a biossíntese e liberação de potentes agentes quimiotáticos, como alguns leucotrienos, promove o recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado, enquanto que a formação de prostaglandinas E₂ e D₂ acelera ainda mais o processo inflamatório, resultando finalmente em condições de inflamação aguda (SERHAN; PETASIS, 2011).

No processo inflamatório há um aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação induzida pela ação de vários mediadores, principalmente a histamina e o óxido nítrico, que visa à passagem de células e proteínas plasmáticas circulantes para dentro do local da infecção ou injúria, dando assim a formação do exsudato. Através do aumento da permeabilidade e de processos quimiotáticos, leucócitos são recrutados para o local da injúria. Os leucócitos mais importantes nesse processo são aqueles capazes de fagocitar, que são os neutrófilos e macrófagos (KUMAR, 2011).

Quando o processo de inflamação não cede e não consegue debelar o agente inflamógeno a resposta pode causar mudanças traumáticas na fisiologia do hospedeiro, como problemas no tecido atingido e o surgimento de outras doenças (FOSTER; RUSLAN, 2009).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas possuem uma variedade de atividades biológicas, dentre elas, destaca-se a atividade anti-inflamatória (YAM et al., 2008). Os flavonoides, conforme descrito no item 2.6.1, são conhecidos por exibirem uma atividade anti-inflamatória importante. Já tem sido demonstrado que os flavonoides são capazes de inibir a expressão das enzimas óxido nítrico-sintase induzida, cicloxigenase e lipoxigenase, que são responsáveis pela produção exacerbada de óxido nítrico, prostanoídes e leucotrienos, assim como outros mediadores do processo inflamatório tais como citocinas, quimiocinas ou moléculas de adesão durante o processo inflamatório (TUNON et al., 2009).

A espécie objeto deste estudo, *Spondias tuberosa*, tem sido amplamente utilizada na medicina popular para tratar diversos processos inflamatórios, conforme

descrito anteriormente, no entanto, não existem estudos científicos que embasem essa utilização. Diante disso, justifica-se avaliar o efeito anti-inflamatório da espécie.

2.9.1 Modelos de inflamação

Para avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizados os modelos de inflamação de edema de pata induzido por carragenina e peritonite induzido por carragenina, sendo ambos modelos *in vivo*.

2.9.1.1 Edema de pata induzido por carragenina

Entre os vários modelos anti-inflamatórios para avaliação de novos agentes, destaca-se o modelo de edema de pata, que consiste na capacidade deste inibir o edema produzido na pata posterior de roedores, induzido pela administração de um agente flogístico (WINTER, 1962; VINEGAR et al., 1969).

Dentre os agentes flogísticos utilizados nesse modelo, destaca-se a carragenina, um grupo complexo de polissacáridos constituídos de unidades de *D*-galactose ligadas alternadamente, que pode ser apontada como o agente flogístico mais comumente utilizado neste modelo (VINEGAR et al., 1969; SILVA et al., 2010; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013)

O edema de pata induzido por carragenina é um teste amplamente utilizado para determinar a atividade anti-inflamatória e constitui um modelo animal simples e de rotina para avaliação do edema no local da inflamação sem qualquer prejuízo ou dano à pata inflamada. A resposta inflamatória é normalmente quantificada pelo aumento no tamanho da pata (edema pós-injeção de carragenina), que é modulado por inibidores de moléculas específicas dentro da cascata inflamatória (SILVA et al., 2010; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Neste modelo, os animais (geralmente ratos ou camundongos) recebem a administração da amostra em teste em uma suspensão aquosa, que pode ser por via oral por meio de gavagem ou por via intraperitoneal. Os animais do grupo controle negativo recebem apenas o veículo, enquanto que o grupo controle positivo recebe uma dose de um fármaco anti-inflamatório padrão (p.e. dexametasona ou indometacina). Este tratamento com a amostra ou controle negativo ou fármaco ocorre em média 1 h antes do tratamento intraplantar com o agente flogístico. O inchaço é mensurado a cada hora

geralmente durante 3 a 5 h (WINTER, 1962; BRADLEY et al., 1982; POSADAS et al., 2004; FÉLIX-SILVA et al., 2014).

2.9.1.2 Peritonite induzida por carragenina

O modelo de peritonite induzida por carragenina também foi realizado, em vista a corroborar com o ensaio do edema de pata, para avaliação da atividade anti-inflamatória.

A peritonite induzida por carragenina é um modelo bem conhecido e comumente utilizado para a investigação de um processo inflamatório agudo que conduz à avaliação dos níveis de migração de leucócitos para o local da inflamação por meio da contagem do número total de células que atingiram a cavidade peritoneal, durante o processo de inflamação aguda. O mecanismo de ação pelo qual a carragenina induz o processo inflamatório é um sinergismo entre os vários mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros agentes quimiotáticos (HASSIMOTTO et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013).

Neste modelo, os animais recebem o tratamento com o veículo, ou com fármaco anti-inflamatório padrão ou com a amostra em teste. Após um período de 30 min os animais recebem a administração do agente inflamógeno na cavidade peritoneal, para indução do processo inflamatório agudo. Após 4 h os animais são sacrificados e a cavidade peritoneal é lavada com solução salina e em seguida o lavado é coletado. Por último, as células do lavado são contadas em câmara de Neubauer em microscópio (BARROS et al., 2004; CARVALHO et al., 2013; PAIVA et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os marcadores e investigar o potencial anti-inflamatório do extrato das folhas de *Spondias tuberosa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os marcadores no extrato de *Spondias tuberosa*;
- Desenvolver um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector com Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) para qualificar e quantificar os marcadores de *S. tuberosa*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* nos modelos de peritonite e de edema de pata induzidos por carragenina.

4 METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado no município de Boa Saúde, município do Rio Grande do Norte, Brasil, sob as coordenadas 06 ° 06 '00' 'S 35 ° 32' 54 " W, em janeiro de 2013.

A espécie foi identificada pelo botânico Alan de Araújo Roque e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, sob o número de depósito UFRN 18154. A coleta do material vegetal foi realizado com a autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio)/Ministério do Meio Ambiente (35017).

As folhas foram secas a temperatura ambiente por 7 dias e, em seguida, trituradas em um moinho de facas.

4.2 EXTRAÇÃO

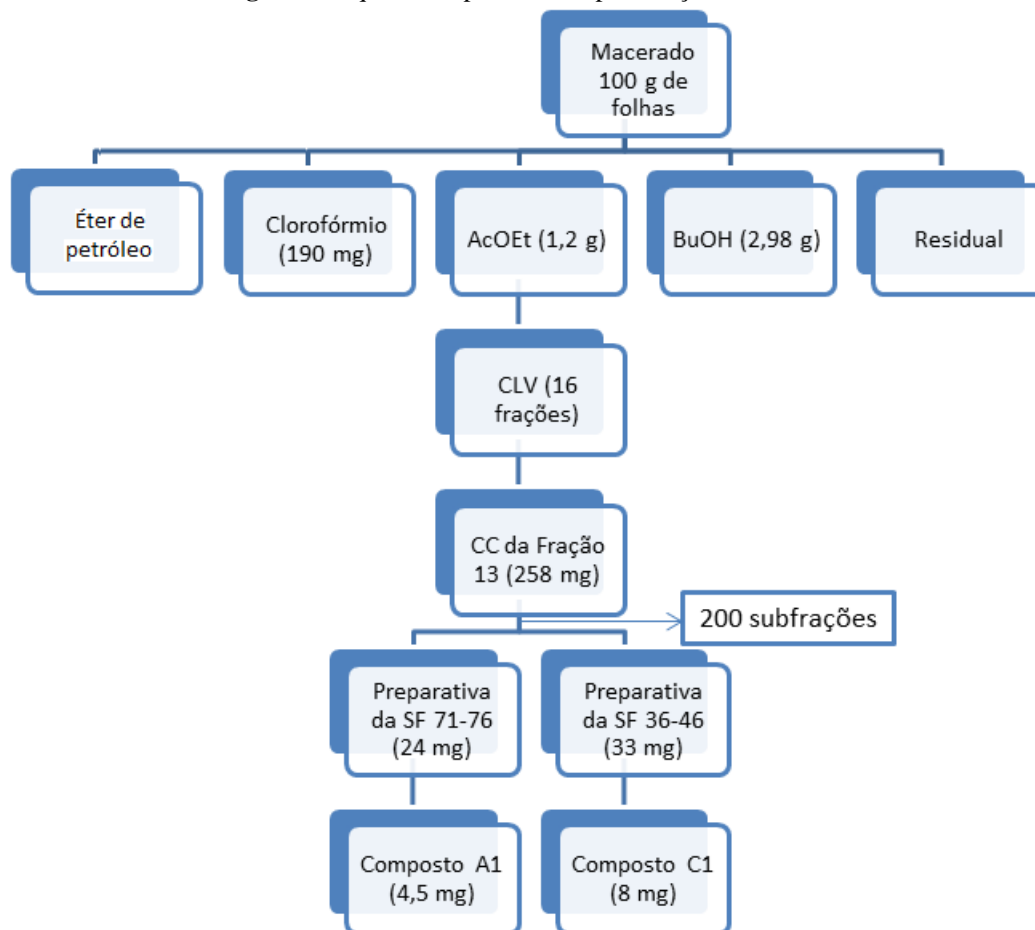
O extrato hidroetanólico das folhas de *S. tuberosa* (EH) foi preparado pela maceração em etanol: água (70:30, v/v), durante sete dias, à temperatura ambiente. Depois disso, o EH foi concentrado sob pressão reduzida com auxílio de um evaporador rotatório à temperatura de 45° C para eliminação do solvente orgânico. Parte do extrato foi liofilizada para a realização dos testes analíticos e atividade farmacológica. Para os ensaios farmacológicos, o extrato foi dissolvido em Cremophor[®] a 5% em PBS.

4.3 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO

Para a caracterização dos compostos ativos, parte do EH de *S. tuberosa* (500 mL) foi submetida à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente éter de petróleo (Éter) (3×300 mL), clorofórmio (CHCl₃) (3×300 mL), acetato de etila (AcOEt) (3× 300 mL) e *n*-butanol (BuOH) (3× 300 mL). Após a partição foram obtidas cinco frações: éter de petróleo, CHCl₃, AcOEt, BuOH e fração aquosa residual (Res). As frações foram concentradas com o auxílio de um evaporador rotatório sob temperatura de 45°C até a eliminação total do solvente orgânico.

A fração acetato de etila (1,24 g) foi submetida a uma cromatografia líquida a vácuo (CLV), com um gradiente de solventes com polaridade crescente, na qual foram obtidas 16 sub-frações. Posteriormente, a sub-fração de maior rendimento (SF 13= 258 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica clássica (CC). A partir dessa CC foram obtidas 200 sub-frações, das quais foram reunidas de acordo com a semelhança no perfil químico analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A sub-fração 71-76 foi submetida a uma CCD preparativa, na qual se obteve um composto isolado denominado A1 (4,5 mg). Já a partir da sub-fração da 36-43 foi obtido por meio de CCD preparativa outro composto isolado, denominado C1 (4 mg). A1 e C1 foram analisados por CLAE para identificação dos picos do extrato referente a cada composto e obtenção do espectro de UV. A Figura 9 resume o processo de purificação.

Figura 9 Esquema do processo de purificação de A1 e C1



CLV: Cromatografia Líquida à Vácuo; CC: Cromatografia Clássica; SF: subfração

4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O EH e as frações (Éter de petróleo, CHCl₃, AcOEt, BuOH e Res) de *S. tuberosa* foram analisados preliminarmente por CCD, para identificar as classes de metabólitos secundários presentes. Foi utilizada como fase estacionária, cromatoplasca de alumínio de sílica gel 60 GF254. As fases móveis utilizadas foram tolueno:AcOEt:AcForm (5:5:0,5); AcOEt:AcForm:H₂O:MeOH (10:0,5:0,6:0,2); e BuOH:AcOEt:AcForm (3:3:1), de acordo com os metabólitos de interesse, desenvolvidas a partir da literatura (WAGNER; BLADT, 2001). Os reveladores utilizados foram: vanilina sulfúrica, cloreto férrico e o Reagente Natural A (difetilboriloxietilamina 0,5% em metanol). Os cromatogramas foram visualizados sob luz UV 254 e 365 nm.

Na análise por CCD foram utilizados os seguintes padrões Sigma-Aldrich ou Hee Analytik GmbH[®]: luteolina, quercetina, diosmetina, apigenina, canferol, crisina, luteolina-7-*O*-glicosídeo, isoramnetina, orientina, isoorientina, isoquercitrina, isoquercetina, vitexina, isovitexina, rutina, vitexina-2-*O*-rhamnosídeo e vitexina-4''-*O*-glicosídeo; e os compostos swertisina, vicentina-2 e 6,8-di-*C*-glicosilcrisina, isolados de espécies vegetais e identificados por técnicas espectroscópicas de UV e RMN.

Os compostos do extrato que apresentaram *Fator de Retenção* e coloração semelhante a algum padrão foram posteriormente analisados por CLAE.

4.6 ANÁLISE DO EXTRATO DE *S. tuberosa* POR CLAE

As análises por CLAE do EH de *S. tuberosa* foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar (LabMult) da UFRN. O cromatógrafo utilizado foi da marca Varian Pro Star, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), uma bomba quaternária e um amostrador automático. Todos os dados de HPLC foram processadas utilizando o software Chromatography Galaxie[™].

Os padrões analíticos utilizados para essa etapa foram ácido clorogênico, ácido caféico e rutina, adquiridos da Sigma-Aldrich ($\geq 98,0\%$) e isoquercitrina da Hee Analytik GmbH[®] (94,16%). Os solventes utilizados nas análises são grau HPLC e a água foi purificada com um sistema Milli-Q (UV directa 3). Todas as soluções preparadas para a análise por CLAE foram filtrados através de uma membrana de nylon de 0,45 μm e degaseificadas antes da utilização.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa (PHENOMENEX[®]) Luna C-18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). Após o desenvolvimento de um método analítico chegou-se às seguintes condições cromatográficas: um sistema de eluição com acetonitrila a 100% (solvente A) e ácido acético 0,3%, ajustado a pH 3,0 (solvente B) e o gradiente utilizado foi: 0-5 min, uma eluição isocrática com A: B (13:87 v/v); 5-40 min, variação linear até A: B (18:82 v/v); 40-45 min, uma variação linear até A:B (19:81 v/v); 45-55 min, uma variação linear até A:B (23:77 v/v). O fluxo da fase móvel foi mantido constante a 1,0 mL/min, e os cromatogramas foram registados a 340 nm, enquanto os espectros de UV foram monitorizados num comprimento de onda de 200-450 nm. Os picos foram caracterizados por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de UV com os padrões de referência e por um co-injecção (extrato + padrão de referência). A curva de calibração foi feita com soluções dos padrões de referência preparadas em metanol:H₂O (3:2, v/v), em diferentes concentrações: rutina – 100; 150; 200; 250 e 300 µg/ml; isoquercitrina - 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 µg/mL; ácido caféico - 1,7; 2,6; 3,5; 4,4; 5,2 µg/mL; ácido clorogênico - 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 µg/mL. O EH das folhas de *S. tuberosa* foi analisado na concentração de 3 mg/mL. As amostras foram analisadas em triplicata e as médias das áreas dos picos mensuradas.

4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação dos procedimentos analíticos foi efetuada baseada na RE N° 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003). Os parâmetros validados foram especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD) e robustez.

Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas dos padrões rutina, ácido clorogênico, ácido caféico e isoquercitrina, contendo cinco concentrações diferentes de cada padrão. Cada solução foi analisada em triplicata. As médias das áreas obtidas através da análise das soluções foram utilizadas para a construção da curva analítica. As concentrações utilizadas foram de 50, 75, 100, 125 e 150% das concentrações teóricas do analito na análise do extrato. Para isso, foi

preparada uma solução-mãe na maior concentração, da qual foram retiradas alíquotas para que fosse feita uma diluição seriada das demais concentrações do analito.

Seletividade

A seletividade foi determinada através da análise da pureza dos picos cromatográficos. Para a sua determinação, foi utilizado o detector de arranjo de diodo para demonstrar que o pico cromatográfico analisado correspondia apenas a um só composto. Para isso, foi utilizada a análise da pureza do pico através da varredura na região do ultravioleta e da comparação dos espectros com padrões de referência, sendo considerado puro o pico em que o espectro não variasse na sua extensão.

Precisão

A precisão foi determinada através dos ensaios de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para a determinação da repetibilidade foram utilizadas três concentrações diferentes de soluções padrões. A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso pelo coeficiente de variação (CV). O ensaio de precisão inter-dia foi determinado também por meio da análise de três concentrações diferentes em triplicata, nas concentrações mais baixas, médias e mais altas, em três dias diferentes intercalados. As diluições foram preparadas a partir de uma solução-mãe com a maior concentração do analito, da qual foram retiradas alíquotas para que fosse feita uma diluição seriada das demais concentrações. Na precisão intra-dia foram feitas análises em triplicata da mesma amostra, enquanto que, na precisão inter-dia foram diluídas novas amostras a partir de uma solução-mãe. Valores de $CV \leq 5\%$ foram considerados satisfatórios.

Exatidão

A exatidão do método foi determinada através dos ensaios de recuperação avaliando as concentrações da amostra e soluções padrão, bem como os valores médios de recuperação. A recuperação foi feita por meio de padrão interno, onde se analisou em triplicatas, primeiramente o extrato, em seguida o padrão e por último o extrato fortificado com o padrão (co-injeção). Com os valores médios das áreas dessas análises calculou-se a recuperação pela razão entre a co-injeção e a soma dos valores das análises do extrato e do padrão separadamente multiplicado por 100%. Valores de exatidão entre 80 e 120% foram considerados satisfatórios.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi calculado pelo o método da relação sinal-ruído. Para a determinação da relação sinal-ruído, foi feita a comparação entre as medições dos sinais dos padrões de referência em baixas concentrações, com áreas dos ruídos do extrato. Assim, o limite de detecção foi a menor concentração do padrão que apresentou uma relação sinal:ruído de 3:1.

O limite de quantificação foi determinado por meio do coeficiente de variação, em que a concentração da amostra foi reduzida até chegar a um coeficiente de variação que não ultrapassasse uma variação de 5%.

Robustez

Para avaliar a robustez foram alteradas a temperatura de análise e a coluna cromatográfica para avaliar se o resultado das análises sofria influencia desses parâmetros.

4.8 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.8.1 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

Os ensaios para avaliação da atividade anti-inflamatória foram realizados com o extrato hidroetanólico das folhas de *S. tuberosa* (EH). A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa e da doutoranda Juliana Félix da Silva, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (TecBioFar) da UFRN.

4.8.1.1 Animais

Para o experimento foram utilizados camundongos albinos *Swiss* (*Mus musculus*) (30-35 g, 6-8 semanas de idade), de ambos os sexos, obtidos do biotério da Faculdade de Farmácia-UFRN, os quais foram mantidos em condições ambientais normais e alimentados com comida e água *ad libitum*. Foram utilizados cinco animais por grupo, e o grupo controle recebeu apenas o veículo do extrato. Todos os procedimentos que necessitam de animais foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais e internacionais de cuidados com animais e foram aprovados pelo Comitê

de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo n°. 013/2013). No dia do experimento, os animais foram colocados na sala experimental durante pelo menos uma hora antes dos testes para aclimatação. No final dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de tiopental sódico por via intraperitoneal (i.p.).

4.8.1.2 Edema de pata induzido por carragenina

O edema foi induzido na pata traseira direita dos camundongos, tal como anteriormente descrito na literatura, com algumas modificações (ALBANO et al., 2013; POSADAS et al., 2004). Grupos de cinco animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com o Cremophor[®] EL a 5% em PBS (veículo do extrato, controle), dexametasona 2 mg/kg (fármaco anti-inflamatório padrão, dissolvido em PBS) ou diferentes doses do extrato de *S. tuberosa* (125, 250 e 500 mg/kg, dissolvido em Cremophor EL a 5% em PBS). Após 60 min, os animais receberam uma injeção sub-plantar (s.pl.) de λ -carragenina (500 μ g/pata, em 50 μ L de PBS) na pata traseira direita. A espessura da pata traseira direita de cada animal foi posteriormente mensurada a 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção com um paquímetro digital (Digimess, São Paulo, SP, Brasil). O edema foi expresso como a percentagem da diferença entre a espessura da pata após (nos respectivos tempos) e antes (valores basais) a injeção de carragenina.

4.8.1.3 Determinação dos níveis enzimáticos de mieloperoxidase (MPO)

No fim do experimento de edema de pata induzido por carragenina, os animais foram sacrificados e as patas traseiras direitas foram retiradas e analisadas para a atividade mieloperoxidase (MPO), tal como anteriormente descrito na literatura, com algumas modificações (POSADAS et al., 2004; BRADLEY et al., 1982; FÉLIX-SILVA et al., 2014). Os tecidos das patas foram homogeneizados em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% (1 mL de tampão para cada 50 mg de tecido), sonicadas em banho de gelo durante 3 min, submetidos a três ciclos de congelamento-descongelamento e finalmente submetidos a ultrassom durante 3 minutos mais uma vez, para a extração enzimática de MPO. 20 μ l do sobrenadante obtido após centrifugação a 10.000 g durante 10 min a 4° C foi misturado com 50 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 0,0005% de peróxido de hidrogênio e 0,167 mg/mL de o-Dianisidina. A

atividade MPO foi determinada colorimetricamente usando um leitor de microplacas (Biotek-Epoch, Winooski, VT, EUA), analisando mudanças na absorvância a 460 nm, durante 3 min. As patas traseiras esquerdas (que não receberam nenhum tratamento) do grupo controle foram utilizadas como controle (valores basais). Uma unidade de atividade de MPO foi definida como aquela que degrada um micromol de peróxido de hidrogênio por minuto, considerando que uma micromol de peróxido de hidrogênio altere na absorvância de $1,13 \times 10^2$ (alteração na absorvância por minuto) (POSADAS et al., 2004). Os resultados foram expressos como unidades por grama de tecido da pata (UMPO/g).

4.8.1.4 Peritonite induzida por carragenina

A migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (peritonite), em resposta a carragenina foi induzida nos camundongos como previamente descrito na literatura, com algumas modificações (CARVALHO et al., 2013; PAIVA et al., 2013). Grupos de cinco animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com Cremophor[®] EL a 5% em PBS (veículo do extrato, controle), dexametasona 2 mg/kg (fármaco anti-inflamatório padrão, dissolvido em PBS) ou diferentes doses de extrato de *S. tuberosa* (125, 250 e 500 mg/kg, dissolvidos em Cremophor EL a 5% em PBS). Após 60 min, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de λ -carragenina (1000 μ g/cavidade, em 500 μ L de PBS). Outro grupo recebeu um volume igual de PBS estéril 60 min após o tratamento com o veículo do extrato (controle negativo). Após 4 h, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS resfriado. O fluido peritoneal recuperado foi centrifugado a 392 g durante 5 min e o sedimento celular foi ressuspenso em 500 μ L de PBS frio. O número total de células foi determinado na câmara de Neubauer, sob microscopia óptica, após coloração com solução de Turk. Os resultados foram expressos em número de leucócitos/ml.

4.8.1.5 Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). ANOVA *One-way* seguido pelo teste posterior de Tukey ou ANOVA *Two-way* seguido pelo teste de Bonferroni foram realizadas, quando apropriado, utilizando o

software Graphpad Prism versão 5.00 (San Diego, CA, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

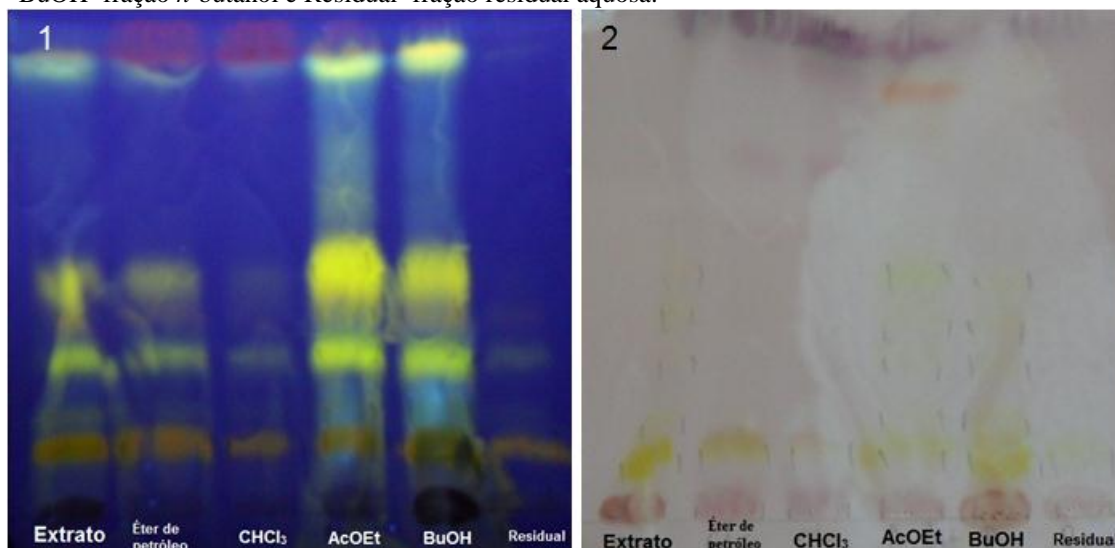
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FITOQUÍMICAS

Na análise cromatográfica por CCD do extrato e das frações foi observada a presença de bandas de coloração amarela (R_f 0,3 e 0,5) desenvolvidas após revelação com Vanilina Sulfúrica (Figura 10b). Essas mesmas bandas foram reveladas com Reagente Natural A e apresentaram coloração amarelo fluorescente/UV 365 nm (reagente específico para flavonoides) (figura 10a). Também foram vistas, em menor extensão bandas de coloração azul brilhante, provavelmente referente à presença de ácidos fenólicos (Figura 10a) (WAGNER; BLADT, 2001). Como pode ser observado, as frações acetato de etila e butanólica apresentaram-se mais enriquecidas em flavonoides.

Figura 10 Cromatografia em Camada Delgada do extrato e frações de *S. tuberosa*. Extrato=Extrato hidroetanólico, Fração Éter de petróleo, CHCl_3 =Fração clorofórmio, AcOEt= fração acetato de etila, BuOH=fração *n*-butanol e Residual=fração residual aquosa.



Fase móvel: AcOEt:Acido Formico:H₂O:MeOH (10:0,5:0,6:0,2; v/v/v);

Adorvente: Gel de sílica 60 F 254

Reveladores: a- Reagente Natural A; b- Vanilina Sulfúrica

Por meio da análise comparativa por CCD com os padrões, foram observados no EH de *S. tuberosa* duas bandas no extrato com R_f e cor semelhante, a rutina ($R_f=0,1$; laranja) e a isoquercitrina ($R_f=0,4$; laranja-claro), posteriormente analisados por CLAE. De acordo com a revisão da literatura (SATPATHY et al., 2011; SILVA et al., 2011) e pela análise preliminar do extrato por CCD foi visto que derivados de ácidos fenólicos também poderiam estar presente no extrato.

Após sucessivas alterações nos parâmetros cromatográficos, o método desenvolvido foi considerado adequado para a análise qualitativa e quantitativa do extrato de *S. tuberosa*.

No cromatograma obtido do extrato de *S. tuberosa* por CLAE foi observado pela análise dos espectros de UV dos picos, a presença de derivados fenólicos e flavonoídicos. A análise qualitativa do extrato permitiu indicar a ocorrência de ácido clorogênico, ácido caféico, rutina e isoquercitrina, através da análise do tempo de retenção (Tabela 6), os espectros de UV (Tabela 6) e por co-injeção dos padrões de referência e do extrato. Os compostos A1 e C1, isolados do extrato de *S. tuberosa* por métodos cromatográficos foram analisados por CLAE e seus picos foram reconhecidos no cromatograma como sendo os picos 7 e 9, respectivamente, de acordo com seus tempos de retenção e espectros de UV (Figura 11).

Figura 11 Cromatograma obtido por CLAE-DAD (a 340 nm) do extrato hidroetanólico das folhas de *S. tuberosa*: ácido clorogênico (1), ácido caféico (3), rutina (5) e isoquercitrina (6). Ver as condições cromatográficas no item 4.6

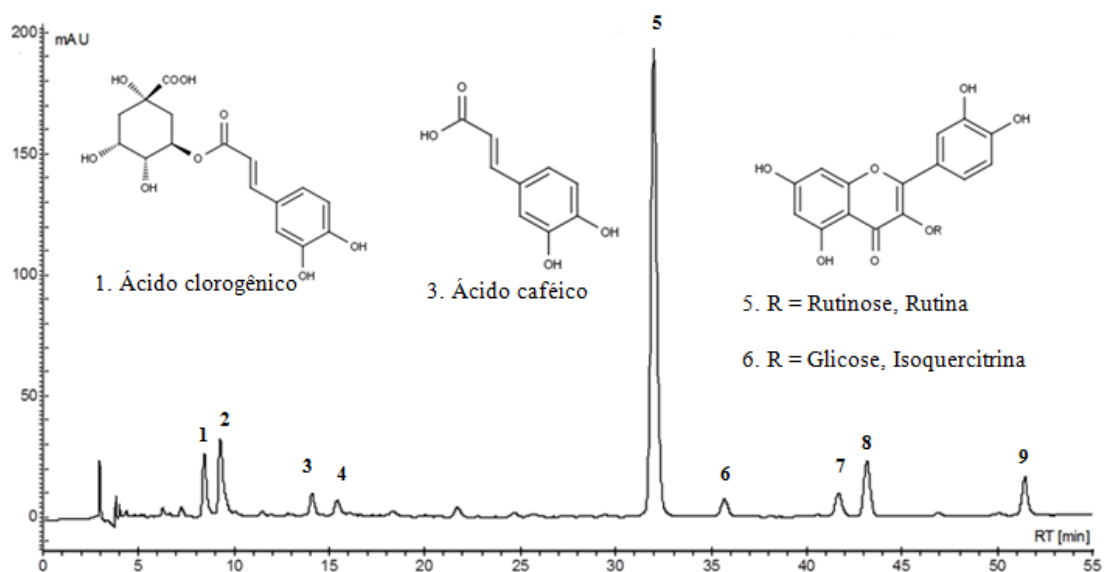


Tabela 6 Espectro de UV e tempo de retenção dos compostos fenólicos no extrato de *S. tuberosa*

Pico	Tr _(min)	CLAE-DAD	Composto
		λ_{\max} (nm)	
1	8,44	325	Ácido clorogênico
2	9,49	327	<i>N.I.</i>
3	14,11	321	Ácido caféico
4	15,51	312	<i>N.I.</i>
5	32,04	256, 353	Rutina
6	35,72	257, 352	Isoquercitrina
7	41,86	266, 345	<i>Composto A1</i>
8	43,25	263, 345	<i>N.I.</i>
9	51,48	268, 345	<i>Composto C1</i>

Tr: tempo de retenção; λ_{\max} (nm): comprimento de onda máximo em nanômetros; N.I.: não identificado

Pelos espectros de UV dos picos 3 e 4 é possível sugerir que tais compostos sejam ácidos fenólicos, enquanto que, os espectros dos compostos A1 e C1 e o pico 8 sejam flavonoides com o núcleo básico do tipo luteolina ($\lambda_{\max} = 267, 349$ nm) (MABRY et al., 1970; TAHIR et al., 2012; SIMIRGIOTIS et al., 2013). Os isolados A1 e C1 estão em processo de caracterização por meio de técnicas espectroscópicas.

Um estudo publicado em 2011 relata a identificação de rutina, quercetina e ácido elágico do extrato metanol:água (80:20, v/v) das folhas de *S. tuberosa* (SILVA et al., 2011). No entanto, a presença de ácido clorogênico, ácido caféico e isoquercitrina em *S. tuberosa* é relatado pela primeira vez nesta espécie.

Após identificação dos picos, foram avaliados os parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.

Uma maneira de garantir que a validade do procedimento analítico seja mantida sempre que utilizada é verificar alguns parâmetros de adequação do sistema. Isso foi feito conforme critérios recomendados pela literatura (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004; USP, 2008). Os resultados dessa análise estão na Tabela 10.

Tabela 7 Parâmetros de adequabilidade

Compostos	Nº de pratos teóricos	Resolução	Fator de cauda
Ácido clorogênico	7.235	2,5	1,14
Ácido caféico	15.394	2,2	1,11
Rutina	43.817	10,8	1,09
Isoquercitrina	53.479	5	1,08

* Valores de referência: N° pratos teóricos > 2000; Resolução >2; Fator de cauda <2.

Fonte: (Ribani, et al., 2004).

A metodologia analítica utilizada foi validada, a fim de avaliar o teor dos compostos identificados, que podem ser utilizados como marcadores químicos para as folhas de *S. tuberosa*.

O método cromatográfico mostrou uma linearidade adequada ($r^2 > 0,99$) para todos os padrões, como recomendado pela legislação oficial brasileira e ICH *Guidelines* (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Com isso, foi possível mensurar os teores de ácido clorogênico, ácido caféico, rutina e isoquercitrina no extrato de *S. tuberosa* (Tabela 7). A quantificação desses padrões no extrato foi realizada através de uma curva de regressão analítica em triplicata e a área dos picos foi utilizada para calcular a média. Verificou-se um conteúdo de 5,0 mg/g de ácido clorogênico; 0,68 mg/g de ácido caféico; 69,0 mg/g de rutina e 1,05 mg/g de isoquercitrina no extrato de *S. tuberosa* (Tabela 1). Em contrapartida, um estudo anterior mostrou uma concentração de rutina de 53,38 mg/g (SILVA et al., 2011) pela análise do extrato em metanol:água, bem como a identificação do ácido elágico. Em nosso estudo não foi identificada a presença de ácido elágico nas folhas de *S. tuberosa*.

Tabela 8 Conteúdo dos compostos fenólicos no extrato hidroetanólico de *S. tuberosa*^a

Espécie	Compostos	Conteúdo/g extrato
Folhas de <i>S. tuberosa</i> (3 mg/mL)	Ácido clorogênico (<i>Tr</i> = 8,44)	5,0 mg/g extrato
	Ácido caféico (<i>Tr</i> = 14,11)	0,68 mg/g extrato
	Rutina (<i>Tr</i> = 32,04)	69,0 mg/g extrato
	Isoquercitrina (<i>Tr</i> = 35,72)	1,05 mg/g extrato

^aExpresso como mg.g-1 de extrato (n=3)/*Tr*=Tempo de retenção

O limite de quantificação (LOQ) e o limite de detecção (LOD) foram definidos de acordo com o desvio padrão relativo (RSD > 5%) e por uma relação sinal:ruído de 3:1, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 9 Dados da calibração, LOD e LOQ dos padrões de compostos fenólicos

Composto	Intervalo ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da calibração	Fator de correlação (r^2)	LOD ^a ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ^a ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido clorogênico	5,0-15,0	$y = 26,256x - 4,52$	0,9995	0,5	3,0
Ácido caféico	1,7-5,2	$y = 61,289x + 31,575$	0,9957	0,57	1,7
Rutina	100,0-300,0	$y = 16,848x + 223,34$	0,9906	2,0	8,0
Isoquercitrina	2,5-12,5	$y = 39,34x + 3,19$	0,9929	0,75	1,5

^aLOD=Limite de Detecção/ LOQ=Limite de Quantificação

A repetibilidade (precisão intra-dia) foi desenvolvida por triplicata com o uso de soluções padrões em três concentrações diferentes de 50-150% em relação à concentração teórica (IUPAC, 2002) e foi expressa como desvio padrão relativo (RSD) (Tabela 9). Por outro lado, a precisão intermediária (inter-dia) foi realizada em três dias alternados, com as mesmas concentrações, e foi avaliado o RSD entre as análises em dias diferentes (Tabela 3).

A precisão ideal deve apresentar um RSD até 5% para todos os padrões analisados, portanto, de acordo com os nossos resultados, todos os parâmetros de precisão realizados estão de acordo com a recomendação da literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Em relação à exatidão, o EH (3 mg/mL) foi fortificado (1:1, v/v) com os padrões internos: ácido clorogênico (15,0 $\mu\text{g/mL}$), ácido caféico (5,2 $\mu\text{g/mL}$), rutina (300,0 $\mu\text{g/mL}$) e isoquercitrina (12,5 $\mu\text{g/mL}$) (1:1 v/v), e os valores de recuperação foram mensurados (Tabela 9).

Tabela 10 Dados de repetibilidade, precisão intermediária e exatidão dos padrões de compostos fenólicos

Composto	Repetibilidade		Precisão intermediária		Recuperação ^a	
	Concentração (µg/mL)	R.S.D. (%)	Concentração (µg/mL)	R.S.D. (%)	Média (%)	R.S.D. (%)
Ácido clorogênico	5,0	2,0	5,0	1,0	101,4	2,0
	10,0	0,61	10,0	2,26		
	15,0	0,5	15,0	3,0		
Ácido caféico	1,7	2,0	1,7	2,0	94,74	0,5
	3,5	0,62	3,5	2,27		
	5,2	1,0	5,2	1,0		
Rutina	100	3,0	100	3,0	101,7	1,0
	200	0,19	200	0,72		
	300	1,0	300	2,0		
Isoquercitrina	2,5	4,0	2,5	5,0	104,5	3,0
	7,5	3,04	7,5	2,36		
	12,5	2,0	12,5	1,0		

^aRecuperação foi determinada por injeção de amostras fortificadas, em triplicata, com o padrão de referência.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Considerando a importância de *S. tuberosa* na medicina tradicional do Nordeste brasileiro e os escassos estudos científicos sobre suas atividades biológicas, investigou-se o seu potencial anti-inflamatório.

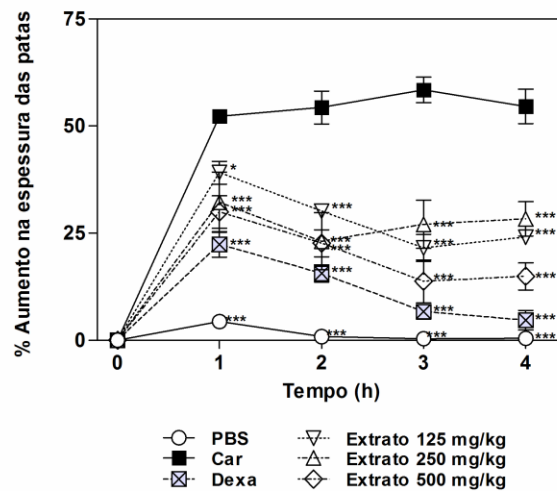
O edema da pata em roedores, induzido por injeção de diferentes agentes inflamatórios, é um modelo generalizado para a avaliação da atividade anti-inflamatória. A carragenina, um grupo complexo de polissacarídeos constituídos de unidades alternadas de *D*-galactose e 3,6-anidro-galactose, recebe destaque como o agente flogístico mais comumente utilizado neste modelo, especialmente para triagem de novas drogas anti-inflamatórias (VINEGAR et al., 1969; SILVA et al., 2010; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). Os sinais cardinais da inflamação (edema, hiperalgesia e eritema) são desenvolvidos imediatamente após a injeção intraplantar de carragenina, resultante da ação de agentes pró-inflamatórios, tais como citocinas, bradicinina, histamina, taquicininas, sistema complemento e espécies reativas de oxigênio, e nitrogênio. Os neutrófilos prontamente migram para os sítios da inflamação e podem gerar espécies reativas de oxigênio e outras moléculas pró-inflamatórias (POSADAS, 2004; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Nesse estudo, a administração de λ -carragenina na pata traseira direita dos camundongos produziu uma resposta inflamatória significativa quando comparada com os valores basais. Os animais tratados com o extrato de *S. tuberosa* (125-500 mg/kg, i.p.) apresentaram uma redução significativa ($P < 0,001$) na resposta inflamatória ao

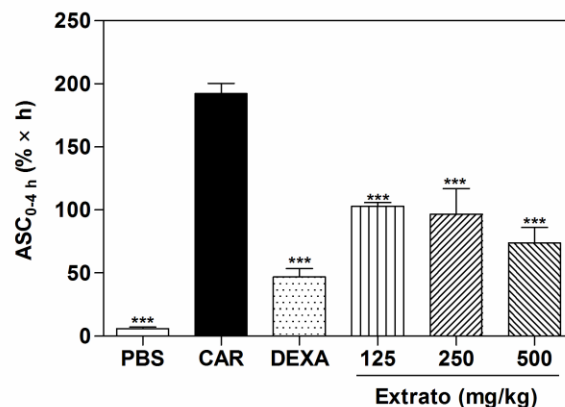
longo de todo o experimento (a partir de 1 até 4 horas após a injeção de carragenina), como pode ser observado na Figura 12. O efeito máximo antiedematogênico parece ser alcançado com a dose de 500 mg/kg, com 59,2% de inibição da inflamação (Tabela 11). Não foi observado um efeito dose-dependente, uma vez que não havia nenhuma diferença significativa entre as respostas às doses testadas de extrato ($P > 0,05$). A dexametasona (2 mg/kg, i.p.), o fármaco anti-inflamatório padrão que foi utilizado, apresentou inibição significativa sobre a resposta edematogênica, assim como era esperado ($P < 0,001$). O efeito antiedematogênico de *S. tuberosa* a 500 mg/kg foi similar a dexametasona ($P > 0,05$).

Figura 12 Efeito do extrato de *S. tuberosa* no edema da pata induzido por carragenina em camundongos. O edema foi determinado como a diferença entre os valores iniciais (basais, antes da injeção de carragenina) e a espessura final da pata traseira obtida após diferentes períodos de tempo (1, 2, 3 e 4 horas) após a administração de λ -carragenina (500 μg / pata). * Valores expressos em média \pm SEM com n = 5. *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (tratado com veículo) por *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. PBS= solução salina; Car=Carragenina 500 μg /pata, via subplantar; Dexa=Dexametasona 2 mg/kg, via i.p.; Extrato= 125, 250 e 500 mg/kg, via i.p., do extrato hidroetanólico de *S. tuberosa*.

A



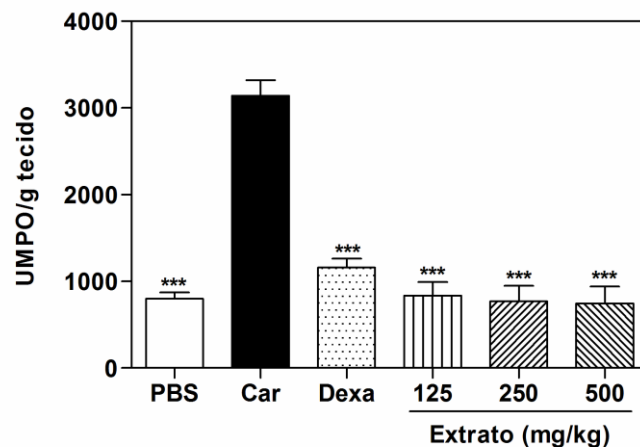
B



Em vista do efeito antiedematogênico apresentado pelo extrato de *S. tuberosa* nas diferentes doses, foi avaliado o nível de MPO para verificar se esse efeito poderia ser devido à inibição na migração de neutrófilos para o local da inflamação. A enzima MPO constitui um marcador indireto quantitativo do influxo de neutrófilos para o tecido inflamado da pata inflamado (BRADLEY et al., 1982). Trata-se de uma enzima heme de grânulos azurófilos de neutrófilos com uma forte atividade oxidativa que tem demonstrado estar envolvida na atividade microbicida dessas células e na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KOTHARI et al., 2011).

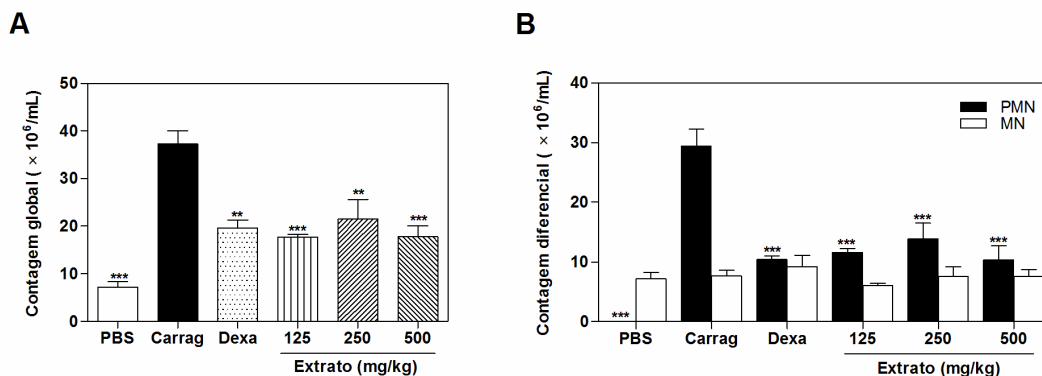
Como pode ser observado na Figura 13, o nível de MPO das patas inflamadas com carragenina foi significativamente maior ($P < 0,001$) do que o nível de MPO das patas esquerdas que não receberam administração do inflamógeno (valores basais), confirmando assim, a capacidade da carragenina em induzir o aumento do influxo de neutrófilos para o tecido inflamado das patas dos camundongos. O extrato de *S. tuberosa*, em ambas as doses testadas, reduziu significativamente ($P < 0,001$) os níveis de MPO no modelo de edema de pata induzido por carragenina, apresentando efeito semelhante à dexametasona ($P > 0,05$). Em um estudo realizado com *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) as chalconas diméricas identificadas na espécie inibiram significativamente o nível de MPO (cerca de 80%) no modelo de conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina em roedores (ALBUQUERQUE et al., 2011). Enquanto que *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae) exibiu uma inibição de 73% sobre os níveis de MPO em edema de ouvido induzido em camundongos (GINER-LARZA et al., 2000). Já o extrato da casca de *Spondias pinnata* não mostrou efeito significativo na redução dos níveis de MPO no modelo de mucosite intestinal induzida em ratos (REDDY et al., 2014). Esta inibição significativa observada em *S. tuberosa* sobre a atividade MPO (que atingiu 81,7% na dose de 500 mg/kg) confirma o resultado visualizado macroscopicamente (redução da espessura da pata) e indica que o efeito antiedematogênico apresentado pelo extrato pode estar relacionado com uma inibição na migração celular, colaborando com o efeito anti-inflamatório do extrato.

Figura 13 Efeito do extrato de *S. tuberosa* sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO) no modelo de edema de pata induzido por carragenina nas patas traseiras dos camundongos. A atividade enzimática foi medida em amostras colhidas 4 h após a administração de carragenina. Uma unidade de atividade MPO (UMPO) foi definida como aquela que degrada um micromol de peróxido por minuto. LP: pata esquerda (controle de valores basais). * Os valores são expressos como média \pm SEM com $n = 5$. *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo) por *one-way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey. PBS= solução salina; Car=Carragenina 500 $\mu\text{g/pata}$, via subplantar; Dexa=Dexametasona 2 mg/kg, via i.p.; Extrato= 125, 250 e 500 mg/kg, via i.p., do extrato hidroetanólico de *S. tuberosa*.



Adicionalmente ao edema de pata induzido por carragenina, o modelo de peritonite induzida por carragenina foi utilizado para confirmar os resultados anteriores. A peritonite aguda induzida por carragenina é um modelo bem conhecido e comumente utilizado para a investigação de um processo inflamatório agudo, tal modelo investiga os níveis de migração leucocitária através da contagem do número total de células que atingiram a cavidade peritoneal durante o processo de inflamação aguda. O mecanismo de ação pelo qual a carragenina induz o processo inflamatório é um sinergismo entre os diversos mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros agentes quimiotáticos (HASSIMOTTO et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013). Como pode ser observado na Figura 14, houve uma acentuada migração leucocitária para a cavidade peritoneal após administração i.p. de λ -carragenina nos camundongos.

Figura 14 Efeito do extrato de *S. tuberosa* sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos. A contagem de células da lavagem peritoneal recolhida na quarta hora após a administração de carragenina (1000 μg / cavidade). * Os valores são expressos como média \pm SEM com $n = 5$. *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo) por *one-way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey. PBS= solução salina; Carrag=Carragenina 1000 μg /cavidade, via i.p.; Dexa=Dexametasona 2 mg/kg, via i.p.; Extrato= 125, 250 e 500 mg/kg, via i.p., do extrato hidroetanólico de *S. tuberosa*; PMN=leucócitos polimorfonucleares; MN=células monocucleares



O tratamento com o extrato de *S. tuberosa* (125-500 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente ($P < 0,001$) o número de leucócitos presentes na lavagem peritoneal, com efeito semelhante ao da dexametasona ($P > 0,05$). Um resumo das porcentagens de inibição observadas em ambos os modelos de inflamação é apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de *S. tuberosa* no edema de pata e de peritonite induzida por carragenina em camundongos

Grupo	% inibição		
	Edema de pata		Peritonite
	AUC _{0-4h}	MPO	Leucócitos totais
Dexametasona 2 mg/kg	74.0%	67.7%	56.2%
<i>S. tuberosa</i> 125 mg/kg	43.1%	78.8%	60.4%
<i>S. tuberosa</i> 250 mg/kg	46.6%	81.0%	52.1%
<i>S. tuberosa</i> 500 mg/kg	59.2%	81.7%	60.2%

* Porcentagens de inibição calculadas com base na área sob a curva (AUC_{0-4h}) e atividade MPO (para edema de pata) e contagem global de leucócitos (peritonite).

Esses resultados obtidos dão uma forte evidência da ação anti-inflamatória do extrato das folhas de *S. tuberosa*, por meio da redução da ativação dos leucócitos para o local da inflamação em resposta a carragenina. Os resultados apresentados poderiam dar suporte para alguns usos tradicionais da espécie contra várias condições inflamatórias (MATOS, 1999; AGRA et al., 2007b; LINS-NETO et al., 2010; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2011). Apesar de sua ampla utilização na medicina popular devido a essa ação, não há nenhum estudo anterior a respeito dessa atividade para esta espécie.

Outras espécies do mesmo gênero são também utilizadas popularmente para o tratamento de inflamação. O extrato metanólico das folhas de *Spondias mombin* apresentou atividade anti-inflamatória nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg via oral e suprimiu a formação induzida de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e óxido nítrico em modelo de inflamação induzida por carragenina *in vivo* (NWORU et al., 2011). Os extratos metanólicos e acetato de etila das cascas internas de *Spondias pinnata* apresentaram ação anti-inflamatória na dose de 400 mg/kg via oral no modelo de edema de pata induzido por carragenina (RAO et al., 2009). Além disso, as frações acetato de etila e *n*-butanol do extrato etanólico das cascas de *Spondias mangifera* foram responsáveis pela inibição de edema de pata induzido por carragenina nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg administrados por via oral (SACHAN et al., 2011).

Alguns flavonoides são conhecidos por exibirem atividade anti-inflamatória comprovada. Rutina, quercetina e hesperidina inibiram as fases aguda e crônica da inflamação no modelo de artrite em ratos, quando administrados em doses diárias equivalentes a 80 mg/kg. Hesperitina e hesperidina (flavanonas) foram eficazes na inibição da inflamação neurogênica induzida por xileno (GUARDIA et al., 2001; ROTELLI et al., 2003). Tais compostos podem ser responsáveis pela atividade anti-inflamatória do extrato, uma vez que o teor de rutina (69,0 mg/g de extrato) foi encontrado em maior quantidade na espécie desse estudo. Tem sido relatado que a rutina inibe a quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares de uma forma dependente da dose. Também atua na inibição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e expressão de óxido nítrico que estão envolvidos em processos inflamatórios (SELLOUM et al., 2003; BELLIK et al., 2012).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Foram identificados por CLAE os compostos fenólicos ácido clorogênico, ácido caféico, rutina e isoquercitrina nas folhas de *Spondias tuberosa*. Tais compostos poderiam ser sugeridos como marcadores para colaborar com o controle de qualidade da matéria-prima e extratos obtidos a partir dessa espécie.
- Foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por CLAE para quantificação dos compostos identificados no extrato de *Spondias tuberosa*.
- Os resultados da atividade biológica demonstram o potencial anti-inflamatório significativo do extrato das folhas de *Spondias tuberosa* nos modelos de edema de pata e peritonite induzida por carragenina em camundongos, sugerindo que os constituintes da planta podem causar tal ação através da redução da migração celular.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; CARRETERO, E.; MARTÍNEZ-ACITORES, C.; NOGUERA, B.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. **J Ethnopharmacol**, v. 55, n. 1, p. 63-68, 1996.

ABESUNDARA, K. J. M.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, M. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Some Sri Lanka Plant Extracts, One of Which, *Cassia auriculata*, Exerts a Strong Antihyperglycemic Effect in Rats Comparable to the Therapeutic Drug Acarbose. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2541-2545, 2004.

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Cróton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 494-497, 1999.

ACCIOLY, M. P. **Atividade leishmanicida in vitro de frações de *Spondias mombin* e *Musa paradisíaca* sobre *Leishmania chagasi***. 2001.73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2001.

ADEMOLA, I.O; FAGBEMI, B.O; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies *in vitro* and *in vivo*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, p. 223-235, 2005.

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, 2007a.

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J.; COELHO, V. P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383-395, 2007b.

AJAO, A. O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. Antibacterial Effect of Aqueous and Alcohol Extracts of *Spondias mombin*, and *Alchornea cordifolia* - Two Local Antimicrobial Remedies. **Int. J. Crude Drug Res.**, v. 23, n. 2, p. 67-72, 1985.

AKINMOLADUN, A. C.; OBUOTOR, E. M.; FAROMBI, E. O. Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Some Nigerian Indigenous Medicinal Plants. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 444-51, 2010.

AKINMOLADUN, A. C.; CROWN, O. O.; OJO, O. B.; OLALEYE, T. M.; FAROMBI, E. O. Antidenaturation and antioxidative properties of phytochemical components from *Spondias mombin*. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 444-51, 2010.

ALBANO, M. N.; SILVEIRA, M. R.; DANIELSKI, L. G.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; PIOVEZAN, A. P. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 612-617, 2013.

ALBUQUERQUE, R. J. D. M.; LEAL, L. K. A. M.; BANDEIRA, M. A.; VIANA, G. S. D. B.; RODRIGUES, L. V. Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* are efficacious in guinea pig ovalbumin-induced allergic conjunctivitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 953-962, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p.156–170, 2007.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, n. 44, p. 2155-2159, 2011.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; LIMA E SILVA, T. C.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, n. 62, p. 127-142, 2005.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARAUJO, 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**, n. 120, p. 72-80, 2008.

AROMOLARAN, O.; BADEJO, O. K. Efficacy of fresh leaf extracts of *Spondias mombin* against some clinical bacterial isolates from typhoid patients. **Asian Pac J Trop Dis**, v. 4, n. 6, p. 442-446, 2014.

ASUQUO, O. R.; OKOB, O. O. K.; BROWNSONA, E. S.; UMOETUKA, G. B.; UTINA, I. S. Effects of ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* on the pituitary–gonadal axis of female Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 169-173, 2013.

ATTANAYAKE, A. P.; JAYATILAKA, K. A. P. W.; PATHIRANA, C.; MUDDUWA, L. K. B. Antihyperglycaemic, antihyperlipidaemic and beta cell regenerative effects of *Spondias pinnata* (Linn. f.) Kurz. bark extract on streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, n. 5, p. 588–596, 2014.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; AKINSOMISOYE, O. S.; UKPONMWAN, O. E. Medicinal and Economic Value of *Spondias mombin*. **African Journal of Biomedical Research**, v.11, p. 129-136, 2008.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **J Ethnopharmacol**, v. 103, n. 2, p. 166-175, 2006.

BADONI, A.; BISHT, C. Importance and Problems in Natural Regeneration of *Spondias pinnata*. **Report and Opinion**, v. 1, n. 5, p. 12-13, 2009.

BANSAL, V. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, n. 5, p. 22-26, 2010.

BANSAL, P.; PAUL, P.; MUDGAL, J.; NAYAK, P. G.; PANNAKAL, S. T.; PRIYADARSINI, K. I.; UNNIKRIISHNAN, M. K. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* L. in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 6, p. 651-658, 2012.

BARROS, F. E. V.; SOUSA, M. G. T.; COSTA, J. L.; OLEA, R. S. G.; FREIRE, S. M. F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. R. Avaliação das atividades analgésica e Antinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis Procera*, R. BR. (Ciúme). **Infarma**, v.16, n. 9-10, p. 60-64, 2004.

BARTON, G. M. A. Calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 413-420, 2008.

BECCHI, M.; FRAISSE, D. Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. **Biomedical & Environmental Mass Spectrometry**, v. 18, n. 2, p. 122-130, 1989.

BELLIK, Y.; BOUKRAÂ, L.; ALZHRANI, H. A.; BAKHOTMAH, B. A.; ABDELLAH, F.; HAMMOUDI, S. M.; IGUER-OUADA, M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 322-353, 2012.

BIESKI, I. G. C.; RIOS SANTOS, F.; OLIVEIRA, R. M.; ESPINOSA, M. M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA MARTINS, D. T. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRASIL. 2014a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Resolução RDC N° 26, de 13 de maio de 2014.

BRASIL. 2014b. **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**. Instrução normativa n° 4, de 18 de junho de 2014. ANVISA, Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. 2012. **Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**. Práticas integrativas e complementares. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2012.

BRASIL. 2010. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 5. ed., 2 v., 2010.

BRASIL. 2009. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. 1p. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/11-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 25 jan. 2015.

BRASIL. 2003. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução-RE N° 889/2003. Disponível em:http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 08 de outubro de 2012.

BRITISH PHARMACOPOEIA. **BP 2009**. Londres: British Pharmacopoeia Commission Office, v. I, 2009.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 98-111, 2010.

CARVALHO, A. M. R.; ROCHA, N. F. M.; VASCONCELOS, L. F.; RIOS, E. R. V.; DIAS, M. L.; SILVA, M. I. G.; FRANÇA FONTELES, M. M.; FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J.; SOUSA, F. C. F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-biological interactions**, v. 205, n. 3, p. 165-172, 2013.

CAVALCANTI, N. B.; LIMA, J. B.; RESENDE, G. M.; BRITO, L.T. L. Ciclo reprodutivo do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) no semiárido do Nordeste brasileiro. **Revista Ceres**, v. 47, n. 272, p. 421-439, 2000.

CELLI, G. B. **Comportamento fisiológico e bioquímico de frutos da Pitangueira (*Eugenia Uniflora* L.): características de interesse para o consumo humano**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 149 p., 2011.

- CEVA-ANTUNES, P. M. N.; BIZZO, H. R.; SILVA, A. S.; CARVALHO, C. P. S.; ANTUNES, O. A. C. Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). **LWT**, v. 39, p. 436-442, 2006.
- CIRINO, G. Multiple Controls in Inflammation: Extracellular and Intracellular Phospholipase A₂, Inducible and Constitutive Cyclooxygenase, and Inducible Nitric Oxide Synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 105–111, 1998.
- COATES, N. J.; GILPIN, M. L.; GWYNN, M. N.; LEWIS, D. E.; MILNER, P. H.; SPEAR, S. R.; TEYLE, J. W. SB-202742, A novel β -lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 654-657, 1994.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
- CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-1130, 1991.
- CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1979-1981, 1992.
- CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS, S.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, n. 5, p. 460-463, 1994.
- COSTA, N. P. D.; BRUNO, R. D. L. A.; SOUZA, F. X. D.; LIMA, E. D. P. D. A. Efeito do estágio de maturação do fruto e do tempo de pré-embebição de endocarpos na germinação de sementes de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 738-741, 2001.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.
- DADUANG, J.; VICHITPHAN, S.; DADUANG, S.; HONGSPRABHAS, P.; BOONSIRI, P. High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 5, p. 608-615, 2011.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.
- DAIGLE, D. J.; CONKERTON, E. J. Analysis of flavonoids by HPLC: an update. **Journal of liquid chromatography**, v. 11, n. 2, p. 309-325, 1988.

DAS, J.; MANNAN, A.; RAHMAN, M.; DINAR, A. M.; UDDIN, M. E.; KHAN, I. N.; HABIB, R.; HASAN, N. Chloroform and Ethanol Extract of *Spondias Pinnata* and its Different Pharmacological activity Like-Antioxidant, Cytotoxic, Antibacterial Potential and Phytochemical Screening through In-Vitro Method. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 1805-1812, 2011.

ENGELS, C.; GRÄTER, D.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M.; GÄNZLE, M. G.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in jacote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, p. 557-62, 2012.

FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; MENEZES, Y. A.; CABRAL, B.; CÂMARA, R. B.; SILVA-JUNIOR, A. A.; ROCHA, H. A. O.; REBECCHI, I. M. M.; ZUCOLOTTI, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L.(Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104952, 2014.

FERREIRA-JÚNIOR, W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 238-252, 2011.

FILGUEIRAS, H. A. C.; MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E. Cajá (*Spondias mombin* L.) in ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOURA, C.F.H. Org. Caracterização de frutas nativas da América Latina. Jaboticabal: UNESP/SBF, cap. 5, 2000.

FOSTER, S. L.; RUSLAN, M. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. **Clinical Immunology**, v. 130, p. 7-15, 2009.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W. α -Amylase inhibitory effect of 3 β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. **Food Chemistry**, v.116, p. 285-288, 2009.

GANGARAO, B; JAYARAJU, N. Anthelmintic activities of *Glycosmis pentaphylla* and *Spondias pinnata*. **Journal of Pharmaceutical Research and Health**, v. 1, n. 1, p. 91-96, 2009.

GHATE, N. B.; HAZRA, B.; SARKAR, R.; MANDAL, N. In vitro anticancer activity of *Spondias pinnata* bark on human lung and breast carcinoma. **Cytotechnology**, v. 66, p. 209-218, 2013.

GIACOMETTI, D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: **Simpósio nacional de recursos genéticos de fruteiras nativas**, 1992, Cruz das Almas, BA. Anais...Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, p. 13-27, 1993.

GINER-LARZA, E. M.; MÁÑEZ, S.; GINER-PONS, R. M.; CARMEN RECIO, M.; RÍOS, J. L. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A₂ activity of extracts

from lanostane-rich species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 61-69, 2000.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. R.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. T. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties of Dietary Flavonoids. **Polyphenols in Human Health and Disease**, p. 435-452, 2014.

GREGORIS, E.; LIMA, G. P. P.; FABRIS, S.; BERTELLE, M.; SICARI, M.; STEVANATO, R. Antioxidant Properties of Brazilian Tropical Fruits by Correlation between Different Assays. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 132759, 8 p. 2013.

GROTEWOLD, Erich (Ed.). **The science of flavonoids**. 2006.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmacologia**, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.

GUPTA, V. K.; ROY, A.; NIGAM, V. K.; MUKHERJEE, K. Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. **Journal of Medicinal Plants research**, v. 4, n. 16, p. 1656-1661, 2010.

HAFIZ, A. **Preliminary Phytochemical Screening, Antioxidant Activity & Cytotoxic Activity Evaluation of *Spondias pinnata* Barks [dissertação]**. Aftab Nagar: East West University; 2014.

HASSIMOTTO, N. M. A.; MOREIRA, V.; NASCIMENTO, N. G. D.; SOUTO, P. C. M. D. C.; TEIXEIRA, C.; LAJOLO, F. M. Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. **BioMed research international**, v. 2013, 10 p., 2013.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, n. 63, p. 1-10, 2008.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HOUT, S.; CHEA, A.; BUN, S.; ELIAS, R.; GASQUET, M.; TIMON-DAVID, P.; BALANSARD, G.; AZAS, N. Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 12-18, 2006.

IBRAHIM, R.; BARRON, D. 3 Phenylpropanoids. **Methods in plant biochemistry**, v. 1, p. 75, 2012.

ICH. 2005. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. 2005.

IOANNONE, F.; MIGLIO, C.; RAGUZZINI, A.; SERAFINI, M.; MORABITO, G.; CALDER, P. C.; YAQOUB, P. Flavonoids and immune function. **Diet, immunity and inflammation**, p. 379-415, 2013.

ISLAM, S. M. A.; AHMED, K. T.; MANIK, M. K.; WAHID, M. A.; KAMAL, C. S. I. A comparative study of the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic potential of the fruits and leaves of *Spondias dulcis*. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 9, p. 682-691, 2013.

IUPAC. 2002. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

JANTAN, N. *In vitro* antidiabetic of Cemumar (*Micromelum pubescens*), Tebengau (*Ehretia laevis*) and Kedondong (*Spondias dulcis*) leaves extract. **Malaysia: School of Bioprocess Engineering**, Universiti Malaysia Perlis; 2010.

KAZAKEVICH, Y. V.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. John Wiley & Sons, 2007.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 10, p. 823-835, 2011.

KOTHARI, N.; KESHARI, R. S.; BOGRA, J.; KOHLI, M.; ABBAS, H.; MALIK, A.; DIKSHIT, M.; BARTHWAL, M. K. Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis. **Journal of critical care**, v. 26, n. 4, p. 435. e1-435. e7, 2011.

KUMAR, V. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2011.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Métodos Cromatográficos de Análise 6, Ed. Rima: São Carlos, 2004.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Plantas Medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica. SBPC, Campinas, SP, p. 116, 2008.

LEVY, B. D.; SERHAN, C. N. Resolution and Regulation of Inflammation. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, 2014.

LIMA, J. L. S. Plantas forrageiras das caatingas - usos e potencialidades. Petrolina - PE: Embrapa-CPATSA/PNE/RBG-KEW. 44 p. 1996.

LINS-NETO, E. M. F. Usos tradicionais e manejo incipiente de *Spondias tuberosa* arruda no semi-árido do nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. **Depto. de Biologia (UFRPE)**, 100 p., 2008.

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, n. 1, p. 11–21, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. 368 p.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag 1970. 354 p.

MANIK, M. K.; ISLAM, S. M. A.; WAHID, A.; MORSHED, M. M.; KAMAL, S.; ISLAM, S.; AHMED, K. T. Investigation of In Vitro Antioxidant, Antimicrobial and Thrombolytic Activity of the Exocarp of *Spondias pinnata* (Anacardiaceae). **Canadian Chemical Transactions**, v. 1, n. 3, p. 191-201, 2013.

MARSTON, Andrew. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22, p. 2786-2798, 2007.

MATOS, F. J. A. Plantas da Medicina Popular do Nordeste. Edições UFC, Fortaleza, 1999.

MATTIETTO, R. A.; MATTA, V. M. Cajá (*Spondias mombin* L.). **Woodhead Publishing Limited**, c. 15, p. 330-353, 2011.

MCMMASTER, M. **HPLC: a practical user's guide**. John Wiley & Sons, 2007.

MELO, E. A.; ANDRADE, R. A. M. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MILLER, A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 36, p. 12801-12806, 2005.

MIRANDA-CRUZ, E.; ESPINOSA-MORENO, J.; CENTURIÓN-HIDALGO, D.; VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ, J. R.; ALOR-CHÁVEZ, M. J. Antimicrobial activity of *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. and *Spondias purpurea* L. extracts. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 4, p. 354-361, 2012.

MONDAL, S.; DASH, G. K. Hypoglycemic activity of the bark of *Spondias pinnata* Linn. kurz. **Pharmacognozy Magazine**, v. 5, n. 19, p. 42-45, 2009.

MONTE, R. F.; SANTOS, T. S.; SANTOS, M. A. **Seriguela: *Spondias purpurea***. Floriano, Piauí: Instituto Federal do Piauí, IFPI Campus Floriano, v. 1, ed. 1, RMT Editora, 2011.

MUHAMMAD, A.; RAHMAN, S.; KABIR, A. H.; KABIR, S.; HOSSAIN, K. Antibacterial and cytotoxic activities of *Spondias pinnata* (Linn. f.) Kurz fruit extract. **Indian J. Nat. Prod. Resour**, v. 2, n. 2, p. 265-267, 2011.

NASCIMENTO-SILVA, O.; PAIVA, J. G. A. Estudos morfológicos e anatômicos em folhas adultas de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindley). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 6, n. 2, p. 36-43, 2007.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187-205, 2013.

NIKHIL, K. S.; MUHAMMAD, A; ZAMAN, K; YATINDRA, K. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant potential of the stem bark of *Spondias mangifera* Willd. **Archives of Biological Sciences**, v. 63, n. 2, p. 413-419, 2011.

NJOKU, P.C.; AKUMEFALA, M. I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias mombin* leaves. **Journal of Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 613-615, 2007.

NWORU, C.S.; AKAH, PA; OKOLI, C.O.; OKOYE, T.C. Oxytocic Activity of Leaf Extract of *Spondias mombin*. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 5, p.366-371, 2007.

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B.; TOUKAM, D. K.; UDEH, J.; ESIMONE, C. O. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 10-6, 2011.

OLADUNMOYE, M. K. Comparative evaluation of the effects of leaf extract from *Spondias mombin* on rats with induced infections from *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes*. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 4, n. 4, p. 264-269, 2007.

OLIVEIRA, J. R. S. Caracterização de extratos de cajá-manga (*Spondias dulcis* Parkinson) potencialmente ativos e seguros para obtenção de fitocosmético antioxidante. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, 2011.

OLUGBUYIRO, J. A. O.; MOODY, J. O.; HAMANN, M. T. AntiMtb activity of triterpenoid-rich fractions from *Spondias mombin* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 9, p. 1807-1809, 2009.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; SIMONS, A. *Spondias purpurea* - World Agroforestry Centre. **Agroforestry Database 4.0**, p. 1-5, 2009.

PAIVA, D. C. C.; SANTOS, C. A. D.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; THOMAZZI, S. M.; FALCÃO, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Pseudobombax marginatum* inner bark from caatinga potiguar. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 416-421, 2013.

PANDA, B. K.; PATRA, V. J.; MISHRA, U. S.; KAR, S.; PANDA, B. R.; HATI, M. R. Analgesic activities of the stem bark extract of *Spondias pinata* (Linn.f) Kurz. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 5, p. 825-827, 2009.

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A.; MORAES, M. E. A.; MORAES M. O. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Elsevier, Lead Molecules from Natural Products**. v. 2006, p. 197-211, 2006.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PINHEIRO, M. M.; FERNANDES, S. B.; FINGOLO, C. E.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P. D. Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 324-330, 2013.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PYRZYNSKA, K.; SENTKOWSKA, A. Recent developments in the HPLC separation of food phenolic compounds. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 2015, n. 45, p. 41-45, 2015.

RAJI ,Y.; GBADEGESIN, M. A.; OSONUGA O. A.; ADISA, R. A.; AKINSOMISOYE, O. S.; AWOBAJO, F.O.; KUNLE-ALABI, O. T.; ESEGBUE, P.P. R. C.; OSONUGA I. O.; LAMIDI, A. F. Reproductive, Haematologic and Biochemical profiles of male rats treated with aqueous extract of *Spondias mombin* bark. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 126-130, 2006.

RAO, B. G.; NATH, M. S.; RAJU, N. J. Investigation of anti-inflammatory activity of stem heart wood of *Spondias pinnata*. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 294-298, 2009.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 8, n. 3, p. 229-235, 2009.

REDDY, S.; SHETTY, B. V.; RAO, G. M. Modulatory effect of *Spondias pinnata* bark extract on intestinal MPO & sucrase activities in etoposide induced rat model for mucositis. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 5, p. 396-402, 2014.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 6, p. 601–606, 2003.

RUBIO-PEREZ, J. M.; MORILLAS-RUIZ, J. M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SACHAN, N. K.; ARIF, M.; ZAMAN, K.; KUMAR, Y. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant potential of the stem bark of *Spondias mangifera* willd. **Arch. Biol. Sci.**, v. 63, n. 2, p. 413-419, 2011.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. Inter-relações genéticas entre espécies do gênero *Spondias* com base em marcadores AFLP. **Rev Bras Frutic**, v. 30, n. 3, p. 731-735, 2008.

SATPATHY, G.; TYAGI, Y. K.; GUPTA, R. K. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2076-2087, 2011.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, n. 4, p. 313-318, 2003.

SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 5922-5943, 2011.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BÓRQUEZ, J.; KENNELLY, E. J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1672-1692, 2013.

SILPRASIT, K.; SEETAHA, S.; PONGSANARAKUL, P.; HANNONGBUA, S.; CHOOWONGKOMON, K. Anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of hexane extracts from some Asian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 19, p. 4194-4201, 2011.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; LIMA D. M.; SANTOS, S. C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Antiviral activities of

extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue vírus. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 406-413, 2011.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012.

SILVA, F. R. F.; DORE, C. M. P. G.; MARQUES, C. T.; NASCIMENTO, M. S.; BENEVIDES, N. M. B.; ROCHA, H. A. O.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26-33, 2010.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. *Anacardiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4402>>. Acesso em: 25 Ago. 2014.

SOUZA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; TOLEDO, F. F. **Enciclopédia agrícola brasileira**. Edusp, 1995.

SPENCER, J. P.; VAFEIADOU, K.; WILLIAMS, R. J.; VAUZOUR, D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Molecular aspects of medicine**, v. 33, n. 1, p. 83-97, 2012.

TAHIR, N. I.; SHAARI, K.; ABAS, F.; PARVEEZ, G. K. A.; ISHAK, Z.; RAMLI, U. S. Characterization of Apigenin and Luteolin Derivatives from Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Leaf Using LC-ESI-MS/MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11201-11210, 2012.

TAKAHASHI, M.; FUCHINO, H.; SATAKE, M.; AGATSUMA, Y.; SEKITA, S. In Vitro Screening of Leishmanicidal Activity in Myanmar Timber Extracts. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 6, p. 921-925, 2004.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, p. 2326-2331, 2011.

TROPICOS. 2014. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/40003912?tab=maps>>. Acesso em: 25 Ago. 2014

TUNON, M. J. ;GARCIA-MEDIAVILLA, M. V.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 3, p. 256-271, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**, 3th edition, Editor Springer, 2001.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. **High performance liquid chromatography in phytochemical analysis**. CRC Press, 2010.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 218-223, 2002.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.111, p. 544-547, 1962.

WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, A. Inflammation protocols. New Jersey: **Humana Press Inc.**, 2003.

WOLFENDER, J. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta medica**, v. 75, n. 7, p. 719-734, 2009.

UCHENDU, C. N.; ISEK, T. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. **African Health Sciences**, v. 8, n. 3, p. 163-167, 2008.

UNESCO. **Culture and Health: Orientation Texts: Medicinal plants, Culture and Health Care, Document CLT/DEC/PRO**. Paris, p. 37-40, 1996.

UNNIKRISHNAN, M. K.; VEERAPUR, V.; NAYAK, Y.; MUDGAL, P. P.; MATHEW, G. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoids. **Polyphenols in Human Health and Disease**, cap. 13, p. 143-161, 2014.

USP. 2008. **Validation of Compendial Methods**. Section <1225> , United States Pharmacopeal Convention, Rockville, MD, 2008.

USP. 2007. **The United States of Pharmacopoeia**. National Formulary-25, Asian Edition, United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville MD, ed. 30, vol. II, 2007.

VALSARAJ, R.; PUSHPANGADAN, P.; SMITT, U. W.; ADSERSEN, A.; NYMAN, U. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 75-83, 1997.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VILLEGAS, L. F.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected tradicional medicinal plants from Perú. **Journal of ethnopharmacology**, v. 55, p. 193-200, 1997.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

VISSOTTO, L. C.; RODRIGUES, E.; CHISTÉ, R. C.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Correlation, by multivariate statistical analysis, between the scavenging capacity against reactive oxygen species and the bioactive compounds from frozen fruit pulps. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, Supl. 1, p. 57-65, 2013.

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. Flavonoid glycosylation and biological benefits. **Biotechnology advances**, 2014.

YAM, M. F.; ASMAWI, M. Z.; BASIR, R. An investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Orthosiphon stamineus* leaf extract. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 362-368, 2008.

ZIBERNA, L.; FORNASARO, S.; CVOROVIC, J.; FEDERICA, T.; PASSAMONTI, S. Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters. **Polyphenols in Human Health and Disease**, v. 1, p. 489-511, 2014.

ZIELINSKI, A. A. F.; AVILA, S.; ITO, V.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.; HAMINIUK, C. W. I. The Association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, and In Vitro Antioxidant Activity of Frozen Fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. C510-C516, 2014.