

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Potencial farmacológico de *Spondias purpurea* L.

KÁTIA AVILA ANTUNES

**Dourados - MS
2020**

KÁTIA AVILA ANTUNES

Potencial farmacológico de *Spondias purpurea* L.

Área do CNPq: Farmacologia

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Kely de Picoli Souza

Co-orientador: Prof.^a Dr. Edson Lucas dos Santos

Dourados - MS
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A636p Antunes, Katia Avila
Potencial farmacológico de *Spondias purpurea* L. [recurso eletrônico] / Katia Avila Antunes. --
2020.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Kely de Picoli Souza.
Coorientadora: Edson Lucas dos Santos.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Bioprospecção. 2. Plantas medicinais. 3. Seriguela. 4. Estresse oxidativo. 5. Antioxidante. I.
Souza, Kely De Picoli. II. Santos, Edson Lucas Dos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR KÁTIA AVILA ANTUNES, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos quatorze dias do mês de janeiro de dois mil e vinte, as 08 horas, em sessão pública, realizou-se na Sala 41 da Faculdade de Administração, Ciências Contábeis e Economia – FACE da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "Potencial farmacológico de *Spondias purpurea* L." apresentada pela doutoranda KÁTIA AVILA ANTUNES, do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Kely de Picoli Souza/UFGD (presidente/orientadora), Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos – UFGD (membro titular), Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira – UFGD (membro titular), Prof.^a Dr.^a Débora da Silva Baldívia – UFGD (membro titular), Prof.^a Dr.^a Silvia Cristina Heredia Vieira – UNIDERP-Anhanguera (membro titular), Prof.^a Dr.^a Anelise Samara Nazari Formagio – UFGD (membro suplente) e Prof. Dr. Uilson Pereira dos Santos – Prefeitura Municipal de Itaporã/MS (membro suplente). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer a candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada APROVADA, fazendo *jus* ao título de DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados, 14 de janeiro de 2019.

Prof.^a Dr.^a Kely de Picoli Souza _____

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos _____

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa
Assinatura e Carimbo

Prof. Dr. Caio Fernando de Oliveira

Caio

Prof.^a Dr.^a Débora da Silva Baldívia

Débora da Silva Baldívia

Prof.^a Dr.^a Silvia Cristina Heredia Vieira

SEIU

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa
Assinatura e Carimbo

Dedico esta tese aos meus filhos,
Benjamin e Yasmin, meu esposo Oldimar,
meus irmãos, aos meus pais e meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar comigo em toda a minha caminhada e por me permitir conquistar esse título. Por não me desamparar e fazer com que eu tomasse as melhores decisões durante a minha trajetória.

Agradeço aos meus pais Tertuliana e Adão pelo amor, carinho e educação que me deram. Em especial, agradeço a minha mãe por me ajudar com meus bebezinhos quando eu precisei.

Agradeço aos meus irmãos, Claudia, Alex e Kelly, pelos momentos de alegrias e descontrações.

Ao meu amado esposo, amigo e grande companheiro, Oldimar Cantu de Pinho, pelo amor, alegria e pela paciência em vivenciar comigo este desafio. Obrigada meu amor por apoiar minhas decisões, por me ouvir, por segurar a minha mão e me incentivar diariamente. Tu es um grande exemplo aos nossos filhos.

Agradeço a minha Orientadora Kely de Picoli Souza, por confiar em mim, pelos ensinamentos, por estar presente em minha vida em todos os momentos que precisei, transmitindo conhecimento, segurança, carinho, conselhos. Agradeço por ser uma mulher maravilhosa, justa e amiga. Um exemplo de profissional, mulher, mãe e esposa. Serei grata pela Sra me proporcionar conhecimento além do necessário, para que eu pudesse alcançar meus objetivos, meu crescimento profissional e pessoal.

Obrigada Professor Edson Lucas dos Santos, por fazer parte da minha formação, por compartilhar conhecimentos e estar presente nos momentos de afastamento da professora Kely, cumprindo o papel de co-orientador de maneira única.

Agradeço a cada membro do GEBBAM (Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção aplicados ao metabolismo), pelas ajudas durante os experimentos, pelas conversas e pela amizade e carinho de cada um. Vocês estarão sempre em meu coração! Obrigada.

Agradeço aos professores Caio Fernando Ramalho de Oliveira e José Tarcisio Giffoni de Carvalho Junior, por fazerem parte da minha formação, sempre dispostos a me ajudar quando eu precisava. Obrigada pela amizade, carinho, conselhos e todo conhecimento que vocês dividiram comigo.

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e aos professores desta instituição, pela oportunidade de aprendizado e construção de minha carreira profissional.

À CAPES, CNPq e FUNDECT, por fomentar a realização desta pesquisa.

Agradeço de coração a todos os membros da banca, pela disposição em contribuir para a melhoria desta tese de doutorado.

Enfim, muito obrigada!

A única coisa mais cara que a educação
é a ignorância.

(Benjamin Franklin)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Distribuição geográfica da espécie *Spondias purpurea* L. (Fonte: 20
(MITCHELL; DALY, 2015)
- Figura 2.** Aspectos gerais de *Spondias purpurea*: A) Árvore; B) Folhas; C) Caule; 21
D) Frutos e E) Frutos e polpa. Fonte Antunes, KA (2019).
- Figura 3.** Efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio em biomoléculas. 26
Adaptado de Silva et al., 2014.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades farmacológicas atribuídas as espécies de <i>Spondias sp.</i>	17
Tabela 2. Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre.	23
Tabela 3. Efeito deletérios das espécies reativas de oxigênio sob as principais biomoléculas e mitocôndria.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
AA	Ácido ascórbico
HOCl	Ácido hipocloroso
ONOO ⁻	Ânion peróxidos nitrito
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
BHT	Butil Hidroxitolueno
CAT	Catalase
ERNs	Espécie reativa de nitrogênio
ER	Espécies reativas
EREs	Espécies reativas de enxofre
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EO	Estresse oxidativo
EPSp	Extrato aquoso da polpa liofilizada dos frutos de <i>Spondias purpurea</i>
ECSp	Extrato aquoso das cascas do caule de <i>Spondias purpurea</i>
GPx	Glutathione peroxidase
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Oxido nítrico
¹ O ₂	Oxigênio singlete
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
RL	Radicais livres
NO ₂ [•]	Radical dióxido de nitrogênio
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxila
[•] OH	Radical hidroxila
NO [•]	Radical óxido nítrico
SOD	Superóxido dismutase

Potencial farmacológico de *Spondias purpurea* L.

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas por diferentes povos para o tratamento de diversas doenças. Elas apresentam compostos químicos em concentração e composição variadas, o que subsidia suas atividades farmacológicas. *Spondia purpurea* L. é uma espécie amplamente distribuída pelo Brasil, cuja frutos e folhas são consumidos pela população e utilizados para diversos fins medicinais. Este estudo objetivou avaliar a constituição química, propriedades nutricionais e o potencial farmacológico dos frutos e das cascas do caule de *S. purpurea* L, bem como possíveis efeitos tóxicos. Os frutos e a casca do caule de *S. purpurea* foram coletados na cidade de Itaporã-MS. Para os frutos, nossos resultados mostraram que o processo de liofilização diminuiu o teor de umidade da polpa, promovendo um aumento no teor de cinzas, fibras totais, proteínas, lipídeos, ácido ascórbico, índice de acidez, fenóis totais e flavonoides. A avaliação da constituição química do extrato aquoso da polpa dos frutos de *S. purpurea* L. (EPSp) revelou a presença de triptofano, ácido hidroxicítrico, di-O-hexosídeo, O- desoxihexosil-hexosil quercetina e O-hexosil quercetina. Além disso, o EPSp apresentou atividade antioxidante nos ensaios de captação dos radicais livres, além de inibir os danos oxidativos nas biomoléculas avaliadas. Não foram observados efeitos tóxicos no modelo *C. elegans*. No extrato aquoso da casca do caule de *S. purpurea* (ECSp) foram identificados a presença de di-O-hexosídeo, ácido hidroxicítrico, ácido cítrico, ácido gálico, vários derivados de catequina e ácido elágico. *In vitro*, o ECSp apresentou atividade antioxidante nos ensaios ABTS e DPPH e foi capaz de inibir ou reduzir os danos oxidativos nas biomoléculas avaliadas. Não foram observados sinais de toxicidade em camundongos fêmeas tratadas com altas doses de ECSp. O tratamento com o ECSp por 60 d reduziu a hipercolesterolemia e os níveis de MDA nos órgãos avaliados em animais alimentados com dieta hipercalórica, de forma semelhante aos tratados com sinvastatina. Em conjunto, os frutos e os extratos aquosos do fruto e da casca do caule de *S. purpurea* se mostraram fontes de nutrientes e metabólitos secundários, como ácido ascórbico e derivados de catequina, que podem ser os responsáveis pelas ações antioxidantes e de proteção das biomoléculas à danos oxidativos, bem como a ação em reduzir colesterol sérico. A ausência de sinais de toxicidade e os potenciais farmacológicos identificados neste estudo encorajam o uso de *S. purpurea* como um alimento funcional.

Palavras-chave: Bioprospecção; Plantas medicinais; Seriguela; Estresse oxidativo; Antioxidante

Pharmacological Potential of *Spondias purpurea* L.

Abstract

Medicinal plants are used by different peoples to the treatment various diseases. They have chemical compounds in varying concentration and composition, which subsidize their pharmacological activities. *Spondia purpurea* L. is a species widely distributed in Brazil, whose fruits and leaves are consumed by the population and used for various medicinal purposes. This study aimed to evaluate the chemical constitution, nutritional properties and pharmacological potential of *S. purpurea* L stem fruits and peels, as well as possible toxic effects. The fruits and stem bark of *S. purpurea* were collected in the city of Itaporã-MS. For the fruits, the results showed that the lyophilization process decreases the moisture content of the pulp, promoting an increase in the content of ashes, total fibers, proteins and lipids, ascorbic acid, acidity index, total phenols and flavonoids. The evaluation of the chemical composition of the aqueous extract of *S. purpurea* L. fruit pulp (EPSp) revealed the presence of tryptophan, hydroxycitric acid, di-O-hexoside, O-deoxyhexosylhexosyl quercetin and O-hexosyl quercetin. In addition, EPSp showed antioxidant activity in free radical uptake assays, besides inhibiting oxidative damage in the biomolecules evaluated. No toxic effects were observed in model *C. elegans*. In the aqueous extract of *S. purpurea* stem bark (ECSp), the presence of di-O-hexoside, hydroxycitric acid, citric acid, gallic acid, various catechin derivatives and ellagic acid were identified. *In vitro*, ECSp showed antioxidant activity in ABTS and DPPH assays and was able to inhibit or reduce oxidative damage in the biomolecules evaluated. No signs of toxicity were observed in female mice treated with high doses of ECSp. Treatment with ECSp for 60 d reduced hypercholesterolemia and MDA levels in the organs evaluated in animals fed a high calorie diet, similar to those treated with simvastatin. Taken together, fruits and aqueous extracts of *S. purpurea* fruit and stem bark proved to be sources of nutrients and secondary metabolites, such as ascorbic acid and catechin derivatives, which may be responsible for the antioxidant and protective actions of biomolecules oxidative damage as well as the action in reducing serum cholesterol. The absence of signs of toxicity and the pharmacological potentials identified in this study encourage the use of *S. purpurea* as a functional food.

Keywords: Bioprospecting; Medicinal plants; Seriguela; Oxidative stress; Antioxidant.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
	2.1 Atividades farmacológicas do gênero <i>Spondias</i>	16
	2.2 <i>Spondias purpurea</i> L.....	20
	2.3 Espécies reativas.....	22
	2.4 Antioxidante	26
	2.5 Propriedades nutricionais e farmacológicas de frutos.....	27
	2.6 Propriedades farmacológicas atribuídas a cascas do caule.....	28
3	OBJETIVOS	30
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
5	APÊNDICES	38
	5.1 Fruto de <i>Spondias purpurea</i> L.: alimento nutracêutico capaz de inibir estresse oxidativo.....	38
	5.2 Casca do caule de <i>Spondias purpurea</i> L. apresenta atividade antioxidante e anti-hipercolesterolêmica em camundongos alimentados com dieta hipercalórica.....	69
6	ANEXOS	100
	6.1 Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA.....	100
	6.2 Parecer da Comissão de Ética e Pesquisa - CEP.....	101

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins terapêuticos é uma prática de diversos povos há séculos. Segundo a OMS, 80 % da população mundial já fez ou faz uso de alguma planta com finalidade terapêutica (ANDRADE et al., 2007; WHO, 2017). Os efeitos farmacológicos apresentados pelas plantas podem ser atribuídos aos seus constituintes químicos. As plantas apresentam, por exemplo, compostos antioxidantes, que promovem efeitos benéficos à saúde, minimizando os efeitos deletérios causados pelo acúmulo de espécies reativas (SAMEH et al., 2018).

O processo de oxidação ocorre natural ou patologicamente em nosso organismo formando subprodutos denominados espécies reativas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Estas substâncias podem apresentar em sua estrutura molecular átomos de oxigênio, formando as espécies reativas de oxigênio (EROs), ou podem conter nitrogênio, formando assim, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Em níveis fisiológicos, as EROs são responsáveis por diversas funções fisiológicas, incluindo mecanismos de defesa, regulação do crescimento celular, fagocitose e produção de energia (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017).

Diversos fatores externos podem contribuir para o aumento na produção de EROs, gerando o quadro de estresse oxidativo. Dentre os fatores externos, as dietas hipercalóricas (ricas em açúcares e gorduras) promovem o aumento de EROs e induzem o quadro de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HYBERTSON et al., 2011; SIES; STAHL; SEVANI, 2005). O quadro de estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizá-las (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014). Esse desequilíbrio pode estar relacionado a uma maior produção de espécies reativas ou uma redução nos sistemas de defesa antioxidante (PISOSCHI; POP, 2015).

As espécies reativas promovem danos aos componentes celulares, tais como proteínas, lipídeos e DNA (CABISCOL et al., 2000; GREENBERG et al., 2008). Esses efeitos deletérios as biomoléculas podem ser responsáveis pelo desenvolvimento e agravamento de diversas doenças como obesidade, dislipidemias, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, hipertensão e câncer (ANDRISIC et al., 2018; STOCKER; KEANEY, 2004; SULTAN, 2014; TALEB et al., 2018).

Assim, o equilíbrio entre as espécies reativas e os sistemas antioxidante, endógeno e exógeno, é importante na manutenção da saúde e prevenção de doenças (RAHMAN, 2007). Para isso, as plantas são uma alternativa de compostos antioxidantes importantes para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao quadro de estresse oxidativo (EO).

Diferentes partes das plantas são utilizadas com fins farmacológico como frutos, casca do caule, folhas, flores e raízes. Muitos frutos também são consumidos pela população com a finalidade alimentícia e apresentam compostos bioativos. Diferentemente da casca do caule, que está disponível durante todo o ano, a utilização dos frutos depende de sua sazonalidade, necessitando assim de processos tecnológicos para que os mesmos estejam disponíveis o ano todo. Todavia, durante o processamento dos frutos podem ocorrer perdas de nutrientes e de compostos bioativos (MARQUES; SILVEIRA; FREIRE, 2006).

Dentre as espécies de plantas com ações farmacológicas, se encontram as espécies da família Anacardiaceae. Essa família é constituída de diversos gêneros, dentre eles *Spondias sp.*, o qual possui 65 espécies (TROPICOS, 2019). Muitas destas são árvores frutíferas, cujos frutos são consumidos pela população como cajá, cajá-manga e seriguela. Para algumas espécies deste gênero, foram descritas propriedades farmacológicas, como segue. Os frutos e folhas de *Spondias dulcis* apresentaram atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e antitrombolítica (ISLAM et al., 2013). Os frutos de *Spondias mombin* possui potencial antioxidante, atribuído aos carotenoides e ácidos fenólicos presentes no mesmo (DE CARVALHO et al., 2015), além disso, as folhas desta espécie apresentam efeitos inibitórios contra as enzimas α -amilase e α -glicosidase (OJO et al., 2018). Outra espécie com potencial farmacológico é a *Spondias tuberosa* cuja folhas possui efeitos antioxidante e antifúngico frente a cepa fúngica de *Candida glabrata* (DA COSTA CORDEIRO et al., 2018).

Embora escassas, algumas propriedades farmacológicas têm sido relatadas para a espécie *Spondias pupurea*, como segue. O extrato hexânico dos frutos foram descritos possuir atividade antioxidante e antiglicação *in vitro* (MUÑIZ et al., 2018) e, o extrato hexânico das folhas apresentou efeito antioxidante e antiulcerogênico, sendo esses efeitos relacionados a sua constituição química, a qual possui ácido cafeico e epigallocatequina (DE ALMEIDA et al., 2017). Neste sentido, o nosso objetivo foi avaliar a constituição química, propriedades nutricionais e o potencial farmacológico dos frutos e das cascas do caule de *S. purpurea* L, bem como possíveis efeitos tóxicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Atividades farmacológicas do gênero *Spondias*

As plantas são utilizadas pela população para a prevenção e tratamento de diversas doenças há séculos (ANDERSON, 1996; ANDRADE et al., 2007). Segundo a OMS, 80% da população fez ou faz uso de plantas para fins terapêuticos (WHO, 2017). Assim, tem sido crescente o número de novas plantas descritas cientificamente, capazes de prevenir ou tratar doenças. Esses efeitos benéficos à saúde podem ser atribuídos à constituição química das mesmas.

As espécies *S. mombin*, *S. purpurea* e *S. tuberosa* são utilizadas popularmente para o tratamento de diversas doenças como conjuntivite, problemas ginecológicos, problemas gastrointestinais, dor de cabeça, oftalmia, doenças venéreas, diabetes, infecção renal, afecções da garganta, antiemético e tônico (DE ALBUQUERQUE et al., 2007).

Espécies pertencentes ao gênero *Spondias*, tais como: *S. dulcis*, *S. mangifera*, *S. mombin*, *S. pinnata*, *S. purpurea* e *S. tuberosa* já foram descritas possuir propriedades nutricionais e farmacológicas, sendo essas propriedades, muitas vezes, atribuídas a sua composição química. Em algumas espécies já foram encontrados compostos fenólicos, carotenoides e minerais. Adicionalmente, foram atribuídas a essas espécies atividades antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitrombolítica, hepatoprotetora e quimiopreventiva, como descrito na tabela 1.

A seguir, a sumarização de algumas espécies de *Spondias* que têm se destacado por apresentarem propriedades farmacológicas atribuídas a diferentes partes da planta, bem como a diversos compostos químicos (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades farmacológicas atribuídas as espécies de *Spondias sp.*

Parte avaliada	Espécie	Composto químico	Ação farmacológica	Referências
Casca do caule	<i>S. pinnata</i>	Compostos fenólicos, flavonoides	Antioxidante	HAZRA; BISWAS; MANDAL, 2008
		-	Analgésica	PANDA et al., 2009
		-	Hepatoprotetora	HAZRA; SARKAR; MANDAL, 2013
		-	Antihiperlipidêmica	ATTANAYAKE et al., 2013
		-	Antihiperlipidêmica e antihiperlipidêmica	ATTANAYAKE et al., 2014
		-	Antipirética	KURZ. et al., 2014
		-	Anticancerígena	GHATE et al., 2014
		-	Anticancerígena	CHAUDHURI et al., 2015
		Ácido gálico e galato de metila	Antioxidante e hepatoprotetora	CHAUDHURI et al., 2016
		-	Antioxidante, hepatoprotetora, inibe danos ao DNA	IQBAL et al., 2016
Folha	<i>S. dulcis</i>	-	Antioxidante e antimicrobiana	ISLAM et al., 2013
	<i>S. mombim</i>	-	Sedativa e antidopaminérgica	AYOKA et al., 2006

		-	Anticonceptiva	UCHENDU; ISEK, 2008
		-	Antioxidante e antimicrobiana	DA SILVA et al., 2012
		-	Estimula atividade cognitiva, aprendizado e memória	ASUQUO, O. R et al., 2013
		-	Gastroprotetora e antioxidante	SABIU et al., 2015
		-	Antiulcerogênica, antioxidante, estimulante de muco gastrointestinal e antibacteriana	BRITO et al., 2018 ^a
		-	Protetora contra disfunção cognitiva	ISHOLA; IKUOMOLA; ADEYEMI, 2018
		-	Estimula contração de músculos lisos uterinos	PAKOUSSEI et al., 2018
		Quercetina e ácido elágico	Inibição da α -glicosidase e α -amilase	OJO et al., 2018
	<i>S. pinnata</i>	-	Antitrombolítica	UDDIN et al., 2016
		Hidrocarbonetos sesquiterpenos β - carofileno, monoterpenos	Antimicrobiana	SAMEH et al., 2019
	<i>S. pupurea</i>	Ácido cafeico e epigallocatequina	Antioxidante e antiulcerogênica	DE ALMEIDA et al., 2017
	<i>S. tuberosa</i>	Rutina, quercetina, e ácido elágico	Antioxidante e antimicrobiana	DA SILVA et al., 2012
			Anti-inflamatória	DA SILVA SIQUEIRA et al., 2016

			Antioxidante e antifúngica	DA COSTA CORDEIRO et al., 2018
Fruto	<i>S. axillaris</i>	Fenóis totais, flavonóides totais, ácido ascórbico, antocianina e carotenoides	-	GUPTA et al., 2019
	<i>S. dulcis</i>	-	Antioxidante e antimicrobiana	ISLAM et al., 2013
	<i>S. mangifera</i>	Rico em vitaminas	Antioxidante e calmante	ARIF; FAREED; RAHMAN, 2016
	<i>S. mombim</i>	Compostos fenólicos, carotenoides, potássio, magnésio, fósforo e cobre, fibras e minerais	Antioxidante	DE CARVALHO et al., 2015
			Antioxidante	TIBURSKI et al., 2011
			Gastroprotetora	BRITO et al., 2018b
	<i>S. pinnata</i>	-	Antioxidante, antimicrobiana e antitrombolítica	MANIK, MOHAMMAD K et al., 2013
		Alcanos, ácidos graxos, nonacosano	Antimicrobiana	SAMEH et al., 2019
<i>S. purpurea</i>	-	Antioxidante e antiglicação	MUÑIZ et al., 2018	
<i>S. tuberosa</i>	Ácido anacárdico	Antioxidante, quimiopreventiva, e inibidor de acetilcolinesterase	ZERAIK et al., 2016	
Casca do fruto	<i>S. purpurea</i>	-	Fotoprotetora	SILVA et al., 2016
Semente	<i>S. tuberosa</i>	Compostos fenólicos	Antioxidante	DIAS et al., 2019

-: Item não identificado

2.2 *Spondias purpurea* L.

Spondias purpurea são árvores frutíferas de médio porte que crescem naturalmente em florestas tropicais (semi-) decíduas. Nativa da América Central, México, esta espécie se distribui até América do Sul: Brasil, Bolívia e Paraguai (Figura 1), é conhecida popularmente como ciruela, ciruelo, jalisco, jocote, ciriguela ou seriguela (no Brasil). No Brasil esta espécie já foi descrita no Acre, Amazonas, Bahia e Mato Grosso do Sul (MITCHELL; DALY, 2015). Os principais dispersores desta espécie são animais de médio porte como macacos, veados, catetos, quatis, raposas, morcegos e pássaros, todavia, o principal meio de propagação desta espécie é por estacas de caule (MACÍA; BARFOD, 2000).

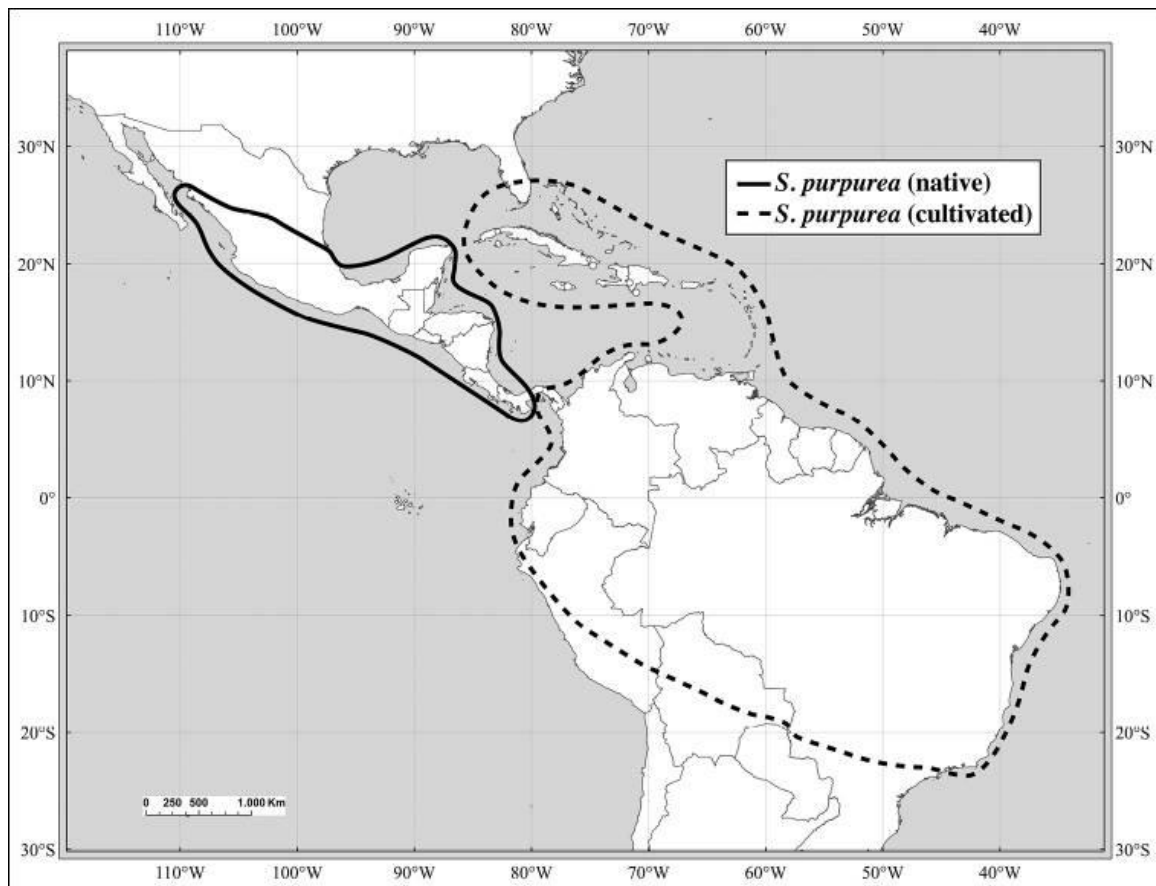


Figura 1. Distribuição geográfica da espécie *Spondias purpurea* L. (Fonte: (MITCHELL; DALY, 2015))

Esta espécie (Figura 2 A), possui: folhas formadas por folíolos ovalados que se dispõem alternadamente (Figura 2 B); tronco com característica tipo craquelado (Figura 2 C); frutos pequenos (5 cm) que, quando maduros, exibem cascas de coloração que varia do laranja ao vermelho; e polpa (mesocarpo) amarela (Figura 2 D e E).

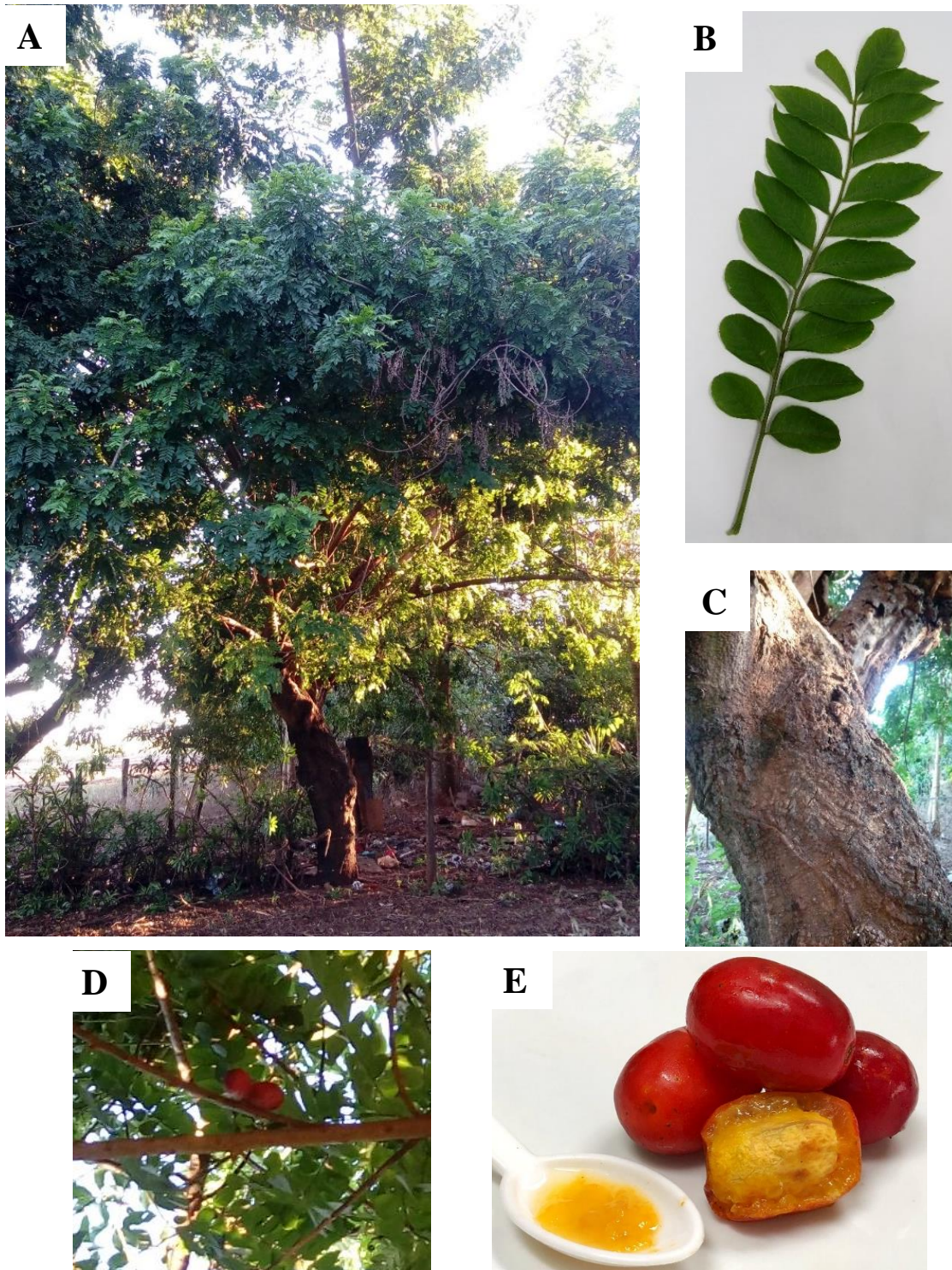


Figura 2. Aspectos gerais de *Spondias purpurea*. A) Árvore de *Spondias purpurea*; B) Folhas; C) Caule; D) Frutos e E) Frutos e polpa. Fonte Antunes, KA (2019).

As folhas e brotos jovens são usados *in natura* em saladas ou consumidos após cozimento (MACÍA; BARFOD, 2000). Seus frutos variam de laranja a vermelho, com a polpa (mesocarpo) amarela. São consumidos *in natura* ou utilizados no preparo de sucos, bebidas alcoólicas (vinhos e licores), geleias ou conservas (MACÍA; BARFOD, 2000). Popularmente essa espécie tem sido utilizada para purificar o sangue. As infusões das folhas são utilizadas para tratamento de problemas de pele, a decocção das folhas e cascas são utilizadas para febre, malária, diarreia. Além desses, também são utilizadas para fins abortivos (MITCHELL; DALY, 2015).

À *Spondias pupurea* tem sido atribuída propriedades benéficas a saúde. O extrato hexânico dos frutos dessa espécie foram descritos possuir atividade antioxidante e antiglicação *in vitro* (MUÑIZ et al., 2018) e, o extrato hexânico das folhas apresentou efeito antioxidante e antiulcerogênico sendo que esses efeitos podem estar relacionados a sua constituição química, na qual já foi identificado a presença de ácido cafeico e epigallocatequina (DE ALMEIDA et al., 2017). Todavia não há relatos sobre os efeitos biológicos de extratos aquosos desta espécie em quadros de obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e estresse oxidativo (Tabela 1).

2.3 Espécies reativas

Diversas reações químicas que ocorrem fisiologicamente no interior das células envolvem a geração de espécies reativas, como ocorre na respiração celular (ANDERSON, 1996). As espécies reativas podem apresentar em sua estrutura molecular átomos de oxigênio, formando as espécies reativas de oxigênio (EROs), átomos de nitrogênio, formando, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou átomos de enxofre, formando assim as espécies reativas de enxofre (EREs) (Tabela 2).

As ER são produzidas a partir de processos fisiológicos como respiração celular, fagocitose, inflamação, agregação de plaquetas e angiogênese (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017). As EROs são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial durante o processo de respiração celular (CADENAS; DAVIES, 2000; GAGNÉ, 2014). Esse processo representa uma das principais fontes de EROs nas células, adicionalmente são formadas em respostas aos processos inflamatórios, nas quais óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são produzidos (GAGNÉ, 2014).

Tabela 2: Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre.

	Radicalares	Não Radicalares
EROs	Superoxido ($O_2^{\bullet-}$); Hidroxila ($\bullet OH$); Peroxila (LOO^{\bullet}); Carbonato ($HCO_3^{\bullet-}$); Hidroperoxila (HO_2^{\bullet}).	Peroxido de hidrogênio (H_2O_2); Ácido hipocloroso ($HOCl$); Peroxinitrito ($ONOO^-$); Oxigênio singlete (1O_2).
ERNs	Óxido nítrico (NO^{\bullet}); Nitritos (NO_2^-); Nitratos (NO_3^-); Ácido nitroso (HNO_2).	Peroxinitrito ($ONOO^-$); Óxido nitroso (N_2O_3); Tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4).
EREs	Radical tiilo (RS^{\bullet}).	Dissulfeto ($RSSR$); Dissulfeto-S-monóxido ($RS(O)SR$); Dissulfeto-S-dióxido ($RS(O)_2SR$); Ácido sulfênico ($RSOH$).

Adaptado de Chiurchiù, V., & Maccarrone, M. (2011).

Fatores externos contribuem para a produção excessiva das espécies reativas. O consumo de dietas hipercalóricas, tabagismo, poluição, radiação, drogas, pesticidas e solventes industriais contribuem para a produção de EROs (CAROCHO; FERREIRA, 2013; HYBERTSON et al., 2011; SIES; STAHL; SEVANI, 2005). As ERNs derivam do NO, uma molécula sinalizadora que em níveis fisiológicos participa de várias funções como proliferação celular, adesão de leucócitos, agregação plaquetária, angiogênese, entre outras. O NO reage com O_2 formando $ONOO^-$ (FANG; YANG; WU, 2002).

Em baixas concentrações as EROs e ERNs apresentam efeitos fisiológicos benéficos, as quais estão relacionadas sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte de íons (LÜ et al., 2010; VALKO et al., 2007). No entanto, quando em altas concentrações, apresentam efeitos deletérios levando ao quadro conhecido como estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). As EROs podem ser reguladas através dos sistemas antioxidantes endógenos e exógenos, quando a concentração de EROs não é controlada por mecanismos de defesa, ocorrem danos oxidativos à biomoléculas e organelas (GAGNÉ, 2014; RAHA; ROBINSON, 2000), como sumarizado na Tabela 3.

Tabela 3. Efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio sob as principais biomoléculas e mitocôndria.

Estrutura	EROs	Interação com ER	Efeitos deletérios	Referência
DNA	$^1\text{O}_2$; O_2^-	Interage com as bases nitrogenadas	Quebra da cadeia de DNA, mutações genéticas e desnaturação proteica.	ABDULSALAM; THOWFEIK; MERINO, 2016
RNA	$^{\bullet}\text{OH}$; OH^- ; H_2O_2	Interage com as bases nitrogenadas	Supressão da síntese de proteínas, tradução de proteínas não funcionais.	POULSEN et al., 2012
Proteínas	H_2O_2 ; O_2^-	Oxidação de tióis e grupos carbonilos	Desnaturação proteica e inativação de fatores de transcrição	REEG; GRUNE, 2015
Lipídeos	H_2O_2 ; O_2^-	Oxidação da dupla ligação de ácidos graxos poli-insaturados	Peroxidação lipídica e formação de malondialdeído	SU et al., 2019
Mitocôndria	O_2^-	Interage com isoenzima citosólica da aconitase mitocondrial	Redução da geração de ATP mitocondrial e aumento do fluxo de glicose para lactato	RAHA; ROBINSON, 2000

O H_2O_2 apresenta baixa reatividade frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares e formar o $^{\bullet}\text{OH}$ através da dismutação do ânion radical superóxido por enzimas oxidases ou através da β -oxidação de ácidos graxos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). As mitocôndrias possuem elevados níveis de superóxido dismutase (SOD). Esta enzima possui a capacidade de dismutar o $^{\bullet}\text{OH}$ formando o H_2O_2 , e este por sua vez, sofre ação da catalase, sendo eliminado na forma de água. O H_2O_2 pode ainda, reagir com metais de transição formando o $^{\bullet}\text{OH}$ (reação de Fenton) (CHIURCHIÙ; MACCARRONE, 2011).

Dentre as EROs, o $^{\bullet}\text{OH}$ apresenta meia-vida curta, mas é considerado um subproduto altamente nocivo ao organismo devido sua alta reatividade (ŻUKOWSKI; MACIEJCZYK; WASZKIEL, 2018). Este radical promove danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas nuclear e mitocondrial (LÜ et al., 2010). No organismo, este radical pode ser formado através de dois mecanismos: Reação de Fenton ou através da hidrólise da água por exposição à radiação ionizante (SUN et al., 2008).

Outra EROs altamente deletéria é o $^1\text{O}_2$, é o estado eletricamente excitado de moléculas de oxigênio e não possui características radiculares podendo assim, induzir reações oxidativas com compostos orgânicos, sem a participação de radicais (AGNEZ-LIMA et al., 2012). Em baixas concentrações $^1\text{O}_2$ atua na defesa contra infecções, entretanto, em elevadas concentrações podem causar danos ao DNA. Os carotenóides como b-caroteno e licopeno, são compostos capazes de reter o $^1\text{O}_2$ com muita eficiência (LI; AHMED; BERNSTEIN, 2010).

Estresse oxidativo

O quadro de estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de ER e a capacidade do organismo em neutralizá-las através dos sistemas de defesa antioxidante (MILATOVIC; ZAJA-MILATOVIC; GUPTA, 2016; PIETRUCHA et al., 2017). Os danos causados pelo estresse oxidativo são principalmente sobre membranas fosfolipídicas, proteínas, carboidratos e DNA, como ilustrado pela Figura 2 (Lü et al., 2010; Craft et al., 2012).

A peroxidação lipídica é um dano oxidativo que ocorre em lipídeos de membrana celular. Os principais agentes causadores de peroxidação lipídica são peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. O HO^\bullet pode ser formado através da reação do peróxido de hidrogênio e íon ferroso, através da reação de Fenton, peroxinitrito, ou irradiação de alta energia (GREENBERG et al., 2008). O processo de peroxidação lipídica causa perda funcional de membrana, alterando sua integridade, fluidez e permeabilidade, além de modificar as lipoproteínas de baixa densidade para formas tóxicas, tornando-as pró-aterogênicas e pró-inflamatórias (GREENBERG et al., 2008). Além da peroxidação lipídica, o estresse oxidativo pode causar danos ao DNA.

Os danos causados pelas EROs ao DNA apresentam um padrão característico de modificações. O $^1\text{O}_2$ por exemplo, reage com as bases nitrogenadas do DNA pois elas são suscetíveis a danos oxidativos devido ao seu baixo potencial redox. Todavia ele interage preferencialmente com a guanina, devido ao menor potencial redox desta nucleobase (AGNEZ-LIMA et al., 2012). Esses danos são causados principalmente pelo $^\bullet\text{OH}$ proveniente da reação de Fenton. O $^\bullet\text{OH}$ juntamente com o ROO^\bullet e OH também causam oxidação no DNA (VALKO et al., 2007). Como o dano causado ao DNA pode ser, mutagênico, as células devem reparar o DNA danificado (MOORE et al., 2019), afim de evitar a senescência celular (LUO et al., 2011; VENKATACHALAM; SURANA; CLÉMENT, 2017).

Em proteínas, os danos oxidativos resultam em desnaturação e inativação de proteínas, as mais susceptíveis aos danos são as que apresentam pontes dissulfeto, tais como as enzimas transportadoras de íons de membrana: antiprotease alfa-1, calmodulina, ATPase de cálcio,

glicose-6-fosfato desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (CABISCOL et al., 2000).

Os danos moleculares causados pelo estresse oxidativo sobre lipídeos, proteínas e DNA estão relacionadas ao desenvolvimento de desordens metabólicas/doenças como obesidade, dislipidemias, diabetes, câncer, doenças inflamatórias, Alzheimer, acidente vascular cerebral, Parkinson, distrofia muscular, doenças cardiovasculares, além do envelhecimento precoce (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017; ANDRISIC et al., 2018; CHENG; JEN; TSAI, 2002).

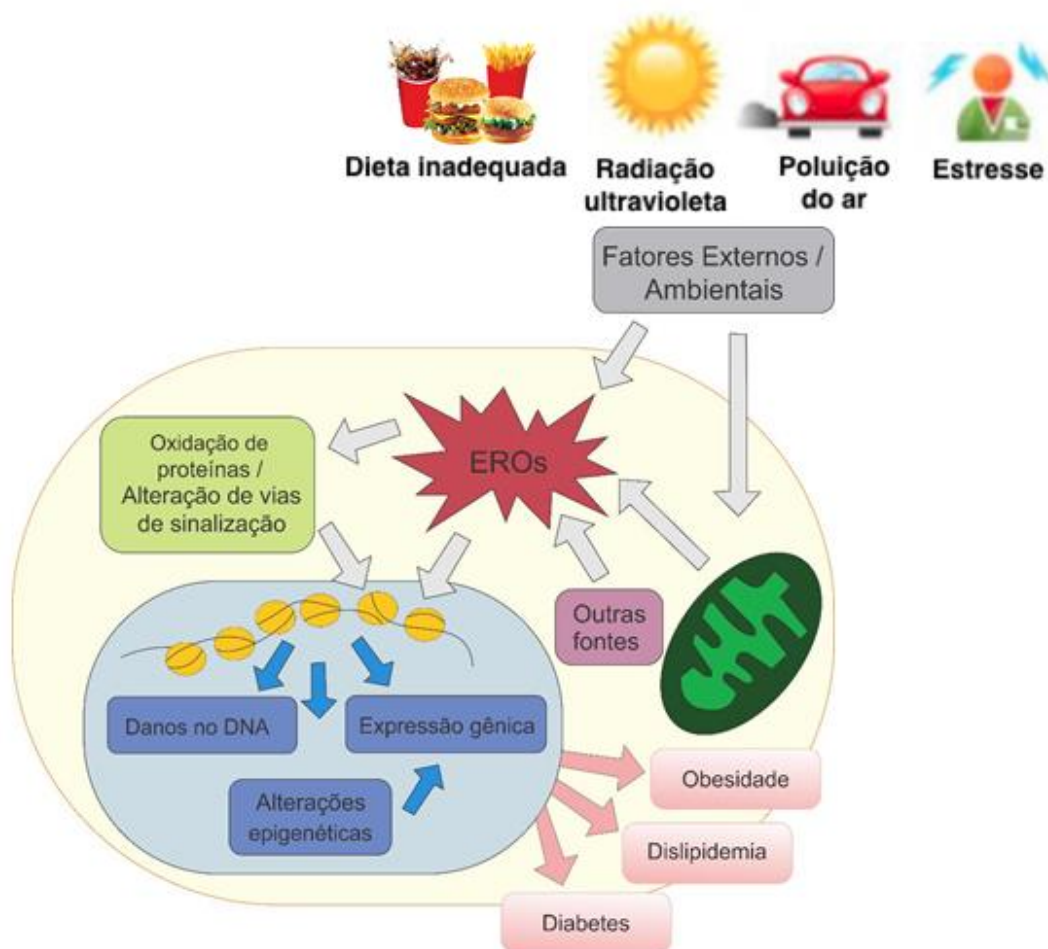


Figura 3. Efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio em biomoléculas. Adaptado de Silva et al., 2014.

2.4 Antioxidante

Durante o processo de evolução, os organismos desenvolveram sistemas antioxidantes com mecanismos altamente complexos, capazes de promover proteção contra os danos causados pelas espécies reativas às células (RAHMAN, 2007). Segundo Halliwell (2007), antioxidante é qualquer substância com capacidade de atrasar, prevenir ou remover o dano

oxidativo a uma molécula alvo. Esta substância deve apresentar a capacidade de, após a sua neutralização, formar uma nova molécula estável através de ligações moleculares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Os antioxidantes podem apresentar diferentes mecanismos de ação, atuando em diversas etapas do processo oxidativo, sendo classificados em antioxidantes primários e secundários conforme suas atuações (LUZIA; JORGE, 2009). Os antioxidantes primários têm a capacidade de inibir ou retardar a oxidação, através da doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, inativando as espécies reativas, transformando-os em moléculas estáveis, e os secundários atuam nas ligações de íons metálicos, alterando a valência dos mesmos, além de atuar na conversão de hidroperóxidos em espécies não reativas e promover proteção contra radiação ultravioleta (LUZIA; JORGE, 2009).

Outra possível classificação dos antioxidantes é quanto a sua origem, endógenos ou exógenos. Os endógenos atuam na manutenção das funções celulares, e são divididos em enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos englobam enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (LIGUORI et al., 2018). Os antioxidantes endógenos não enzimáticos englobam substâncias como a melatonina e os tiols como glutathione, tioredoxina e ácido lipóico (LIGUORI et al., 2018; LÜ et al., 2010). Quando os antioxidantes endógenos não são suficientes para neutralizar a ação das espécies reativas, a ação de antioxidantes exógenos faz-se necessária. Os antioxidantes exógenos são provenientes da dieta e os mais conhecidos são β -carotenos (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E), além dos antioxidantes derivados dos compostos fenólicos, tais como flavonoides (PISOSCHI; POP, 2015; POLJSKAK, 2011).

2.5 Propriedades nutricionais e farmacológicas de frutos

Há milhares de anos a população utiliza as plantas para fins alimentícios e medicinais, consumindo seus frutos, casca do caule, folha, raiz e flor. Sabidamente, o consumo de frutos promove impactos positivos sobre a saúde humana pois além das propriedades nutricionais, os mesmos contêm compostos bioativos com ações farmacológicas. Por este motivo, é crescente a busca por frutos com capacidade de nutrir e promover efeitos farmacológicos benéficos ao organismo (ÇALIŞKANTÜRK KARATAŞ; GÜNAY; SAYAR, 2017; PATEL, 2019).

Quando um alimento ou parte dele proporciona benefícios à saúde, sendo capaz de prevenir ou tratar doenças, é denominado alimento nutracêutico (HUGENHOLTZ; SMID, 2002). Eles podem ser compostos isolados, suplementos dietéticos, ou produtos fermentados

através de microorganismos (KWAK; JUKES, 2001). Entretanto, um alimento que apresente a capacidade de influenciar positivamente uma ou mais funções fisiológicas, devido a presença de compostos que promovam efeitos benéficos ao organismo, além de ser fonte de nutrientes ele é considerado alimento funcional (ROBERFROID, 2002).

Frente ao aumento do número de pessoas com doenças crônicas, tais como obesidade, dislipidemias e diabetes, é crescente a busca mundial por alimentos saudáveis, sendo que as empresas no ramo de alimentação têm buscado produtos com ingredientes naturais de baixo valor calórico, mas com alto valor nutricional (BELWAL et al., 2018). Neste sentido, os frutos são alimentos já consumidos pela população que apresentam capacidade nutritiva e podem apresentar outros efeitos benéficos à saúde, devido a presença de macro e micronutrientes importantes, como compostos bioativos. Um exemplo disso, são os efeitos benéficos atribuídos ao resveratrol, composto esse encontrado nas uvas com potencial anticâncer (VARONI et al., 2016).

Muitos constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas apresentam potencial antioxidante e efeitos benéficos à saúde, podendo ser utilizados no controle do estresse oxidativo. Os frutos que apresentam elevado teor de ácido ascórbico são descritos como capazes de promover efeitos benéficos antioxidantes. Frutos de groselha (*Ribes sp.*) apresentam em sua constituição química compostos fenólicos e elevado teor de ácido ascórbico, podendo ser esses constituintes os responsáveis pela sua atividade antioxidante (ORSAVOVÁ et al., 2019). Frutos de *Ziziphus jujuba*, conhecido como jujuba, apresentam atividade antioxidante, em sua constituição química foram identificados a presença de compostos fenólicos e flavonoides (RECHE et al., 2018).

Os frutos cítricos também são descritos como uma boa fonte de antioxidantes naturais (ZOU et al., 2016), capazes de inibir ou minimizar efeitos oxidativos. Além da capacidade antioxidante, outras propriedades são descritas aos frutos, como o efeito antioxidante, antidiarreica e hepatoprotetora dos frutos de *Campomanesia adamantium* (DE OLIVEIRA FERNANDES et al., 2015; LESCANO et al., 2016). Além disso, diferentes frutos do gênero *Spondias* apresentam efeitos antiglicação (MUÑIZ et al., 2018). Todavia, outras partes das plantas também apresentam compostos com ações farmacológicas.

2.6 Propriedades farmacológicas atribuídas a cascas do caule

Assim como nos frutos, as propriedades farmacológicas de outras partes das plantas são atribuídas aos seus constituintes químicos, os quais têm contribuído para a obtenção de novos

fármacos. Um exemplo clássico é o uso da *Papaver somniferum* conhecida como papoula, desta planta é extraída o ópio, uma mistura de alcaloides, dentre eles está a morfina, codeína e a papaverina, as quais são utilizadas para o tratamento da dor (GROTHER; LENZ; KUTCHAN, 2001).

Outra planta que deu origem a um medicamento clássico é a *Salix alba*, fonte da aspirina. O salicósido presente na planta é convertido em ácido salicílico, composto semelhante ao composto sintético ácido acetilsalicílico, que apresenta ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica (JACK, 1997). Entretanto, características como período de sazonalidade para frutos e período caducifólio para as folhas, tornam interessante o estudo da casca do caule de diversas plantas, pois estes se mantem de forma perene ao longo do ano.

Rhus tripartita é uma planta pertencente à família Anacardiaceae, muito utilizada na medicina tradicional árabe. A casca do caule desta planta apresenta compostos bioativos responsáveis pelo seu efeito citoprotetor, podendo contribuir para prevenção de doenças cardiovasculares (ALQAHTANI et al., 2019). Outra espécie desta família é a *Lannea barteri*, utilizada popularmente para minimizar os sintomas da epilepsia, na sua casca do caule foram identificados diversos constituintes como flavonóides, alcalóides, taninos, saponinas e glicosídeos, que podem se responsáveis pela ação anticonvulsivante (GARBA; YARO; YA'U, 2015).

Além dos efeitos farmacológicos descritos anteriormente, o extrato da casca de outras espécies tem sido investigado frente aos parâmetros da síndrome metabólica. Ojewole (2003), descreveu a ação anti-inflamatória e hipoglicemiante para o extrato aquoso da casca do caule de *Sclerocarya birrea* (OJEWOLE, 2003a, 2003b). Adicionalmente, foram observados efeitos antidiabéticos do extrato da casca do caule de *Spondias tuberosa* (DE MOURA BARBOSA et al., 2018). Outra espécie do gênero *Spondias* com ação farmacológica atribuída a sua casca do caule é a *Spondias pinnata*, a qual apresenta efeitos anti-hiperlipidêmico e insulinoatrópico, além de ser capaz de promover a regeneração de células β do pâncreas (ATTANAYAKE et al., 2014).

Assim, estudos que elucidem as ações farmacológicas das diferentes partes de plantas, tornam-se plausíveis, uma vez que os constituintes químicos podem se apresentar distribuídos de forma específica em cada parte da planta. Além disso, estudos com frutos agregam valor econômico aos mesmos e, as cascas do caule estão disponíveis o ano todo.

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o potencial farmacológico de *Spondias purpurea* L.

ESPECÍFICOS

Determinar a composição centesimal dos frutos de *S. purpurea*;

Identificar a constituição química do extrato aquoso dos frutos e da casca do caule de *S. purpurea*;

Investigar a atividade antioxidante do extrato aquoso dos frutos e da casca do caule de *S. purpurea*;

Avaliar a toxicidade do extrato aquoso dos frutos de *Spondias purpurea* frente ao modelo *Caenorhabditis elegans*;

Avaliar a ação protetora do extrato aquoso dos frutos de *Spondias purpurea* frente ao modelo *C. elegans* induzido ao estresse oxidativo por juglone;

Avaliar a ação protetora do extrato aquoso dos frutos de *S. purpurea* frente ao modelo *C. elegans* induzido ao estresse oxidativo por choque térmico;

Avaliar a toxicidade do extrato aquoso da casca do caule de *S. purpurea* em camundongos fêmeas;

Investigar os efeitos metabólicos do extrato aquoso da casca do caule de *S. purpurea* em camundongos machos alimentados com dieta hipercalórica.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULSALAM, S. F.; THOWFEIK, F. S.; MERINO, E. J. Excessive reactive oxygen species and exotic DNA lesions as an exploitable liability. **Biochemistry**, v. 55, n. 38, p. 5341–5352, 2016.

AGNEZ-LIMA, L. F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research. Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 1, p. 15–28, set. 2012.

ALQAHTANI, A. S. et al. Proanthocyanidins from the stem bark of *Rhus tripartita* ameliorate methylgloxal-induced endothelial cell apoptosis. **Journal of Food and Drug Analysis**, 17 mar. 2019.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 103–108, 19 fev. 1996.

ANDRADE, S. F. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 464–471, 12 fev. 2007.

ANDRÉ-LÉVIGNE, D. et al. Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 15 out. 2017.

ANDRISIC, L. et al. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. **Redox Biology**, v. 14, p. 47–58, 2018.

ARIF, M.; FAREED, S.; RAHMAN, MD. A. Stress relaxant and antioxidant activities of acid glycoside from *Spondias mangifera* fruit against physically and chemically challenged albino mice. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 58–63, 2016.

ASUQUO, O. R et al. Effects of *Spondias Mombin* Leaf Extract on the Cytoarchitecture of the Cerebral Cortex and on Learning and Memory in Wistar Rats. **International Journal of Science and Research**, v. 2, n. 9, p. 5–8, 2013.

ATTANAYAKE, A. P. et al. Study of antihyperglycaemic activity of medicinal plant extracts in alloxan induced diabetic rats. **Ancient Science of Life**, v. 32, n. 4, p. 193–198, 2013.

ATTANAYAKE, A. P. et al. Antihyperglycaemic, antihyperlipidaemic and β 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, 1 out. 2014.

AYOKA, A. O. et al. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 166–175, 16 jan. 2006.

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

- BELWAL, T. et al. Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia spp.*) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 99–106, 1 abr. 2018.
- BRITO, S. A. et al. Antiulcer Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 26 abr. 2018a.
- BRITO, S. A. et al. Evaluation of gastroprotective and ulcer healing activities of yellow mombin juice from *Spondias mombin* L. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 5 nov. 2018b.
- CABISCOL, E. et al. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 35, p. 27393–27398, 1 set. 2000.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 3–4, p. 222–230, ago. 2000.
- ÇALIŞKANTÜRK KARATAŞ, S.; GÜNAY, D.; SAYAR, S. *In vitro* evaluation of whole faba bean and its seed coat as a potential source of functional food components. **Food Chemistry**, v. 230, p. 182–188, 1 set. 2017.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 51, p. 15–25, jan. 2013.
- CHAUDHURI, D. et al. Methyl gallate isolated from *Spondias pinnata* exhibits anticancer activity against human glioblastoma by induction of apoptosis and sustained extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 42, p. 269–276, 2015.
- CHAUDHURI, D. et al. Role of phenolics from *Spondias pinnata* bark in amelioration of iron overload induced hepatic damage in Swiss albino mice. **BMC Pharmacology & Toxicology**, v. 17, 26 jul. 2016.
- CHENG, F.-C.; JEN, J.-F.; TSAI, T.-H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. **Journal of Chromatography B**, Indicators of (patho)physiological processes. v. 781, n. 1, p. 481–496, 5 dez. 2002.
- CHIURCHIÙ, V.; MACCARRONE, M. Chronic Inflammatory Disorders and Their Redox Control: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, p. 2605–41, 1 mar. 2011.
- DA COSTA CORDEIRO, B. M. P. et al. Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, 19 out. 2018.
- DA SILVA, A. R. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740–746, jun. 2012.
- DA SILVA SIQUEIRA, EMERSON MICHELL et al. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-

inflammatory activity. - PubMed - NCBI. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 10, p. 1656–1665, 27 maio 2016.

DE ALBUQUERQUE et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

DE ALMEIDA, C. L. F. et al. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 6593073, 2017.

DE CARVALHO, J. M. et al. Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) tropical juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 1182–1187, fev. 2015.

DE MOURA BARBOSA, H. et al. *Spondias tuberosa* inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 248–257, 5 dez. 2018.

DE OLIVEIRA FERNANDES, T. et al. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 184–193, 1 jan. 2015.

DIAS, J. L. et al. Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO₂, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, p. 10–18, 1 mar. 2019.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 18, n. 10, p. 872–879, out. 2002.

GAGNÉ, F. Chapter 6 - Oxidative Stress. In: GAGNÉ, F. (Ed.). **Biochemical Ecotoxicology**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 103–115.

GARBA, K.; YARO, A. H.; YA'U, J. Anticonvulsant effects of ethanol stem bark extract of *Lannea barteri* (Anacardiaceae) in mice and chicks. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 227–231, 22 ago. 2015.

GHATE, N. B. et al. *In vitro* anticancer activity of *Spondias pinnata* bark on human lung and breast carcinoma. **Cytotechnology**, v. 66, n. 2, p. 209–218, mar. 2014.

GREENBERG, M. E. et al. The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 4, p. 2385–2396, 25 jan. 2008.

GROTHER, T.; LENZ, R.; KUTCHAN, T. M. Molecular Characterization of the Salutaridinol 7-O-Acetyltransferase Involved in Morphine Biosynthesis in Opium Poppy *Papaver somniferum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30717–30723, 17 ago. 2001.

GUPTA, S. et al. Nutritional importance of underutilized fruits: “*Spondias axillaris* and *Eriolobus indica*” of Uttarakhand hills. 22 jan. 2019.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. In: **Methods in Enzymology**. Oxygen Radicals in Biological

Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. [s.l.] Academic Press, 1990. v. 186p. 1–85.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, p. 63, 9 dez. 2008.

HAZRA, B.; SARKAR, R.; MANDAL, N. *Spondias pinnata* stem bark extract lessens iron overloaded liver toxicity due to hemosiderosis in Swiss albino mice. **Annals of Hepatology**, v. 12, n. 1, p. 123–129, fev. 2013.

HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 497–507, out. 2002.

HYBERTSON, B. M. et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxidative Damage and Disease. v. 32, n. 4, p. 234–246, 1 ago. 2011.

IQBAL, S. S. et al. Protection of hepatotoxicity using *Spondias pinnata* by prevention of ethanol-induced oxidative stress, DNA-damage and altered biochemical markers in Wistar rats. **Integrative Medicine Research**, v. 5, n. 4, p. 267–275, dez. 2016.

ISHOLA, I. O.; IKUOMOLA, B. O.; ADEYEMI, O. O. Protective role of *Spondias mombin* leaf and *Cola acuminata* seed extracts against scopolamine-induced cognitive dysfunction. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 27–39, 1 mar. 2018.

ISLAM, S. MD. A. et al. 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, set. 2013.

JACK, D. B. One hundred years of aspirin. **The Lancet**, v. 350, n. 9075, p. 437–439, 9 ago. 1997.

KURZ. et al. Comparative Study of AntiPyretic Activity between Acetone and Ethanol Stem Bark Extracts of *Spondias pinnata* (Linn . F). **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 26–32, 2014.

KWAK, N.-S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 99–107, 1 mar. 2001.

LESCANO, C. H. et al. *Campomanesia adamantium* Peel Extract in Antidiarrheal Activity: The Ability of Inhibition of Heat-Stable Enterotoxin by Polyphenols. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 20 out. 2016.

LI, B.; AHMED, F.; BERNSTEIN, P. S. Studies on the singlet oxygen scavenging mechanism of human macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, n. 1, p. 56–60, 1 dez. 2010.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 26 abr. 2018.

- LÜ, J.-M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840–860, abr. 2010.
- LUO, Y. et al. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 11, p. 860–867, nov. 2011.
- LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 946–949, 2009.
- MACÍA, M. J.; BARFOD, A. S. Economic botany of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) in ecuador. **Economic Botany**, v. 54, n. 4, p. 449–458, 1 out. 2000.
- MANIK, MOHAMMAD K et al. Investigation of in vitro antioxidant, antimicrobial and thrombolytic activity of the exocarp of *Spondias pinnata* (Anacardiaceae). **Canadian Chemical Transactions**, v. 1, p. 191–201, 17 set. 2013.
- MARQUES, L. G.; SILVEIRA, A. M.; FREIRE, J. T. Freeze-Drying Characteristics of Tropical Fruits. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 457–463, 1 maio 2006.
- MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. **PhytoKeys**, n. 55, p. 1–92, 5 ago. 2015.
- MOORE, S. et al. The CHD6 chromatin remodeler is an oxidative DNA damage response factor. **Nature Communications**, v. 10, 2019.
- MUÑIZ, A. et al. Antioxidant Activity and *In Vitro* Antiglycation of the Fruit of *Spondias purpurea*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2018, p. 5613704, 2018.
- OJEWOLE, J. A. O. Hypoglycemic effect of *Sclerocarya birrea* {(A. Rich.) Hochst.} [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in rats. **Phytomedicine**, v. 10, n. 8, p. 675–681, 1 jan. 2003a.
- OJEWOLE, J. A. O. Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. (family: Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2, p. 217–220, 1 abr. 2003b.
- OJO, O. A. et al. Inhibitory Effects of Solvent-Partitioned Fractions of Two Nigerian Herbs (*Spondias mombin* Linn. and *Mangifera indica* L.) on α -Amylase and α -Glucosidase. **Antioxidants**, v. 7, n. 6, 26 maio 2018.
- ORSAVOVÁ, J. et al. Contribution of phenolic compounds, ascorbic acid and vitamin E to antioxidant activity of currant (*Ribes* L.) and gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.) fruits. **Food Chemistry**, v. 284, p. 323–333, 30 jun. 2019.
- PAKOUSSI, T. et al. How do *Spondias mombin* L (Anacardiaceae) leaves extract increase uterine smooth muscle contractions to facilitate child birth in parturient women? **African Health Sciences**, v. 18, n. 2, p. 235–243, jun. 2018.

- PANDA, B. K. et al. 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.
- PATEL, S. Anti-Obesity and Anti-Diabetes Foods: High Fibre Diets. In: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. (Eds.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Oxford: Academic Press, 2019. p. 248–252.
- PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 427318, 2014.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 5 jun. 2015.
- POLJSAK, B. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2011, p. 194586, 2011.
- POULSEN, H. E. et al. RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1353–1361, 15 abr. 2012.
- RAHA, S.; ROBINSON, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 10, p. 502–508, 1 out. 2000.
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, jun. 2007.
- RECHE, J. et al. Physicochemical and nutritional composition, volatile profile and antioxidant activity differences in Spanish jujube fruits. **LWT**, v. 98, p. 1–8, 1 dez. 2018.
- REEG, S.; GRUNE, T. Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 3, p. 239–255, 2015.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 34 Suppl 2, p. S105-110, set. 2002.
- SABIU, S. et al. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Protective roles of *Spondias mombin* and *Ficus exasperata*. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 261–267, 8 jan. 2015.
- SAMEH, S. et al. Genus *Spondias*: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2018, 12 fev. 2018.
- SAMEH, S. et al. Comparative metabolic profiling of essential oils from *Spondias pinnata* (Linn. F.) Kurz and characterization of their antibacterial activities. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 468–474, 1 out. 2019.
- SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 5, p. 969–972, maio 2005.
- SILVA, R. V. et al. In vitro photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 509–514, 1 maio 2016.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1381–1478, 1 out. 2004.

SU, L. J. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

SULTAN, S. Reviewing the Protective Role of Antioxidants in Oxidative Stress Caused by Free Radicals. **Asian Pacific Journal of Health Sciences**, v. 1, p. 401–406, 1 out. 2014.

TALEB, A. et al. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 689–698, 1 jun. 2018.

TIBURSKI, J. H. et al. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, Exotic Fruits: their Composition, Nutraceutical and Agroindustrial Potential. v. 44, n. 7, p. 2326–2331, 1 ago. 2011.

TROPICOS. **Tropicos**. Disponível em: <<http://tropicos.org/NameSearch.aspx?name=spondias&commonname=>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

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, set. 2008.

UDDIN, J. et al. Correlation of Thrombolytic and Membrane Stabilizing Activities with Total Flavonoid Content Aerial Parts of *Spondias pinnata*. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 1, p. 48–52, 10 ago. 2016.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 1 jan. 2007.

VARONI, E. M. et al. Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, 12 abr. 2016.

VENKATACHALAM, G.; SURANA, U.; CLÉMENT, M.-V. Replication stress-induced endogenous DNA damage drives cellular senescence induced by a sub-lethal oxidative stress. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 18, p. 10564–10582, 13 out. 2017.

WHO. **Traditional Medicine**. Disponível em: <<https://www.afro.who.int/health-topics/traditional-medicine>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ZERAIK, M. L. et al. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 396–405, 1 mar. 2016.

ZOU, Z. et al. Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 885–896, 1 abr. 2016.

5 APÊNDICES

5.1 Fruto de *Spondias purpurea* L.: alimento nutracêutico capaz de inibir estresse oxidativo

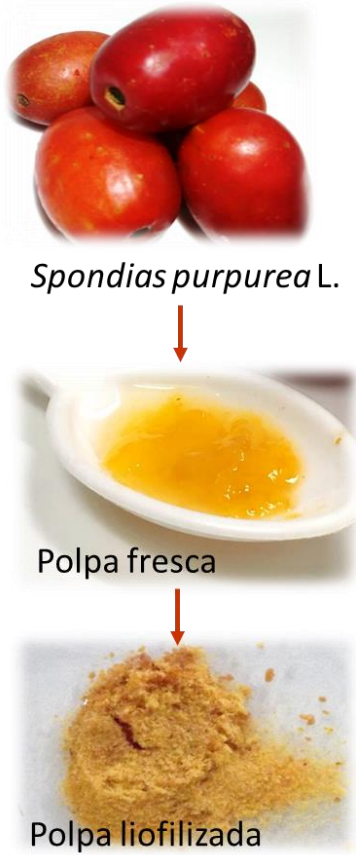
Submissão prevista para revista: *Food Chemistry*

Qualis-Capes: A2

Fator de impacto: 4.946

Escopo da revista disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/03088146/guide-for-authors>

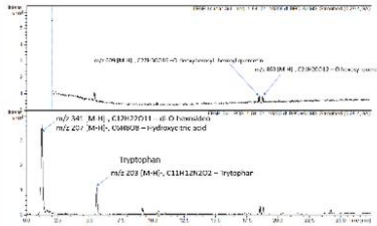
Resumo gráfico:



- ✓ Polpa fresca e liofilizada
- Alto valor nutricional
- Presença de ácido ascórbico, fenóis totais e flavonoides

EPSp
 Extrato aquoso da polpa liofilizada

✓ Fenóis totais e Flavonoides
 CLAE



Atividade antioxidante

✓ *In vitro*
 Captura direta de radicais livres
 — Danos a biomoléculas

✓ *In vivo (sem efeitos tóxicos)*
C. elegans

— Danos oxidativos induzidos por Juglone e estresse térmico

Fruto de *Spondias purpurea* L.: alimento nutracêutico capaz de reduzir danos do estresse oxidativo

Kátia Ávila Antunes, Débora da Silva Baldivia, Alex Santos Oliveira, Caio Fernando Ramalho de Oliveira, José Tarcísio Giffoni de Carvalho Júnior, Eliana Janet Sanjinez Argandoña, Denise Brentan da Silva, Edson Lucas dos Santos, Kely de Picoli Souza

RESUMO

Frutos são alimentos consumidos pela população que apresentam compostos antioxidantes em concentração e composição variadas subsidiando suas propriedades nutracêuticas. O objetivo deste trabalho foi determinar a composição centesimal da polpa fresca e liofilizada, identificar os compostos químicos, avaliar atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e a toxicidade do extrato aquoso da polpa dos frutos de *Spondias purpurea*. Foram determinados a composição centesimal, índice de acidez, teor de ácido ascórbico (AA), fenóis totais e flavonoides da polpa fresca e liofilizada. A identificação dos compostos químicos do extrato aquoso da polpa liofilizada (EPSp) foi analisado por CLAE-MS/MS e avaliado a atividade antioxidante pelos métodos de ABTS, DPPH, oxidação de BSA e fragmentação de DNA. A toxicidade aguda do EPSp foi investigada em *Caenorhabditis elegans*. A atividade antioxidante do EPSp foi avaliada através dos ensaios de estresse oxidativo induzido por juglone e resistência ao estresse térmico em *C. elegans*. Verificamos que o processo de liofilização aumentou os compostos nutricionais e antioxidantes na polpa liofilizada. Foram identificados no EPSp a presença de triptofano, ácido hidroxicítrico, di-O-hexosídeo, O-desoxihexosil-hexosil quercetina e O-hexosil quercetina. O EPSp apresentou nos ensaios de ABTS e DPPH atividade antioxidante e capacidade de inibir danos oxidativos em proteínas e DNA. Não foram observados efeitos tóxicos em *C. elegans*. Adicionalmente, o EPSp reduziu os danos oxidativos causados por juglone e promoveu a proteção contra o choque térmico em *C. elegans*. Os compostos presentes no EPSp provavelmente são responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e proteção das biomoléculas observadas neste estudo, o que fortalece a indicação de consumo do fruto de *S. purpurea*.

Palavras-chave: Seriguela; Antioxidante; Estresse oxidativo; Plantas medicinais; Bioprospecção

1. Introdução

Uma dieta balanceada rica em frutos e verduras promove impactos positivos sobre a saúde humana. Por este motivo, é crescente a busca por frutos com a capacidade de nutrir e promover efeitos benéficos no organismo mediados por seus constituintes químicos (Çalışkantürk Karataş et al., 2017; Patel, 2019).

Um número crescente de frutos tem sido descrito por apresentarem propriedades funcionais e resultarem em benefícios à saúde, como redução do estresse oxidativo, diminuindo o aparecimento ou progressão de diversas outras doenças relacionadas ao quadro (Pham-Huy et al., 2008). Frutos como cajá (*Spondias mombin* L.); açaí (*Euterpe oleracea* Mart), amora preta (*Rubus* spp.) e jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) apresentam elevada atividade antioxidante (Dantas et al., 2019; Martinez et al., 2018; Pereira et al., 2016). Dentre os constituintes químicos presentes nesses frutos estão diversas moléculas antioxidantes como carotenoide, catequina e quercetina (Garzón et al., 2017; Hauck Tiburski et al., 2011).

Algumas limitações relativas à oferta de frutos nutracêuticos como flutuação sazonal da produção e perdas pós-colheitas, podem ser minimizadas com o uso de metodologias de conservação de alimentos. Dentre elas, a liofilização apresenta uma série de vantagens, como a manutenção dos níveis de nutrientes sensíveis a temperatura, cor, sabor e textura (Marques et al., 2006). Por este motivo, a liofilização tem sido utilizada para a desidratação de produtos com alto valor de mercado, como cogumelos e morangos (Hammami & René, 1997; H. Wang et al., 2015).

Spondias purpurea (Anacardiaceae), conhecida popularmente como seriguela, é uma árvore nativa da América Central. Espécie exótica amplamente distribuída no Brasil, apresenta baixo custo de produção e alta resistência a seca (Muñiz et al., 2018; Vargas-Simón, 2018). O período de frutificação varia de dezembro à março, seus frutos maduros apresentam casca vermelha e polpa amarela, sendo apreciados e consumidos *in natura* pela população.

O extrato hexânico dos frutos de *S. purpurea* apresentou atividade antioxidante e antiglicação (Muñiz et al., 2018), além disso, o extrato hexânico das folhas também exibiu atividade antioxidante e antiucrogênica (de Almeida et al., 2017). No entanto, ainda são pouco conhecidas as propriedades nutracêuticas, funcionais e possível toxicidade dos frutos de *S. purpurea*. Por este motivo, investigamos a composição centesimal da polpa fresca e liofilizada dos frutos de *S. purpurea* bem como a

constituição química, a atividade antioxidante e os possíveis efeitos tóxicos do extrato aquoso da polpa dos frutos de *S. purpurea*.

2. Material e métodos

2.1 Amostra vegetal

Frutos maduros de *S. purpurea* foram coletados na cidade de Itaporã-MS, Brasil (21° 54'33.3"S e 54°42'04.9"W), no mês de fevereiro de 2014. Uma exsicata da planta foi depositada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados sob o número 5461.

Após a coleta, os frutos foram selecionados, sanitizados, despulpados e a polpa dividida em duas partes, sendo uma porção acondicionada em sacos de polietileno e armazenada em freezer -20 °C até o seu uso e a outra submetida ao processo de liofilização.

2.2 Preparo do extrato aquoso da polpa de *Spondias purpurea*

O extrato aquoso da polpa de *S. purpurea* (EPSp) foi preparado a partir da polpa liofilizada. Uma quantidade equivalente a 100 g da polpa liofilizada foi adicionada em 1 L de água destilada a temperatura ambiente e homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro durante 10 min. Posteriormente a solução foi filtrada, congelada, liofilizada e armazenada em freezer -20 °C até o seu uso. Rendimento 23%.

2.3 Reagentes

AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride), ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), Acrilamida Bis-Acrilamida, BSA, Catequina, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), PSA, SDS e TEMED, foram adquiridos da Sigma. Ácido ascórbico, ácido gálico, ácido sulfúrico, carbonato de sódio, cloreto de alumínio, DCFI (2,6-diclorofenol indofenol), Folin-Ciocalteu, hexano, hidróxido de sódio, metanol, peróxido de hidrogênio quercetina foram utilizados em grau analítico.

2.4 Composição centesimal da polpa fresca e liofilizada

A composição centesimal de cada amostra, polpa fresca e polpa liofilizada, foi determinada através do teor de umidade, cinzas, fibras totais, lipídios, proteínas e

percentagem de hidratos de carbono como descrito a seguir. Todos os parâmetros foram determinados em experimentos realizados em triplicata.

2.4.1 Umidade

Para determinar o teor de umidade, 3 g de cada amostra foram mantidas em estufa com circulação de ar a 60 ° C durante 6 h. Após este período, as amostras foram transferidas para um dessecador contendo gel de sílica. Depois de atingir a temperatura ambiente, as amostras foram pesadas e devolvidas à câmara aquecida. O procedimento de aquecimento e resfriamento foi repetido até as amostras atingirem massa constante. O teor de umidade foi determinado segundo a equação 1:

$$Umidade (\%) = \left(\frac{(peso\ inicial - peso\ final)}{peso\ inicial} \right) \times 100 \quad Eq. 1$$

2.4.2 Cinzas

Aproximadamente 3 g de cada amostra foram carbonizadas em forno de mufla à 550 ° C por 7 h até que o material tornasse branco ou cinza claro. Após este período, as amostras foram transferidas para um dessecador contendo gel de sílica. Após atingir a temperatura ambiente, as amostras foram pesadas para determinar o teor de cinzas por diferença entre massa inicial e massa final. O teor de cinzas foi determinado segundo a equação 2:

$$Cinzas (\%) = \left(\frac{(peso\ inicial - peso\ final)}{peso\ inicial} \right) \times 100 \quad Eq. 2$$

2.4.3 Fibras totais

Aproximadamente 1 g de cada amostra foi submetida ao aparelho determinador de fibras (TE-149). Colocou-se ácido sulfúrico 1,5% e, após 30 min em temperatura de 98 °C, a solução foi drenada, as amostras foram então lavadas duas vezes com água fervente. Em seguida, adicionou hidróxido de sódio a 1,5%, após 30 min a 98 °C, a solução foi drenada e as amostras lavadas duas vezes em água fervente. As amostras foram lavadas com acetona, levadas a estufa a 105 °C por 24 h. Posteriormente as amostras foram transferidas para dessecador contendo gel de

sílica e ao atingir a temperatura ambiente foram pesadas e o teor de fibras totais determinado segundo a equação 3:

$$Fibra\ bruta\ (\%) = \left(\frac{(peso\ inicial - peso\ final)}{peso\ inicial} \right) \times 100 \quad Eq. 3$$

2.4.4 Proteínas

Em um tubo de Kjeldahl foram adicionados 0,2 g de amostra, seca e desengordurada, e 7 mL de solução digestora. Esta solução foi mantida em bloco digestor a 400 °C até o término do processo de digestão. Os tubos contendo as amostras digeridas foram transferidos para um sistema de destilação de Kjeldahl e neutralizados com NaOH 40%. A destilação foi realizada até a obtenção de 100 mL de destilado em erlenmeyer contendo 10 mL de solução receptora. O destilado, foi titulado com uma solução de ácido clorídrico até a mudança de cor.

O teor de proteína das amostras foi mensurado de acordo com a Eq. (4), em que V = volume de ácido clorídrico em mL; 0,1 = N do HCl; 0,014 = fator de correção; e 6,25 = fator de conversão de nitrogênio em proteína.

$$Proteina\ (\%) = \left(\left(\frac{V \times 0,1 \times 0,014}{peso\ amostra} \right) \times 6,25 \right) \times 100 \quad Eq. 4$$

2.4.5 Lipídeos

Quantidades de aproximadamente 3 g de cada amostra seca foram colocadas em folhas de papel de filtro e acondicionadas no extrator de lipídeos tipo Soxhlet (Marconi), acoplado a um copo de reboiler previamente pesado. Foi então, adicionado cerca de 250 mL de hexano. Um condensador foi conectado ao copo e este foi aquecido sobre uma placa elétrica por 2 h. No final da extração, as amostras foram suspensas por 30 min e em seguida o hexano foi recolhido e os copos contendo lipídeos foram transferidos para estufa de circulação de ar por 2 h. Após este período foram transferidos para um dessecador com gel de sílica. Ao atingir a temperatura ambiente, os copos foram pesados e o teor lipídico calculado segundo a equação 5:

$$Lipideos\ (\%) = \left(\frac{(reboiler\ final - reboiler\ inicial)}{peso\ amostra} \right) \times 100 \quad Eq. 5$$

2.4.6 Carboidratos

O teor total de carboidratos das amostras foi calculado segundo a equação 6:

$$\text{carboidratos (\%)} = 100 - (\text{umidade} + \text{cinza} + \text{proteína} + \text{lipídeo}) \quad \text{Eq. 6}$$

2.5 Teor de ácido ascórbico

O conteúdo de ácido ascórbico das amostras foi determinado utilizando o reagente *Tillmans*. Neste ensaio, uma solução de ácido oxálico a 4% foi utilizada para diluição das amostras, posteriormente as amostras foram tituladas com a solução de 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI), conhecido como reagente *Tillmans*. O ponto final da titulação foi detectado pela mudança de cor da solução de incolor para rosa persistente. O teor de ácido ascórbico foi determinado através da equação 7, onde: DCFI a= volume de DCFI utilizado na amostra; DCFI p= volume de DCFI utilizado na amostra padrão; m (AO)= massa do ácido oxálico; A= amostra.

$$\text{AA (mg. 100 g de A)} = \left(\frac{\text{DCFI a}}{\text{DCFI p}} \right) \times \left(\frac{100}{A} \right) \times \left(\frac{m(\text{AO}) + A}{m \text{ solução}} \right) \times \left(\frac{50}{10} \right) \times 1,02 \quad \text{Eq. 7}$$

2.6 Índice de acidez

O índice de acidez foi determinado com solução de NaOH (40%), previamente padronizada, e indicador de fenolftaleína, segundo metodologia proposta pelas Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz. Em 2 g de amostras foi adicionado 25 mL de éter/álcool (2:1 v:v) e 2 gotas de fenolftaleína 0,1 mol. Em seguida a solução foi titulada com NaOH 0,1 mol. O ensaio foi realizado em triplicata e o índice de acidez determinado segundo a equação 8:

$$\text{Índice de acidez (\%)} = \left(\frac{v \text{ titulação} \times \text{fator do NaOH} \times 6,61}{\text{amostra}} \right) \quad \text{Eq. 8}$$

2.7 Determinação de compostos fenólicos e flavonoides

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu segundo método descrito por Meda et al., 2005, com modificações. Neste ensaio, 500 µL de amostra foram adicionados em 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) e após 5 min foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio (14%). A

mistura foi agitada em vortex e incubada por 2 h ao abrigo da luz em temperatura ambiente, em seguida foi mesurada a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 760 nm (T70 UV/VIS). O ácido gálico foi utilizado como padrão e o resultado foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EGA g^{-1} extrato). O ensaio foi realizado em triplicata.

O conteúdo de flavonoides foi determinado utilizando o método descrito por (Liberio et al., 2011), com algumas modificações. Neste ensaio amostra foi preparada em uma concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol 100%. Uma alíquota de 0,5 mL dessa solução foi adicionada a 4,5 mL de cloreto de alumínio (2%) e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 min. A absorbância da amostra foi mesurada a 415 nm. A quercetina foi utilizada como padrão e o resultado foi expresso em miligrama equivalentes de quercetina por grama de extrato (mg EQ g^{-1} extrato). O ensaio foi realizado em triplicata.

2.8 Isolamento e identificação dos compostos presentes no EPSp

Uma amostra de EPSp foi injetado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) analítico (Shimadzu), equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A (DAD), controlador CBM-20A e forno CTO-20A. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massa microTOFIII (Bruker Daltonics). Esta técnica de química analítica permite combinar as capacidades de separação da cromatografia líquida com as capacidades analíticas da espectrometria de massas. A interpretação do cromatograma com os respectivos tempos de retenção e as massas dos compostos foram comparadas a padrões de substâncias puras para a determinação e identificação dos compostos presentes no EPSp.

2.9 Atividade Antioxidante

2.9.1 Captura do radical ABTS e DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de ABTS e DPPH. A capacidade de eliminação dos radicais livres ABTS foi determinada através do método descrito por (Rufino et al., 2010). Neste ensaio, $20 \mu\text{L}$ de amostra em diferentes concentrações foram adicionadas a $1.980 \mu\text{L}$ de solução do radical ABTS. Esta solução foi incubada por 6 min ao abrigo da luz e a absorbância determinada a 734

nm. A porcentagem de inibição do radical ABTS foi determinado segundo a equação 9:

$$\text{inibição ABTS (\%)} = \left(1 - \frac{(\text{Abs amostra})}{(\text{Abs controle})} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 9}$$

A capacidade de eliminação dos radicais livres DPPH foi determinado através do método descrito por (D. Gupta & Gupta, 2011). Neste ensaio, 200 μL de amostras foram adicionados a 1.800 μL de solução do radical DPPH. Esta solução foi incubada por 30 minutos ao abrigo da luz e sua absorvância determinada a 517 nm e a porcentagem de inibição do radical DPPH calculada segundo a equação 10:

$$\text{inibição DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{(\text{Abs amostra})}{(\text{Abs controle})} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 10}$$

2.9.2 Oxidação de BSA induzido por AAPH

Albumina de soro bovino (BSA, 7 μg) foi incubada durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ com diferentes concentrações do EPSp (10-2.000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Após este período, o agente oxidante AAPH foi adicionado na concentração de 75 mM e seguiu-se uma nova incubação de 60 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente as amostras foram incubadas com tampão de amostra durante 3 min a 95 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Posteriormente o gel foi digitalizado utilizando o fotodocumentador Gel Doc™ EZ System e analisado através do *software Image Lab™*. O volume respectivo às bandas de BSA foram determinados. O ensaio foi realizado em quadruplicada.

2.9.3 Dano ao DNA induzido por peróxido de hidrogênio

O ensaio de dano ao DNA foi realizado a partir do método descrito por (Kumar & Chattopadhyay, 2007) com modificações. O preparo do DNA plasmidial foi realizado a partir da adição de 4 μL de PBS e 4 μL de DNA plasmidial (50 $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$). As diluições das diferentes concentrações de EPSp (1- 2000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) em foram realizadas em PBS. Para o experimento foram utilizados 4 μL do EPSp nas diferentes concentrações, 4 μL da solução de DNA plasmidial e 4 μL de peróxido de hidrogênio

30%. As amostras foram incubadas em transiluminador UVT-312 a 302 nm em temperatura ambiente durante 5 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio a 10 mg/mL. O gel foi digitalizado utilizando o fotodocumentador Gel Doc™ EZ System e analisado através do *software Image Lab™*. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.10 Ensaios *in vivo* em molelo *Caenorhabditis elegans*

2.10.1 Toxicidade aguda em *Caenorhabditis elegans*

O ensaio de toxicidade foi realizado como descrito por (Bonamigo et al., 2017) utilizando o modelo animal *Caenorhabditis elegans* estirpe N2 do tipo selvagem. Os nematoides foram incubados a 20 °C em placas contendo meio de crescimento de nematódeo (NGM), suplementado com bactéria *Escherichia coli* cepa OP50-1. Os nematoides foram sincronizados através do tratamento de hermafroditas gestantes com hipoclorito de sódio a 2% e hidróxido de sódio 5 M. Após a sincronização, os nematoides (n=10), na fase larval L4, foram transferidos para microplacas de 96 poços e incubados por 24 h a 20 °C com as diferentes concentrações do EPSp (750-4.000 µg.mL⁻¹) em meio M9. Após esse período, avaliou-se a viabilidade do nematódeo através de resposta ao estímulo físico com a utilização de fio de platina. Para a manipulação e exame dos nematoides foi utilizado um estereomicroscópio modelo Motic SMZ-140 & W10X / 23 (British Columbia, Canadá). Os dados foram calculados a partir de três experimentos independentes em triplicata.

2.10.2 Resistencia ao estresse oxidativo induzido por Juglone

A capacidade de diferentes concentrações do EPSp (100-2000 µg.mL⁻¹) em promover a proteção contra os efeitos do estresse oxidativo induzido pelo agente pró-oxidante Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) foi avaliada utilizando o modelo *C. elegans*. Os nematoides N2 (n=10), no estágio larval L4 foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo tampão M9 (100 µL), e incubados a 20 °C por 1 hora com diferentes concentrações de EPSp (100 µL). Em seguida foi adicionado 50 µL de Juglone (40 µM). A viabilidade dos nematoides foi avaliada após 24 horas através da observação dos animais sobreviventes e sensíveis ao toque, utilizando uma alça de platina. Os nematoides foram avaliados no estereomicroscópio Motic SMZ-168. Foram utilizados como controles nematoides incubados somente com o

meio de cultura M9 (250 μ L) e em Juglone (40 μ M). Os dados foram calculados a partir de três experimentos independentes em triplicata.

2.10.3 Resistência ao estresse térmico

O ensaio de resistência ao estresse térmico foi realizado utilizando o modelo *C. elegans*. Os nematoides selvagens N2 (n=10) na fase larval L4 foram transferidos para novas placas contendo meio NGM e *E. coli* OP50 e os respectivos tratamentos de EPSp (100-2000 μ g.mL⁻¹). O estresse térmico foi induzido pelo aumento da temperatura de cultivo de 20° C para 37° C durante o período de 6 horas, com avaliação para cada hora. Após o período de incubação, os nematoides foram mantidos a 20° C em incubadora por no mínimo 16 horas. Este procedimento permite que os nematoides viáveis se recuperem. Os resultados foram obtidos pela média de três ensaios independentes em duplicatas.

2.11 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA) e submetidos a *post-test Tukey* ou *test-t Student*. Os dados foram considerados significantes quando $P < 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software GraphPad Prism 7.0*

3. Resultados

3.1 Composição centesimal

A composição centesimal e o valor nutricional da polpa fresca e polpa liofilizada estão apresentados na tabela 1. O processo de liofilização reduziu em 93 % o teor de umidade na polpa liofilizada e aumentou os teores de cinzas, fibras totais, proteínas, lipídeos, carboidratos e valor calórico.

Tabela 1. Composição centesimal (g.100 g⁻¹ de amostra) e valor calórico (Kcal.100 g⁻¹ de amostra) da polpa fresca e polpa liofilizada de *S. purpurea* L.

Parâmetros	Polpa Fresca	Polpa Liofilizada
Composição centesimal		
Umidade	81,16 ± 0,58	5,29 ± 0,17****
Cinzas	0,47 ± 0,04	0,59 ± 0,04
Fibras totais	2,18 ± 0,06	2,72 ± 0,07**
Proteínas	5,65 ± 0,61	7,04 ± 0,66
Lipídeos	1,69 ± 0,14	2,12 ± 0,03*
Carboidratos	11,03 ± 0,55	84,90 ± 0, 61****
Valor calórico	81,93 ± 1,51	386,80 ± 0,66****

Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média. *P<0.05; **P<0.01; e ****P<0.0001 *versus* polpa fresca.

3.2 Teor de ácido ascórbico, índice de acidez, fenóis totais e flavonoides da polpa fresca e liofilizada

O teor de ácido ascórbico, índice de acidez, fenóis totais e flavonoides presente na polpa fresca e liofilizada, estão apresentados na tabela 2. O processo de liofilização aumentou a concentração de ácido ascórbico em 278 %, 18 % índice de acidez, 21 % fenóis totais e 49 % flavonoides.

Tabela 2. Teor de ácido ascórbico, índice de acidez, fenóis totais e flavonoides na polpa fresca e liofilizada dos frutos de *S. purpúrea* L

Parâmetros	Polpa fresca	Polpa liofilizada
Ácido ascórbico (mg de AA.100 ⁻¹ g de amostra)	31,64±8,43	119,73±5,68***
Índice de acidez (%)	14,05±0,27	17,88±1,17*
Fenóis totais (mg de EAG.g ⁻¹ de amostra)	98,00±0,00	119,00±0,00****
Flavonoides (mg de EQ.g ⁻¹ de amostra)	55,20±0,01	81,90±0,00****

Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média. *P<0.05; ***P<0.001; e ****P<0.0001 *versus* polpa fresca.

3.3 Fenóis totais, flavonoides e constituição química do EPSp

O EPSp apresentou conteúdo de fenóis totais de 108 mg EAG.g⁻¹ e de flavonoides foi de 69,4 mg de EQ.g⁻¹. A análise química do EPSp identificou a

presença de triptofano, ácido hidroxicítrico, di-O-hexosídeo, O-desoxihexosil-hexosil quercetina, O-hexosil quercetina (Figura 1).

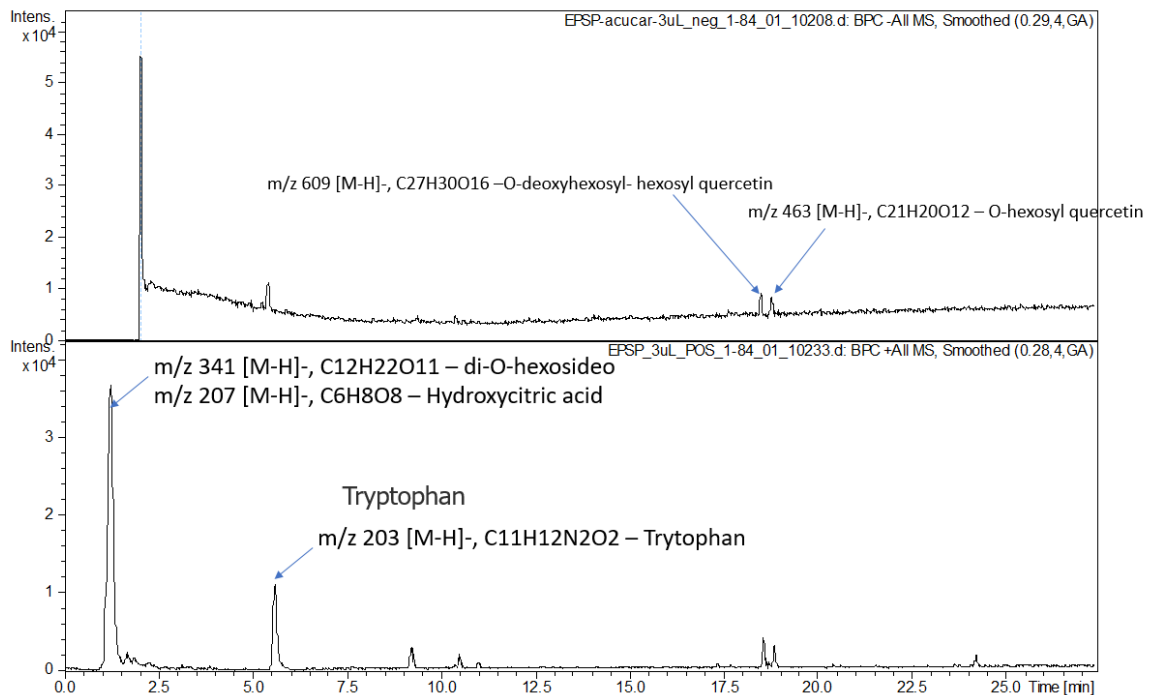


Figura 1. Compostos identificados no extrato aquoso da polpa liofilizada de *Spondias purpurea* L.

3.4 Atividade antioxidante

3.4.1 Captura do radical ABTS e DPPH

No ensaio de captura do radical livre ABTS observamos que os controles AA e BHT apresentaram IC₅₀ inferior a 10 µg.mL⁻¹, concentrações inferiores a observada para o EPSp (IC₅₀ ~ 210 µg.mL⁻¹). No ensaio de captura do radical DPPH o EPSp apresentou IC₅₀ de 137 µg.mL⁻¹. Apresentando uma captura máxima de radicais de 85% a 500 µg.mL⁻¹.

Tabela 3. Atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa da *S. purpurea*.

Amostra	ABTS			DPPH		
	IC ₅₀ [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]	Inibição máxima %	[$\mu\text{g.mL}^{-1}$]	IC ₅₀ [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]	Inibição máxima %	[$\mu\text{g.mL}^{-1}$]
AA	2,9±0,1	93	5	4,3±0,2	92	25
BHT	7,8±0,8	93	50	15,2±1,5	80	50
EPSP	209,6±3,2	77	1.000	136,7±3,7	85	500

IC₅₀ e atividade máxima de eliminação de radicais livres de ABTS e DPPH, antioxidantes padrões e do extrato aquoso da polpa liofilizada de *Spondias purpurea* L. (EPSP)

3.5 Oxidação de BSA induzido por AAPH

O agente oxidante AAPH elevou a oxidação do BSA, promovendo 73 % de oxidação. Foi observado que nas maiores concentrações avaliadas (750, 1.000 e 2.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a oxidação causada pelo agente AAPH foi reduzido pelo EPSP em 38 %, 42% e 48 %, demonstrando que estas concentrações foram capazes de proteger BSA da oxidação promovida por AAPH (Figura 2).

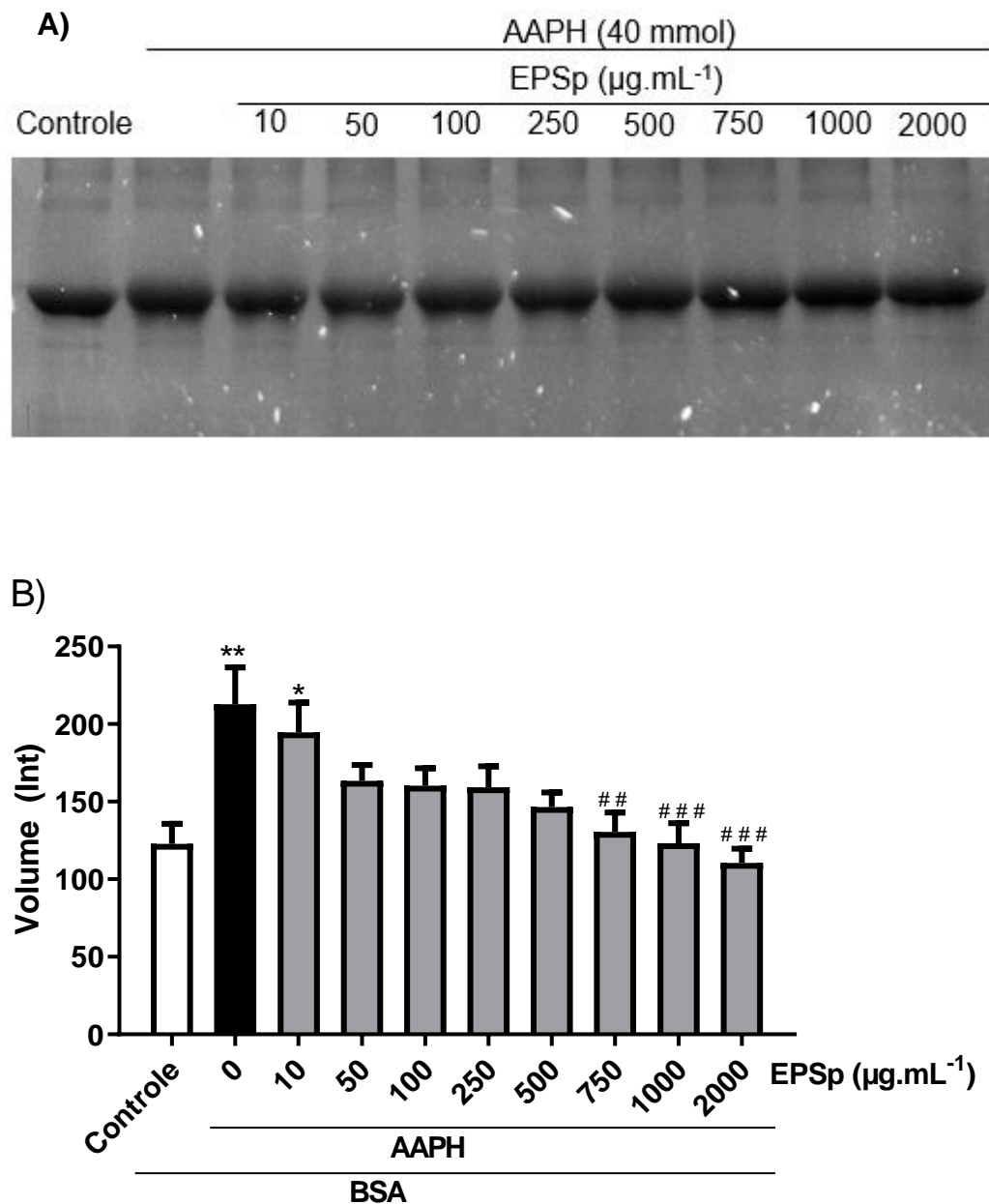


Figura 2. Oxidação de BSA. A) SDS-PAGE 12% e B) Inibição da oxidação de BSA induzida por AAPH. Os dados são apresentados como média \pm EPM. EPSp= Extrato aquoso da polpa de *Spondias purpurea* * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ versus grupo Controle. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ versus grupo EPSp (AAPH 0).

3.6 Dano ao DNA induzido por peróxido de hidrogênio

O EPSp foi capaz de promover a proteção contra a fragmentação do DNA induzido por H_2O_2 e radiação UV de maneira dose-dependente, sendo que as maiores concentrações de EPSp promoveram as maiores proteções. Os controles quercetina, catequina e ácido gálico também protegeram o DNA da fragmentação.

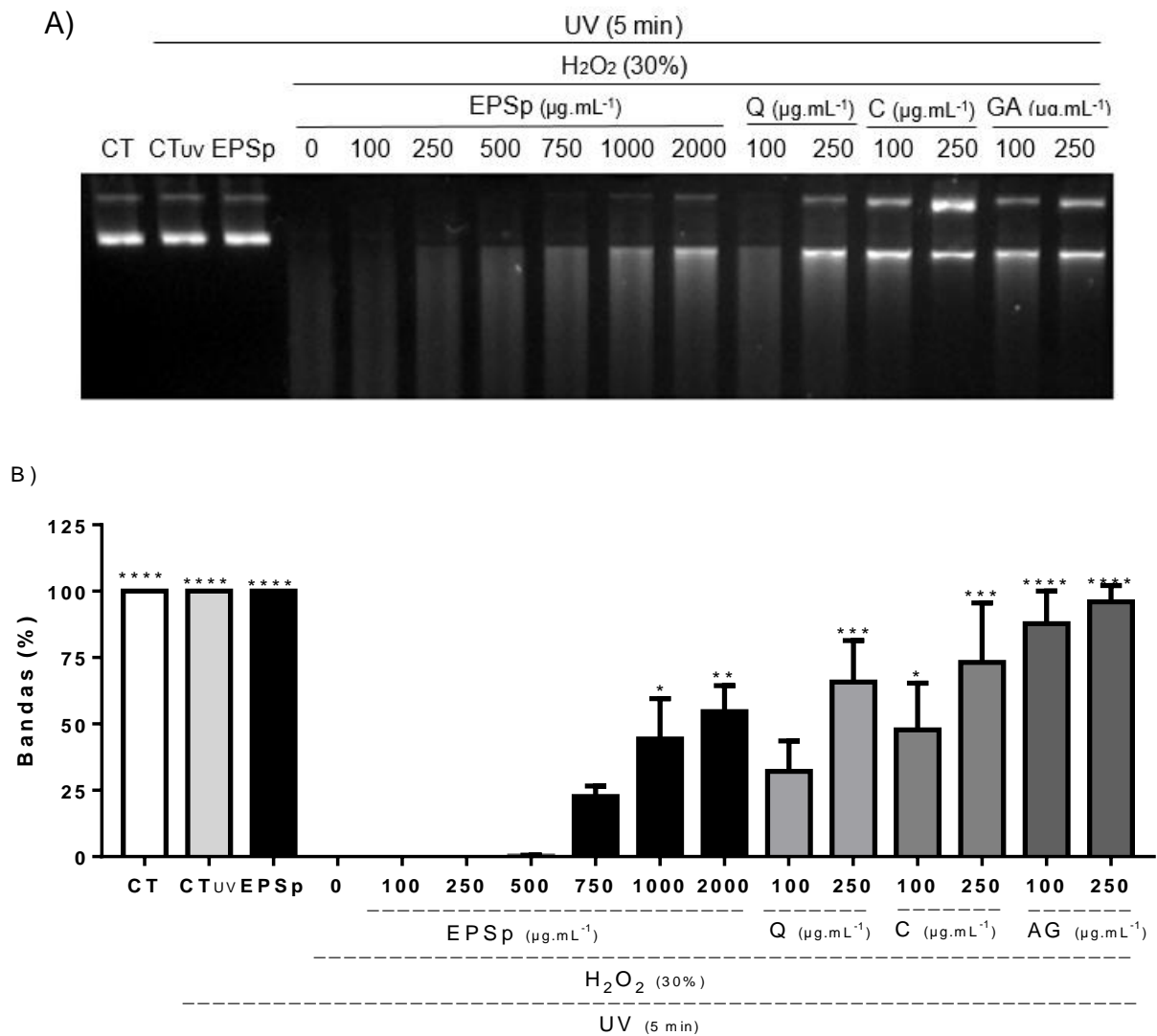


Figura 3. Fragmentação de DNA plasmidial. A) Gel de agarose 1% e B) Determinação do conteúdo de DNA plasmidial após a exposição ao H₂O₂ e UV. Os dados são apresentados como média ± EPM. EPSp= Extrato aquoso da polpa de *Spondias purpurea* Q= quercetina; C= catequina; GA= Ácido gálico; CT= controle e CT_{UV}= Controle + ultravioleta. * P<0,05 versus EPSp (0).

3.7 Ensaios *in vivo* em molelo *Caenorhabditis elegans*

3.7.1 Toxicidade em *Caenorhabditis elegans*

A administração de diferentes concentrações do EPSp (750-4.000 µg.mL⁻¹) em modelo de *C. elegans* não levou a sinais de toxicidade quando comparado com o grupo controle nos diferentes tempos avaliados (Figura 4).

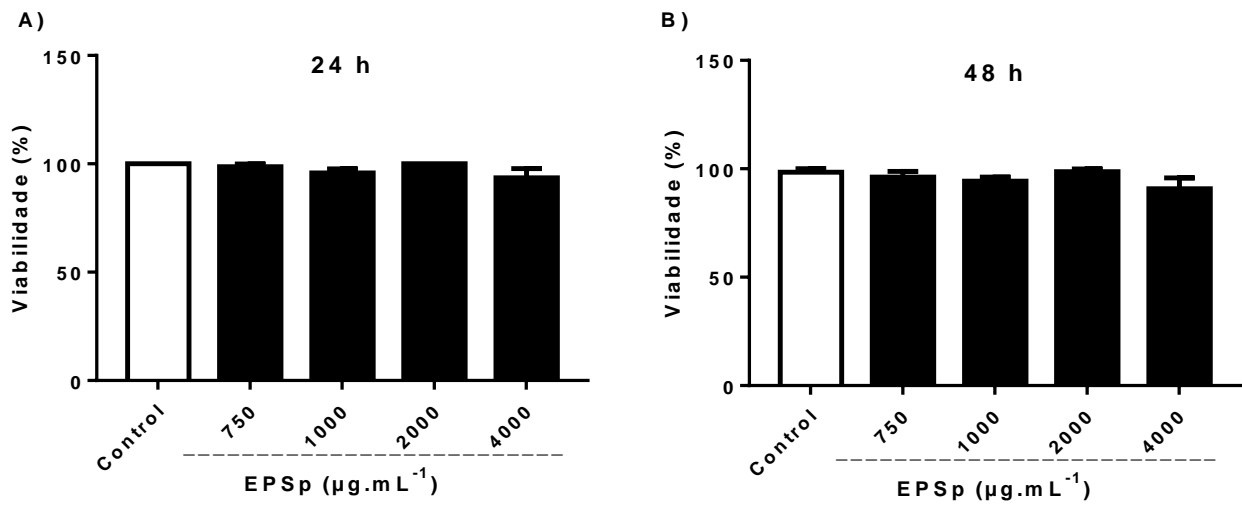


Figura 4. Toxicidade aguda em *C. elegans* nos tempos de (A) 24 h e (B) 48 h de incubação. EPSp= Extrato aquoso da polpa de *Spondias purpurea*. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

3.7.2 Resistência ao estresse oxidativo induzido por Juglone

O agente oxidante Juglone (40 μ M) promoveu a morte de 57 % dos nematoides comparado a controle-M9. Quando adicionados as diferentes concentrações do EPSp (100-2000 μ g.mL⁻¹), foi observado que a partir da concentração de 250 μ g.mL⁻¹ o EPSp promoveu a proteção contra os danos oxidativos causados pelo Juglone, aumentando a viabilidade em 56 % dos nematoides quando comparado ao Juglone.

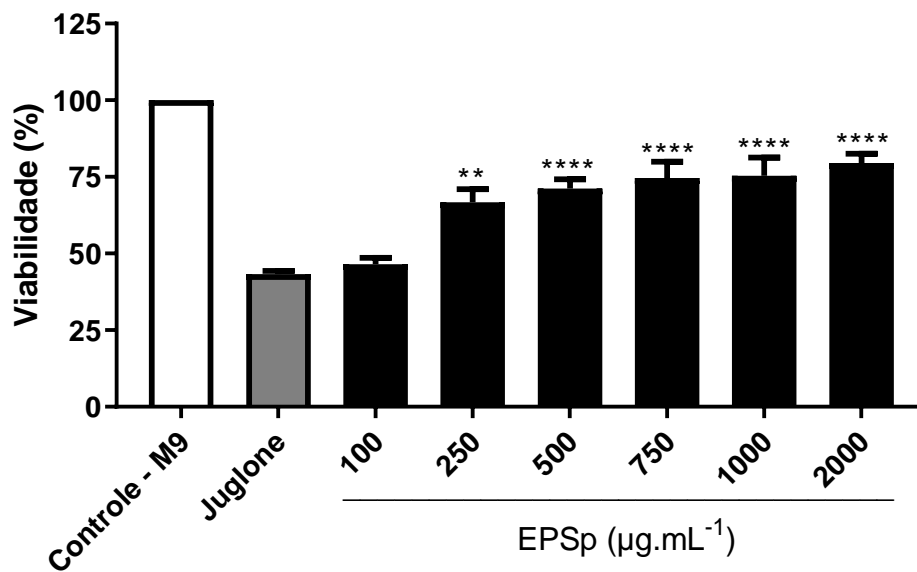


Figura 5. Estresse oxidativo induzido por Juglone em *C. elegans*, expostos durante 24 horas ao EPSp. EPSp= Extrato aquoso da polpa de *Spondias purpurea*. Os dados são apresentados como média \pm EPM. *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.001$ em comparação ao grupo Juglone.

3.7.3 Resistência ao estresse térmico

A exposição dos nematoides a elevadas temperaturas durante diferentes intervalos de tempo (1 a 6 h) promoveu a morte de nematoides a partir da 4 h, quando comparados ao controle exposto a 20 °C (CT 20) (dados não mostrado). A partir da 2 h de exposição a 37 °C, foi observado morte dos nematoides. A morte desses nematoides foi mais acentuada na 5 e 6 h de exposição. A administração de diferentes concentrações do EPSp (100-2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi capaz de promover a proteção contra o estresse induzido por elevadas temperaturas na 6 h de exposição.

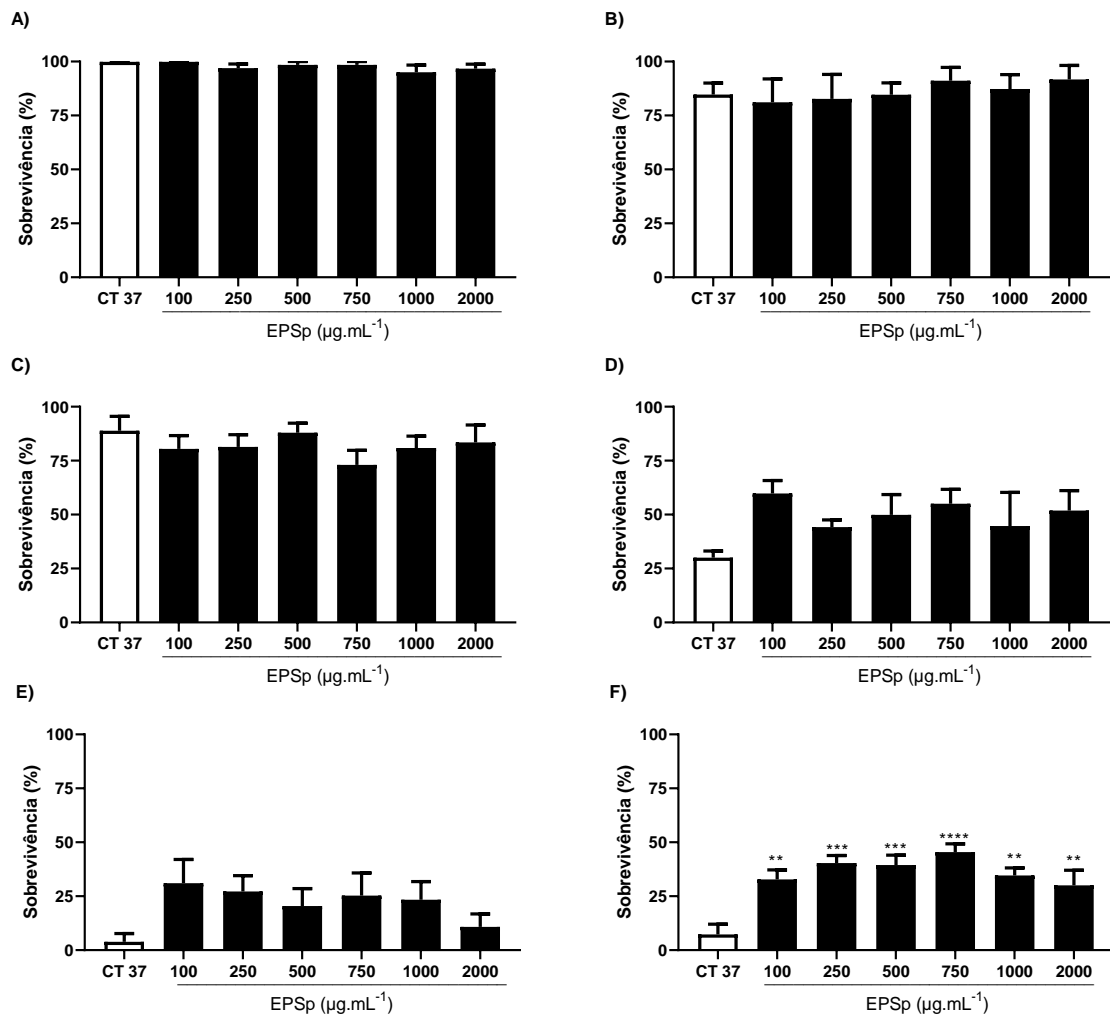


Figura 6. Estresse térmico em *C. elegans* expostos a 37 °C durante A) 1 h, B) 2 h, C) 3 h, D) 4 h, E) 5 h e F) 6 h, tratados com EPSp. EPSp= Extrato aquoso da polpa de *Spondias purpurea*. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.001$ em comparação ao grupo CT 37.

4. Discussão

Os frutos têm sido utilizados na dieta humana há séculos. Além das propriedades nutricionais, os frutos também podem apresentar propriedades nutracêuticas e funcionais. A ingestão de compostos antioxidantes através dos alimentos é uma alternativa eficaz, capaz de combater o excesso de espécies reativas acumuladas no quadro de estresse oxidativo (Pham-Huy et al., 2008). Dada a escassez de informações a espécie *S. purpurea*, investigamos as propriedades nutricionais e

antioxidantes do fruto e o efeito da liofilização sobre estes parâmetros, além dos efeitos do extrato aquoso dos frutos.

A polpa fresca de *S. purpurea* apresenta teor de fibras totais, proteínas e lipídeos totais superior ao valor encontrado nos frutos de *S. cytherea* (cajá-manga) (Lago-Vanzela et al., 2011). Os valores de umidade, cinzas e carboidratos são semelhantes aos valores descritos para outros frutos, como o cajá-manga, mamão, abacaxi e manga (Lago-Vanzela et al., 2011; Marques et al., 2006). Adicionalmente, os frutos de *S. purpurea* possui um valor calórico superior a *S. cytherea* e inferior ao valor encontrado para a polpa dos frutos de *S. axillaris* (S. Gupta et al., 2019; Lago-Vanzela et al., 2011).

O elevado teor de fibras, proteínas e lipídeos nos frutos de *S. purpurea* podem promover efeitos benéficos a saúde, conferindo aos frutos propriedades funcionais. A ingestão de fibras pode auxiliar na motilidade intestinal, redução do índice glicêmico e colesterol, além de promover a sensação de saciedade e auxilia na prevenção de doenças como colite e câncer (Cassidy et al., 2018; Emilien et al., 2018; Nakaji et al., 2004; Patel, 2019). O consumo de proteínas também promove o aumento da saciedade, além de aumentar o gasto energético, apresentar efeito termogênico e capacidade de modular hormônios intestinais (Ryan et al., 2013; Westerterp-Plantenga et al., 2009). E os lipídeos são capazes de modular a produção de hormônios, promover relaxamento de músculos, e atuar no sistema imunológico (Imo et al., 2018; Ryan et al., 2013).

Adicionalmente, os frutos de *S. purpurea* apresentou valor de AA inferior ao apresentado para os frutos de *S. mombin*, porem semelhante aos frutos de *S. axillaris*, além disso, o conteúdo de AA presente nos frutos de *S. purpurea* é 33 % do valor recomendado pela NHI para ingestão diária (S. Gupta et al., 2019; NHI, 2018; Porto et al., 2019). O teor de compostos antioxidantes, fenóis totais e flavonoides, encontrado nos frutos de *S. purpurea* são superiores aos valores encontrados nos frutos de *S. mombin* e *S. axillaris* (S. Gupta et al., 2019; Saha, 2019).

O processo de liofilização da polpa dos frutos de *S. purpurea*, reduziu o teor de umidade e concentrou os teores de fibras, lipídeos, carboidratos e conseqüentemente, aumentou o valor calórico. A liofilização também promoveu a concentração dos níveis de AA, fenóis totais e flavonoides. A umidade residual da polpa liofilizada de *S.*

purpurea está próxima aos valores encontrados para polpas liofilizadas de mamão (5.81%), abacaxi (7.06%) e manga (7.76%) (Marques et al., 2006). Todos os frutos investigados por Marques et al., (2007) apresentaram redução do conteúdo de AA. Contudo, o nível de AA na polpa liofilizada de *S. purpurea* aumentou 4 vezes. Isso mostra que o processo de liofilização preservou os constituintes químicos presentes na polpa de *S. purpurea*. O AA e os fenóis totais são compostos antioxidantes capazes de neutralizar os efeitos deletérios de espécies reativas, promovendo um efeito protetor contra o estresse oxidativo (Gong & Rubin, 2015; Nobre et al., 2018; Rodrigues Sá et al., 2018).

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) são responsáveis pela oxidação de biomoléculas, sendo comum danos oxidativos em proteínas, DNA, RNA e lipídeos (AbdulSalam et al., 2016; Poulsen et al., 2012; Reeg & Grune, 2015; Su et al., 2019). A oxidação de biomoléculas possui diversas consequências, como desenvolvimento Alzheimer, câncer, diabetes, obesidade, doenças cardíacas e Parkinson (Duracková, 2010; R. A. Jacob & Sotoudeh, 2002; Sultana et al., 2009). Adicionalmente, o consumo de dietas hipercalóricas, tabagismo, poluição, radiação e o uso de pesticidas contribuem para a produção de EROs (CAROCHO; FERREIRA, 2013; HYBERTSON et al., 2011; SIES; STAHL; SEVANI, 2005).

A análise química do EPSp identificou compostos antioxidantes que não haviam sido descritos nos frutos de *S. purpurea*. Dentre eles destacamos o ácido hidroxicítrico, di-O-hexosídeo, O-desoxihexosil-hexosil quercetina, O-hexosil quercetina e o aminoácido triptofano. A presença destes compostos bioativos no EPSp está relacionado as propriedades funcionais do fruto. Os compostos identificados no EPSp: Ácido hidroxicítrico, derivados de quercetina e triptofano, juntamente com o AA são, provavelmente, responsáveis pelos efeitos antioxidantes observados nos ensaios de captura direta de radicais livres ABTS e DPPH, bem como nos ensaios de proteção as biomoléculas, uma vez que os mesmos são descritos como compostos com propriedades antioxidantes.

O EPSp apresentou capacidade de prevenir biomoléculas contra os efeitos oxidativo, causados por espécies reativas. A proteção contra a oxidação do BSA e fragmentação do DNA, demonstra que o EPSp possui a capacidade neutralizar os efeitos deletérios causados pelas EROs. Esses resultados podem ser atribuídos ao sinergismo dos compostos presentes no EPSp. Uma vez que os AA, fenóis totais e

flavonoides de são capazes de prevenir danos oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Gong & Rubin, 2015; Nobre et al., 2018; Park et al., 2015; Rodrigues Sá et al., 2018).

Após observarmos que os frutos de *Spondias purpurea* apresentam propriedades nutraceuticas, compostos com atividade antioxidante, e que estes compostos são capazes de proteger biomoléculas contra danos oxidativos, buscamos avaliar os efeitos *in vivo*, utilizando o modelo experimental *C. elegans*.

Foi possível observar que elevadas concentrações de EPSp não apresentou efeitos tóxicos nos nematoides, corroborando com a ausência de toxicidade observada por Villa-Hernandez et al., (2017), o qual avaliou baixas concentrações de extratos hidrofílicos dos frutos de *S. purpurea*, ratificando o consumo seguro desse fruto. A ausência de toxicidade de *S. purpurea* corrobora com a ausência de toxicidade apresentado em *Spondias tuberosa* (de Moura Barbosa et al., 2018). Após confirmar a ausência de toxicidade em elevadas concentrações, avaliamos a capacidade de proteção contra o estresse oxidativo e térmico em nematoides.

O composto Juglone promove aumento de EROs intracelular em *C. elegans*, levando ao quadro de estresse oxidativo, promovendo danos a biomoléculas, como DNA e lipídeos, diminuindo a viabilidade e sobrevivência dos nematoides (Ahmad, 2019; de Castro et al., 2004; E. Wang & Wink, 2016). As diferentes concentrações do EPSp, promoveram proteção contra os danos oxidativos causados pelo agente oxidante Juglone, demonstrando que o EPSp apresenta atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Esse efeito protetor pode ser atribuído aos compostos identificados nos frutos de *S. purpurea*, uma vez que, AA e flavonoides podem estar inibindo os danos oxidativos causados pelo juglone em biomoléculas dos nematoides (Hartwig et al., 2009; Sobeh et al., 2016).

Adicionalmente, o EPSp apresentou efeito protetor contra os danos causados pelo choque térmico. O mesmo efeito termoprotetor foi observado em nematoides tratados com extrato hidrofílico de frutos de *S. purpurea* (Villa-Hernández et al., 2017). Esses resultados podem ser devido a presença de flavonoides nos frutos de *S. purpurea*, como a quercetina e campeferol, os quais são descritos capazes de ativar proteínas de resistência ao choque térmico, através de um conjunto de genes induzíveis, controlados por chaperonas, como o DAF-16, ortólogo do FOXO3 em humanos, o qual está associado à longevidade em *C. elegans* (Flachsbart et al., 2009), e atuam tentando evitar a degeneração celular e promovendo a proteção térmica (P. Jacob et al., 2017; Rodriguez et al., 2013). Assim, os resultados de proteção contra

os danos oxidativos induzidos por juglone e o efeito protetor contra os danos causados pelo choque térmico, demonstram a atividade antioxidante *in vivo*.

5. Conclusão

Em conclusão, os frutos de *S. purpurea* apresentam uma excelente fonte de nutrientes, propriedades funcionais e nutracêuticas. O processo de liofilização de sua polpa produz polpas com uma pequena concentração de umidade residual e grande concentração de moléculas antioxidantes, como o ácido ascórbico, compostos fenólicos e flavonoides. O EPSp apresentou atividade antioxidante em experimentos de captura de radicais livres e protege biomoléculas contra danos oxidativos, demonstrando que possui propriedades funcionais sem apresentar efeitos tóxicos no modelo *C. elegans*, além de inibir danos oxidativo induzidos por Juglone e promover proteção contra choque térmico em *C. elegans*. O consumo de antioxidantes provenientes de frutos é uma alternativa para a prevenção de uma série de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Mostramos que *S. purpurea* deve ser incluída dentre os frutos tropicais com propriedades nutracêuticas e experimentos futuros devem investigar os efeitos nutracêuticos de *S. purpurea* em modelos *in vivo*.

6. Referências

- AbdulSalam, S. F., Thowfeik, F. S., & Merino, E. J. (2016). Excessive Reactive Oxygen Species and Exotic DNA Lesions as an Exploitable Liability. *Biochemistry*, 55(38), 5341–5352.
- Ahmad, T. (2019). Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8.
- Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16. ed. Washington, 1995.
- Bonamigo, T., Campos, J. F., Alfredo, T. M., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., de Picoli Souza, K., & dos Santos, E. L. (2017). Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* [Research article]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

- Çalışkantürk Karataş, S., Günay, D., & Sayar, S. (2017). *In vitro* evaluation of whole faba bean and its seed coat as a potential source of functional food components. *Food Chemistry*, 230, 182–188.
- Cassidy, Y. M., McSorley, E. M., & Allsopp, P. J. (2018). Effect of soluble dietary fibre on postprandial blood glucose response and its potential as a functional food ingredient. *Journal of Functional Foods*, 46, 423–439.
- Dantas, A. M., Mafaldo, I. M., Oliveira, P. M. de L., Lima, M. D. S., Magnani, M., & Borges, G. da S. C. (2019). Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier. *Food Chemistry*, 274, 202–214.
- de Almeida, C. L. F., Brito, S. A., de Santana, T. I., Costa, H. B. A., de Carvalho Júnior, C. H. R., da Silva, M. V., de Almeida, L. L., Rolim, L. A., Dos Santos, V. L., Wanderley, A. G., & da Silva, T. G. (2017). *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 6593073.
- de Castro, E., Hegi de Castro, S., & Johnson, T. E. (2004). Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(2), 139–145.
- de Moura Barbosa, H., Amaral, D., do Nascimento, J. N., Machado, D. C., de Sousa Araújo, T. A., de Albuquerque, U. P., Guedes da Silva Almeida, J. R., Rolim, L. A., Lopes, N. P., Gomes, D. A., & Lira, E. C. (2018). *Spondias tuberosa* inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 248–257.
- Duracková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59(4), 459–469.
- Emilien, C. H., Zhu, Y., Hsu, W. H., Williamson, P., & Hollis, J. H. (2018). The effect of soluble fiber dextrin on postprandial appetite and subsequent food intake in healthy adults. *Nutrition*, 47, 6–12.

- Flachsbart, F., Caliebe, A., Kleindorp, R., Blanché, H., von Eller-Eberstein, H., Nikolaus, S., Schreiber, S., & Nebel, A. (2009). Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(8), 2700–2705.
- Garzón, G. A., Narváez-Cuenca, C.-E., Vincken, J.-P., & Gruppen, H. (2017). Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. *Food Chemistry*, *217*, 364–372.
- Gong, X., & Rubin, L. P. (2015). Role of macular xanthophylls in prevention of common neovascular retinopathies: retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *572*, 40–48.
- Gupta, D., & Gupta, R. K. (2011). Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *In vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*(1), 13.
- Gupta, S., Jhala, V. S., Singh, C., Chauhan, N., & Bhatt, S. S. (2019). Nutritional importance of underutilized fruits: '*Spondias axillaris* and *Eriolobus indica*' of Uttarakhand hills. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *8*(1), 335–339.
- Hammami, C., & René, F. (1997). Determination of freeze-drying process variables for strawberries. *Journal of Food Engineering*, *32*(2), 133–154.
- Hartwig, K., Heidler, T., Moch, J., Daniel, H., & Wenzel, U. (2009). Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *Genes & Nutrition*, *4*(1), 59–67.
- Hauck Tiburski, J., Rosenthal, A., Deliza, R., Godoy, R., & Pacheco, S. (2011). Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International - FOOD RES INT*, *44*, 2326–2331.

- Imo, C., Yakubu, O. E., Imo, N. G., Udegbonam, I. S., & Onukwugha, O. J. (2018). Chemical Composition of *Xylopia aethiopica* fruits. *American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 7(2), 48–53.
- Jacob, P., Hirt, H., & Bendahmane, A. (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4), 405–414.
- Jacob, R. A., & Sotoudeh, G. (2002). Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care: An Official Publication of Tufts University*, 5(2), 66–74.
- Kumar, A., & Chattopadhyay, S. (2007). DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry*, 100(4), 1377–1384.
- Lago-Vanzela, E. S., Ramin, P., Umsza-Guez, M. A., Santos, G. V., Gomes, E., & Silva, R. da. (2011). Chemical and sensory characteristics of pulp and peel “cajá-manga” (*Spondias cytherea* Sonn.) jelly. *Food Science and Technology*, 31(2), 398–405.
- Liberio, S. A., Pereira, A. L. A., Dutra, R. P., Reis, A. S., Araújo, M. J. A. M., Mattar, N. S., Silva, L. A., Ribeiro, M. N. S., Nascimento, F. R. F., Guerra, R. N. M., & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 108.
- Marques, L. G., Silveira, A. M., & Freire, J. T. (2006). Freeze-Drying Characteristics of Tropical Fruits. *Drying Technology*, 24(4), 457–463.
- Martinez, R. M., Guimarães, D. de A. B., Berniz, C. R., Abreu, J. P. de, Rocha, A. P. M. da, Moura, R. S. de, Resende, A. C., & Teodoro, A. J. (2018). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(11).
- Muñiz, A., Garcia, E., Gonzalez, D., & Zuñiga, L. (2018). Antioxidant Activity and In Vitro Antiglycation of the Fruit of *Spondias purpurea*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2018, 5613704.

- Nakaji, S., Ishiguro, S., Iwane, S., Ohta, M., Sugawara, K., Sakamoto, J., & Fukuda, S. (2004). The prevention of colon carcinogenesis in rats by dietary cellulose is greater than the promotive effect of dietary lard as assessed by repeated endoscopic observation. *The Journal of Nutrition*, *134*(4), 935–939.
- NHI. (2018). *Office of Dietary Supplements - Vitamin C*. National Institutes of Health.
<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/>
- Nobre, C. B., Sousa, E. O., Camilo, C. J., Machado, J. F., Silva, J. M. F. L., Filho, J. R., Coutinho, H. D. M., & Costa, J. G. M. (2018). Antioxidative effect and phytochemical profile of natural products from the fruits of “babaçu” (*Orbignia speciose*) and “buriti” (*Mauritia flexuosa*). *Food and Chemical Toxicology*, *121*, 423–429.
- Park, Y.-S., Cvikrová, M., Martincová, O., Ham, K.-S., Kang, S.-G., Park, Y.-K., Namiesnik, J., Rombolà, A. D., Jastrzebski, Z., & Gorinstein, S. (2015). *In vitro* antioxidative and binding properties of phenolics in traditional, citrus and exotic fruits. *Food Research International*, *74*, 37–47.
- Patel, S. (2019). Anti-Obesity and Anti-Diabetes Foods: High Fibre Diets. In L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 248–252). Academic Press.
- Pereira, E. P. R., Faria, J. A. F., Cavalcanti, R. N., Garcia, R. K. A., Silva, R., Esmerino, E. A., Cappato, L. P., Arellano, D. B., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Padilha, M. C., Meireles, M. A., Bolini, H. M. A., & Cruz, A. G. (2016). Oxidative stress in probiotic Petit Suisse: Is the jabuticaba skin extract a potential option? *Food Research International*, *81*, 149–156.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, *4*(2), 89–96.
- Porto, I. S. A., Santos Neto, J. H., dos Santos, L. O., Gomes, A. A., & Ferreira, S. L. C. (2019). Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry. *Microchemical Journal*, *149*, 104031.

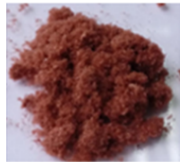
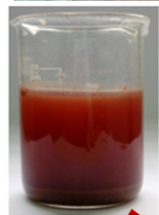
- Poulsen, H. E., Specht, E., Broedbaek, K., Henriksen, T., Ellervik, C., Mandrup-Poulsen, T., Tonnesen, M., Nielsen, P. E., Andersen, H. U., & Weimann, A. (2012). RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(8), 1353–1361.
- Reeg, S., & Grune, T. (2015). Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxidants & Redox Signaling*, *23*(3), 239–255.
- Rodrigues Sá, R., da Cruz Caldas, J., de Andrade Santana, D., Vieira Lopes, M., dos Santos, W. N. L., Graças Andrade Korn, M., & de Freitas Santos Júnior, A. (2018). Multielementar/centesimal composition and determination of bioactive phenolics in dried fruits and capsules containing Goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chemistry*.
- Rodriguez, M., Snoek, L. B., De Bono, M., & Kammenga, J. E. (2013). Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends in Genetics: TIG*, *29*(6), 367–374.
- Rufino, M. do S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, *121*(4), 996–1002.
- Ryan, A. T., Luscombe-Marsh, N. D., Saies, A. A., Little, T. J., Standfield, S., Horowitz, M., & Feinle-Bisset, C. (2013). Effects of intraduodenal lipid and protein on gut motility and hormone release, glycemia, appetite, and energy intake in lean men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(2), 300–311.
- Saha, S. (2019). Phytochemical screening and comparative study of antioxidative properties of the fruits and leaves of *Spondias mombin* in Bangladesh. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *8*(2), 379–383.
- Sobeh, M., ElHawary, E., Peixoto, H., Labib, R. M., Handoussa, H., Swilam, N., El-Khatib, A. H., Sharapov, F., Mohamed, T., Krstin, S., Linscheid, M. W., Singab, A. N., Wink, M., & Ayoub, N. (2016). Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia brachypetala* Sond.

- (Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. *PeerJ*, 4.
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z.-Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5080843.
- Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2009). Proteomics identification of oxidatively modified proteins in brain. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 564, 291–301.
- Vargas-Simón, G. (2018). Ciruela/Mexican Plum—*Spondias purpurea* L. In S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva, & E. S. de Brito (Eds.), *Exotic Fruits* (pp. 141–152). Academic Press.
- Villa-Hernández, J. M., Mendoza-Cardoso, G., Mendoza-Espinoza, J. A., Vela-Hinojosa, C., Díaz de León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, F., Alia-Tejacal, I., & Pérez-Flores, L. J. (2017). Antioxidant Capacity *In Vitro* and *In Vivo* of Various Ecotypes of Mexican Plum (*Spondias purpurea* L.). *Journal of Food Science*, 82(11), 2576–2582.
- Wang, E., & Wink, M. (2016). Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan. *PeerJ*, 4.
- Wang, H., Zhang, M., & Adhikari, B. (2015). Drying of shiitake mushroom by combining freeze-drying and mid-infrared radiation. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 507–517.
- Westerterp-Plantenga, M. S., Nieuwenhuizen, A., Tomé, D., Soenen, S., & Westerterp, K. R. (2009). Dietary Protein, Weight Loss, and Weight Maintenance. *Annual Review of Nutrition*, 29(1), 21–41.

5.2 Casca do caule de *Spondias purpurea* L. apresenta atividade antioxidante e anti-hipercolesterolêmica em camundongos alimentados com dieta hipercalórica

Resumo gráfico:

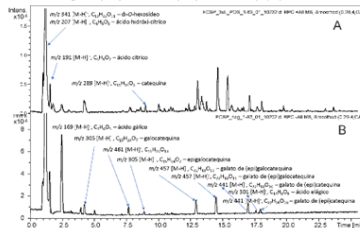
Casca do caule de *Spondias purpurea* L.



ECSp

Extrato aquoso da casca do caule

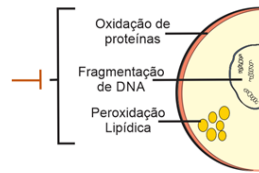
CLAE-DAD-EM



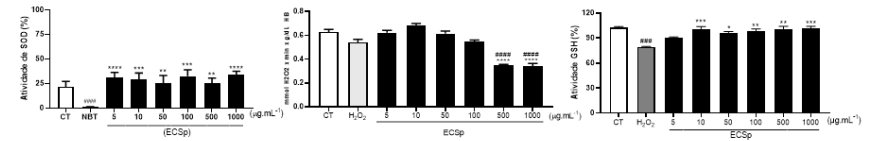
✓ Atividade antioxidante e anti-hipercolesterolêmica

In vitro

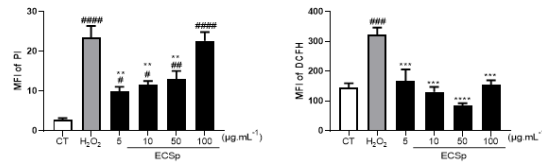
- Captura direta de radicais livres
- Inibe danos a biomoléculas



- Modula enzimas antioxidantes



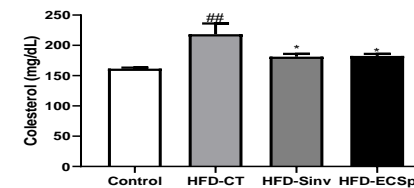
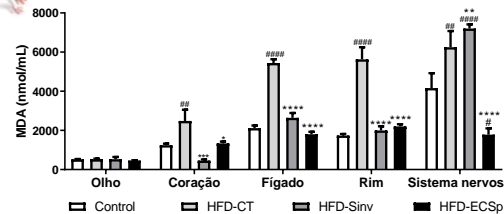
- Sem efeitos tóxicos e reduz EROs em PBMC



In vivo • Sem efeitos tóxicos



- Reduz MDA em órgãos
- Efeito anti-colesterolêmico



Casca do caule de *Spondias purpurea* L. apresenta atividade antioxidante e anti-hipercolesterolêmica em camundongos alimentados com dieta hipercalórica

Kátia Ávila Antunes, Tamaeh Monteiro Alfredo, Janielle da Silva Melo da Cunha, Priscila Pereira de Toledo Espindola, Alex Santos Oliveira, Caio Fernando Ramalho de Oliveira, José Tarcísio Giffoni de Carvalho Júnior, Denise Brentan da Silva, Edson Lucas dos Santos, Kely de Picoli Souza

Resumo

Diversas espécies do gênero *Spondias* têm sido descritas por sua atividade antioxidante. Nesse estudo, buscamos identificar os constituintes químicos e avaliar a atividade antioxidante e os efeitos do extrato aquoso das cascas do caule de *Spondias purpurea* L. (ECSp), sobre parâmetros metabólicos de animais alimentados com dieta hipercalórica. Foram identificados por CLAE-MS/MS no ECSp a presença de di-O-hexosídeo, ácido hidroxicítrico, ácido cítrico, ácido gálico, catequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de (epi)galocatequina, galato de (epi)catequina e ácido elágico. A atividade antioxidante *in vitro* foi demonstrada pela capacidade do ECSp em capturar radicais livres ABTS e DPPH, bem como pela sua capacidade de proteger macromoléculas – proteína e DNA, de danos oriundos da exposição a agentes oxidantes. O ECSp reduziu os níveis de ROS induzidos por peróxido de hidrogênio em células mononucleares de sangue periférico humano, analisadas por citometria de fluxo. A enzima SOD foi modulada na presença do ECSp, no entanto, não houve alteração de CAT. Foi observado também um aumento na disponibilidade de GSH. *In vivo*, após avaliação da toxicidade aguda, verificou-se que o ECSp foi capaz de reduzir os níveis de MDA em diversos órgãos de camundongos alimentados com dieta hipercalórica, além de reduzir a hipercolesterolemia desses animais de forma semelhante a sinvastatina. Em conjunto, a casca do caule de *Spondias purpurea* L. apresenta atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, com capacidade de reduzir os danos as biomoléculas no quadro de estresse oxidativo, além de reduzir a hipercolesterolemia induzida por dieta. Estes efeitos provavelmente são mediados pelos compostos fenólicos presentes.

Palavras-chave: Seriguela; Plantas medicinais; Bioprospecção; Obesidade; Estresse oxidativo; Hipercolesterolemia.

1 Introdução

Processos celulares fisiológicos e agentes estressores exógenos contribuem continuamente para a geração de espécies reativas no organismo que, quando não neutralizadas, desencadeiam o quadro de estresse oxidativo. O excesso de espécies reativas promove danos a macromoléculas, como as proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos. Diversas doenças podem surgir como consequência destes danos, como dislipidemias, obesidade, aterosclerose, hipertensão e disfunção endotelial vascular [1–4]. Contudo, diferentes mecanismos antioxidantes podem neutralizar as espécies reativas, controlando os danos celulares promovidos por elas.

Os sistemas antioxidantes protegem as células contra os danos promovidos pelo estresse oxidativo [5,6]. Em condições que a produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante endógena, enzimática ou não enzimática, faz-se necessária a atuação de antioxidantes exógenos [7]. Neste sentido, as plantas têm se mostrado uma importante fonte de antioxidantes exógenos, capazes de neutralizar os efeitos deletérios presentes durante o estresse oxidativo. Esta propriedade protetora é atribuída aos seus constituintes químicos, que atuam individualmente ou em sinergismo [8].

As espécies do gênero *Spondias* (Anacardiaceae), têm sido descritas por apresentarem atividade antioxidante, promovendo a redução da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas, propriedades atribuídas a presença de compostos fenólicos [10]. *Spondias purpurea* é uma espécie nativa do México, mas amplamente distribuída nas Américas Central e do Sul, inclusive no Brasil. Existem poucos estudos sobre esta espécie, porém a ação antioxidante de suas folhas e frutos já foram descritas [11,12]. No extrato hexânico das folhas de *S. purpurea* foram identificados ácido cafeico e epigallocatequina, e apresentam propriedades antioxidante e antiulcerogênica [11]. O extrato hexânico dos frutos de *S. purpurea* apresentou ações antioxidante e antiglicação [12]. Todavia, não há estudos na literatura sobre os constituintes químicos presentes nas cascas do caule de *S. purpurea*, bem como suas propriedades farmacológicas. Assim, investigamos neste trabalho a constituição

química do extrato aquoso da casca do caule de *S. purpurea* (ECSp) e avaliamos suas propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, bem como seus efeitos sobre parâmetros metabólicos de camundongos alimentados com dieta hipercalórica.

2 Material e métodos

2.1 Reagentes

AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride), ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), Acrilamida Bis-Acrilamida, BSA, Catequina, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), PSA, SDS e TEMED, foram adquiridos da Sigma. Ácido ascórbico, ácido gálico, ácido sulfúrico, carbonato de sódio, cloreto de alumínio, DCFI (2,6-diclorofenol indofenol), Folin-Ciocalteu, hexano, hidróxido de sódio, metanol, peróxido de hidrogênio quercetina foram utilizados em grau analítico.

2.2 Preparo do extrato aquoso da casca do caule de *Spondias purpurea* L. (ECSp)

A casca do caule de *S. purpurea* foi coletada em Itaporã, Mato Grosso do Sul, Brasil (S 21 ° 54 '33.3' e W 054 ° 42' 04.9 "), seca em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 45 ± 5 °C. Após a secagem, o material foi moído em um moinho de faca tipo *Willy*. Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, com número de registro 5461.

O extrato aquoso foi preparado por decocção do material vegetal em água destilada na proporção de 1:200 (m/v) durante 1 h. Em seguida, o extrato foi filtrado, liofilizado e armazenado a -4 °C com proteção contra a luz.

2.3 Identificação dos Compostos do ECSp

A amostra do ECSp foi analisada em um sistema cromatográfico UFLC Shimadzu Proeminence acoplado a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics), o qual possui fonte de ionização por eletrospray e analisador quadrupolo e tempo de voo. Uma coluna cromatográfica Kinetex (Phenomenex, 2.6 μ , 100A, 150 x 2.1 mm) foi utilizada nas análises, sendo aplicada uma vazão de 0,3 mL.⁻¹ e volume de injeção de 1 μ L. Os solventes acetonitrila (B) e água deionizada (A), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico v/v, foram utilizados como fase móvel em modo gradiente. O perfil gradiente de eluição foi o

seguinte: 0-2 min - 3% de B, 2-25 min – de 3 a 25% de B, 25-40 min – de 25 a 80% de B e 40-43 min - 80% de B. A coluna cromatográfica foi mantida a 50 °C durante as análises cromatográficas. Todas as amostras foram analisadas nos modos de ionização positiva e negativa. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (4 Bar), de secagem (9 L.⁻¹) e de colisão. A voltagem do capilar foi de 2.500 kV.

2.4 Atividade antioxidante

2.4.1 Captura do radical ABTS e DPPH

A atividade antioxidante do ECSp foi avaliada através dos métodos de 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH). A capacidade de eliminação dos radicais livres ABTS foi determinada através do método descrito por Rufino et al. (2010). Neste ensaio, 20 µL de amostra em diferentes concentrações foram adicionadas a 1.980 µL de solução do radical ABTS. Esta solução foi incubada por 6 min ao abrigo da luz e a absorbância determinada a 734 nm. A porcentagem de inibição do radical ABTS foi determinada segundo a equação 1:

$$\text{inibição ABTS (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \quad (1)$$

A capacidade de eliminação dos radicais DPPH foi determinada pelo método descrito por Gupta & Gupta (2011). Neste ensaio, 200 µL de amostras foram adicionados a 1.800 µL de solução do radical DPPH. Esta solução foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e sua absorbância determinada a 517 nm e a porcentagem de inibição do radical DPPH calculada segundo a equação 2:

$$\text{inibição DPPH (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.4.2 Oxidação de BSA induzido por AAPH

Albumina de soro bovino (BSA), 7 µg, foi incubada a 37 °C durante 30 min com diferentes concentrações do ECSp (5-1.000 µg.mL⁻¹). Após este período, o agente oxidante dicloridrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH), foi adicionado na concentração de 75 mM e seguiu-se uma nova incubação a 37 °C durante 60 min.

Posteriormente as amostras foram incubadas com tampão de amostra (SDS 20%, glicerol, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 H₂O e azul de Bromofenol) durante 3 min a 95 °C. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. O gel foi corado, descorado e digitalizado utilizando o fotodocumentador Gel Doc™ EZ System utilizando o *software Image Lab™*. O volume respectivo das bandas de BSA foram determinados. O ensaio foi realizado em quadruplicada.

2.4.3 Fragmentação de DNA induzido por peróxido de hidrogênio

O ensaio de fragmentação ao DNA foi realizado segundo o método descrito por Kumar & Chattopadhyay (2007), com modificações. Foram adicionados 4 µL de PBS a 4 µL de DNA plasmidial (50 ng.µL⁻¹) para o preparo da solução de DNA plasmidial. Para o experimento foram utilizados 4 µL do ECSp nas diferentes concentrações (5-1000 µg.mL⁻¹), 4 µL da solução de DNA plasmidial e 4 µL de peróxido de hidrogênio 30%. As amostras foram incubadas em transiluminador UVT-312 a 302 nm em temperatura ambiente durante 5 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio a 10 mg.mL⁻¹. O gel foi digitalizado utilizando o fotodocumentador Gel Doc™ EZ System e analisado utilizando-se o *software Image Lab™*. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

2.4.4 Determinação da atividade hemolítica, inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH e dosagem de MDA

Atividade hemolítica e hemólise oxidativa induzida por AAPH

O procedimento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UFGD (autorização nº 053161/2019). A capacidade do ECSp de proteger contra a hemólise oxidativa foi avaliada através da avaliação da hemólise induzida pelo agente oxidante AAPH. Uma quantidade de 15 mL de sangue periférico humano de um único indivíduo adulto saudável foi coletada, centrifugada a 2.000 rpm e o plasma e a camada de leucócitos foram descartados. Os eritrócitos foram lavados três vezes em NaCl a 0,9% e posteriormente foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 10% em NaCl a 0,9%. O material foi incubado a 37 °C durante 30 min em tubos de ensaio na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) ou ECSp (5-1.000 µg.mL⁻¹). Subsequentemente, 250 µL de NaCl 0,9% ou AAPH 50 mM foram adicionados para avaliar a capacidade hemolítica e a inibição da hemólise oxidativa, respectivamente. As amostras foram mantidas a 37 °C durante

240 min sob agitação periódica. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata. A porcentagem de hemólise foi determinada medindo a absorbância a 540 nm segundo a equação 3.

$$Hemólise (\%) = \left(\frac{Abs amostra}{Abs hemólise total} \right) \times 100 \quad (3)$$

Para o ensaio de inibição da peroxidação lipídica, uma suspensão de eritrócitos a 10% foi preparada e incubada a 37 °C por 30 min na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico ou ECSp (5-1.000 µg.mL⁻¹). Em seguida, adicionou-se AAPH 50 mM e incubou-se a 37 °C durante 240 min com agitação periódica. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm e alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram transferidas para tubos contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 10 nmol. Como padrão, 500 µL de solução de malondialdeído (MDA) 20 µM foram adicionados a 1 mL de TBA. As amostras foram incubadas a 96 °C durante 45 min. Em seguida, 4 mL de álcool n-butílico foram adicionados e centrifugados a 2000 rpm. A absorbância dos sobrenadantes foi medida a 532 nm. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. A concentração de MDA nas amostras foram obtidas segundo a equação 4 e expressas em nmol.mL⁻¹.

$$MDA = Abs amostra \times \left(\frac{20 \times 220,32}{Abs padrão} \right) \quad (4)$$

2.4.5 Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células mononucleares de sangue periférico humano

Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) foram coletadas e isoladas com o reagente Ficoll-Paque (GE Healthcare), e transferidas para placas de 12 poços na densidade de 5x10⁵ células por poço. As PBMC foram incubadas com 2000 µL de diferentes concentrações do ECSp (5-100 µg.mL⁻¹) durante 24 h a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h, 15 µL de H₂O₂ a 10 mM foram adicionados aos poços para a indução do estresse oxidativo. Após 30 min de incubação, as células foram lavadas com PBS e receberam 100 µL de DCFH (10 mM) para a determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio. Após incubação de 30 min a 37 °C as PBMC foram analisadas por citometria de fluxo, onde 10 mil eventos foram obtidos no citômetro BD Accuri C6 Plus. Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram determinados pela quantificação das médias de

intensidade de fluorescência (MFI) em FITC-A. Os resultados apresentados são uma média de 3 experimentos realizados em triplicata.

2.5 Atividade antioxidante endógena

Para determinar a atividade antioxidante enzimática endógena, foram coletados 5 mL de sangue periférico de um indivíduo adulto saudável, centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. O plasma e a camada de leucócitos foram descartados e os eritrócitos foram lavados três vezes em NaCl a 0,9% para preparação de uma suspensão de eritrócitos a 40%. Diferentes concentrações de ECSp (5-1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram incubadas com a suspensão de eritrócitos a 37 °C durante 20 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm durante 5 min, o sobrenadante foi descartado e 50 μL dos eritrócitos foram diluídos na proporção de 1:20 (v:v) em água destilada, obtendo-se um lisado celular composto pelo conteúdo intracelular de eritrócitos previamente incubados com o ECSp durante 20 min. Este lisado celular foi utilizado para a determinação das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Este lisado também foi utilizado para a determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada segundo Crouch et al., (1981) com modificações. Esta técnica baseia-se na redução do NBT em azul de formazan. Um volume de 30 μL do lisado celular de eritrócitos foi transferido para microplacas de 96 poços, onde foram adicionados 70 μL de solução de Nitroazul de Tetrazólio (NBT, a 100 μM) e 100 μL de hidroxilamina (84,755 mM). A absorbância foi mensurada a 560 nm no início da reação e após 4 horas. A reação ocorreu em temperatura ambiente protegidas da luz. Os resultados foram expressos como % de NBT.

Atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi realizado segundo Aebi et al., (1984) com modificações. 10 μL da suspensão de eritrócitos lisados foi pipetado em cubetas de quartzo, adicionados 990 μL de meio de reação [(tampão Tris-HCl 1,0M, EDTA 50 mM, pH 8,0 (2,5 mL)], água deionizada (47,32 mL) e peróxido de hidrogênio (180 μL)]. As absorbâncias foram mensuradas a 240 nm imediatamente e após 5 min de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Atividade da GSH

A disponibilidade da GSH foi realizada segundo Reddy et al (2004) com modificações. 300 µL de eritrócitos lisados foi precipitado com 300 µL de ácido tricloroacético (5%), e centrifugado a 3000 rpm por 10 min. Em seguida, em 75 µL do sobrenadante foram adicionados 150 µL de tampão fosfato de sódio (pH 8,0) e 15 µL de DTNB. A solução foi incubada por 30 min e as absorbâncias foram mensuradas a 412 nm.

$$\text{Atividade de GSH (\%)} = \left(\frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \quad (5)$$

2.6 Animais

2.6.1 Comitê de ética

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Grande Dourados, Brasil, sob o número de protocolo 37/2018.

2.6.2 Toxicidade aguda

Camundongos fêmeas C57BL/6 (n=15) com aproximadamente 22 g foram aclimatados em biotério com ciclo claro/escuro (12 h), temperatura controlada (22 ± 2 °C) e alimentados com a dieta controle e água *ad libitum*. Posteriormente foram divididos em três grupos experimentais, tratados com dose única via gavagem, de acordo com os respectivos tratamentos: (I) CT (água), (II) ECSp-2 (ECSp, 2 g.Kg⁻¹ massa corporal) e (III) ECSp-5 (ECSp, 5 g.Kg⁻¹ de massa corporal). O consumo de ração, ingestão de água, massa corporal, piloereção e mortalidade foram monitorados por 14 d. Após o período de tratamento os animais foram submetidos a jejum de 8 h, anestesiados e eutanasiados. Órgãos (fígado, rins, baço coração, pulmão e sistema nervoso) foram coletados, pesados separadamente e analisados macroscopicamente. Adicionalmente, amostras de sangue foram coletadas para a determinações hematológicas usando o equipamento COBAS (Roche).

2.6.3 Avaliação metabólica

2.6.3.1 Dietas

As dietas padrão (AIN-93M) e hiperlipídica (HF9 60) foram adquiridas da empresa PragSoluções Biociências, Brasil. A dieta padrão para roedores apresenta valor calórico de 377 Kcal.100 g⁻¹. A dieta hiperlipídica contém 60% de lipídeos em sua composição, com valor calórico de 576 Kcal.100 g⁻¹. Essa dieta foi denominada dieta hiperlipídica (HFD) e utilizada para alimentação dos animais.

2.6.3.2 Desenho experimental e procedimentos

Camundongos machos C57BL/6 (n=32) foram divididos em dois grupos, grupo CT (animais alimentados com dieta padrão, n=8) e grupo HFD, animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 120 d, para que a síndrome metabólica fosse estabelecida. Após o período de indução da síndrome metabólica, os animais do grupo HFD foram subdivididos em 3 grupos experimentais (n=8), tratados por gavagem durante período de 60 d. Os animais receberam durante o tratamento (I) água (HFD-CT), (II) sinvastatina 30 mg.Kg⁻¹ (HFD-Sinv) ou (III) ECSp 400 mg.Kg⁻¹ (HFD-ECSp).

2.6.3.3 Órgãos e tecidos

Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com Ketamina e xilazina eutanaziados por injeção de 1 mg de Ketamina e Xilasina por Kg (1:1). Após a eutanásia, os depósitos de tecido adiposo marrom (TAM) e branco (TAB) retroperitoneal, epidídimal, mesentérico e subcutâneo inguinal, músculo gastrocnêmio, olho, sistema nervoso, pâncreas, rins, baço fígado, coração e duodeno foram retirados e pesados individualmente. O sangue dos animais foi coletado por acesso da artéria aorta, os parâmetros bioquímicos de glicemia, colesterol total, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST) e a ALT (alanina aminotransferase) foram determinados com o auxílio de um analisador bioquímico semiautomático (LABQUEST, Bioplus, Barueri-SP, Brasil).

2.5.3.4 Dosagem de malondialdeído em órgãos

O conteúdo de malondialdeído (MDA) presente nos órgãos dos animais determinado segundo o método descrito por CUNHA et al. (2018). Amostras dos órgãos (coração, sistema nervoso, fígado, rins e olhos) foram homogeneizados com KCl 1,1% e centrifugados a 3000 rpm durante 10 min. Em seguida, 500 µL do sobrenadante dos tecidos ou 500 µL do padrão MDA 20 µM foram adicionados a 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 10 nmol.mL⁻¹

¹), seguido de incubação a 96 °C durante 45 min. As amostras foram resfriadas durante 15 min em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 3 mL de álcool n-butílico nas amostras, que foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm em espectrofotômetro UV/VIS modelo T70 (PG Instruments, Leicestershire, UK). A concentração de MDA nas amostras foi expressa como nmol.mL⁻¹.

2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido de *post test Student Newman Keuls*. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0.05$.

3 Resultados

3.1 Constituição química do ECSp

O ECSp apresentou rendimento final de 23 %. Uma amostra foi analisada por CLAE-MS, nos modos de ionização positivo e negativo. A análise do ECSp revelou a presença de di-O-hexosideo, ácido hidroxicítrico, ácido cítrico, ácido gálico, catequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de (epi)galocatequina, galato de epi)catequina e ácido elágico, conforme os cromatogramas apresentados na Figura 1.

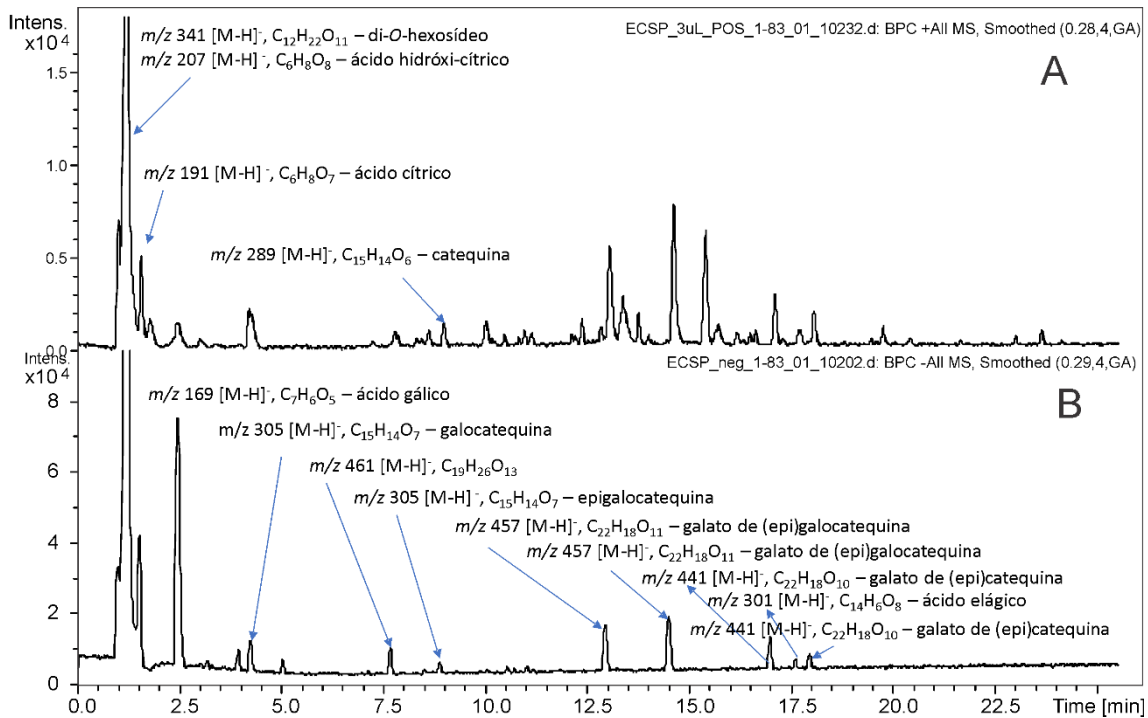


Figura 1. Cromatogramas de pico base obtidos em modo de ionização positiva (A) e negativa (B) do extrato aquoso da casca do caule de *Spondias purpurea* L. Em destaque encontram-se as substâncias identificadas.

3.2 Atividade antioxidante

3.2.1 Ensaio de captura do radical ABTS e DPPH

No ensaio de captura do radical ABTS, o IC₅₀ do ECSp foi 10% superior ao BHT e 63% inferior ao AA, enquanto a atividade máxima foi semelhante à do BHT e inferior à do AA (Tabela 1). No ensaio de captura do radical DPPH, o IC₅₀ do ECSp foi 53% superior ao BHT, alcançando inibição máxima superior com uma concentração 50% menor. Em comparação ao AA, o IC₅₀ do ECSp foi 64% inferior ao AA, contudo, ambos compostos apresentaram inibição máxima nas mesmas concentrações (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade de captura dos radicais livres ABTS e DPPH do extrato aquoso da casca do caule de *Spondias purpurea* L. (ECSp) e antioxidantes padrão, ácido ascórbico (AA) e hidroxitolueno butilado (BHT).

Amostra	ABTS		DPPH			
	IC ₅₀ [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]	Inibição máxima %	Inibição máxima [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]	IC ₅₀ [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]	Inibição máxima %	Inibição máxima [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]
AA	4,9 ± 0,30	93	10	4,3 ± 0,20	92	25
BHT	9,0 ± 1,40	98	50	15,2 ± 1,50	80	50
ECSp	8,1 ± 1,20	94	50	7,1 ± 0,70	91	25

IC₅₀= concentração capaz de inibir 50% dos radicais ABTS e DPPH. Os valores são expressos como média ± EPM.

3.2.2 Oxidação de BSA induzido por AAPH

A incubação da proteína com o agente oxidante AAPH promoveu sua oxidação em aproximadamente 74 %, sendo o ECSp capaz de prevenir em 15% esse efeito a partir da concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, chegando em 100 % de proteção na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 2).

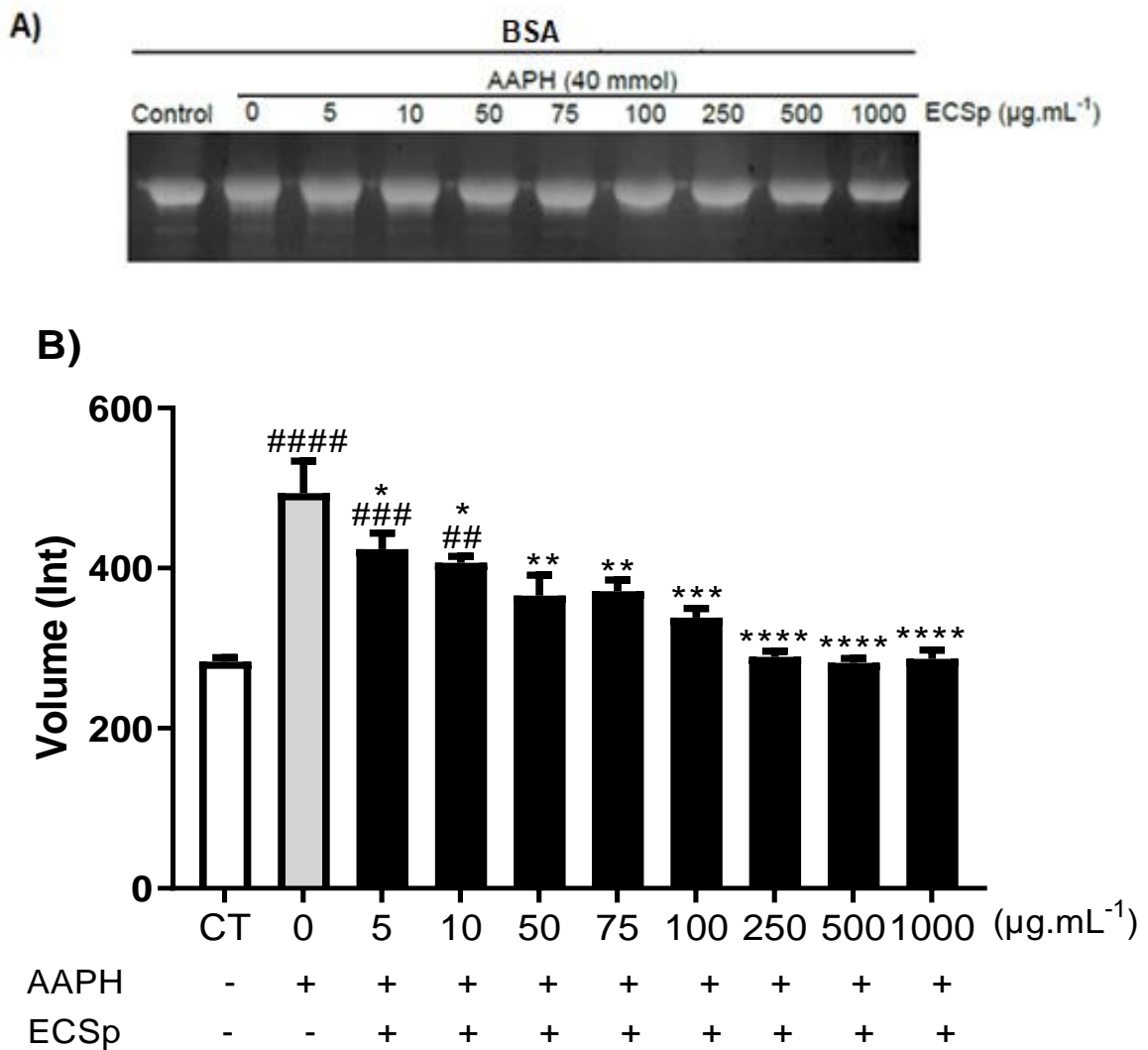


Figura 2. Oxidação de BSA. A) SDS-PAGE 12% e B) Inibição da oxidação de BSA induzida por AAPH. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ECSp= Extrato aquoso da casca do caule de *Spondias purpurea*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$ e **** $P < 0.00001$ versus ECSp ($0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). ### $P < 0,01$ e #### $P < 0,001$ versus grupo CT.

3.2.3 Fragmentação de DNA induzido por peróxido de hidrogênio e luz ultravioleta

Diferentes concentrações do ECSp ($10\text{-}1.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram capazes de proteger o DNA plasmidial da fragmentação induzida pela exposição a H_2O_2 +UV (Figura 3). A partir de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o ECSp foi capaz de prevenir a fragmentação do DNA em 50%, sendo observado um efeito dose-dependente entre a concentração de ECSp e a proteção do DNA (Figura 3).

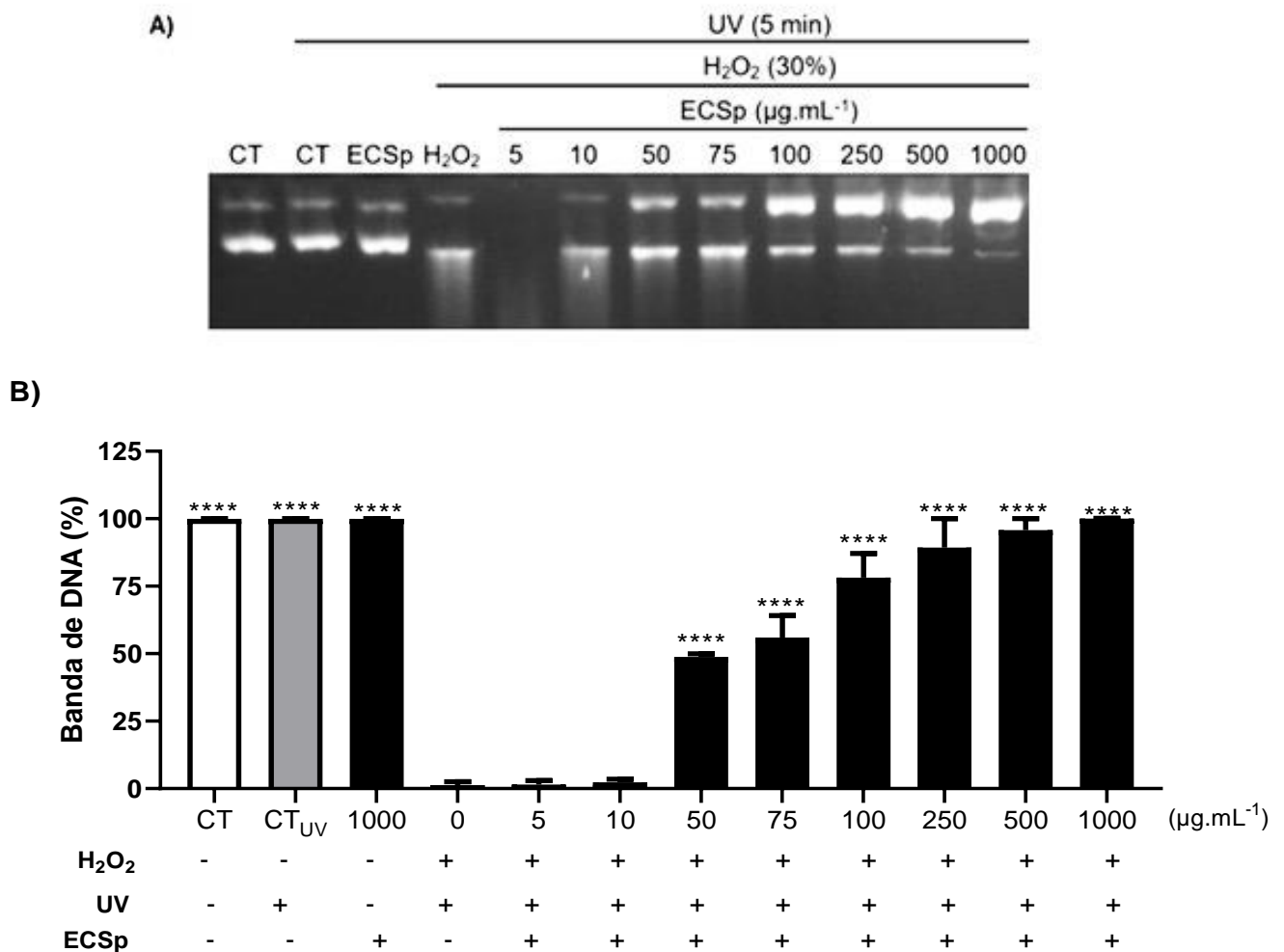


Figura 3. Fragmentação de DNA plasmidial. A) Gel de agarose 1% e B) Determinação do conteúdo de DNA plasmidial após a exposição ao H₂O₂ e UV. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ECSp= Extrato aquoso da casca do caule de *Spondias purpurea*. CT= controle e CT_{UV}= Controle + ultravioleta. * P<0,05 versus EPSp (0).

3.2.4 Determinação das atividades hemolítica, de inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH e dosagem de MDA

Os eritrócitos incubados com diferentes concentrações do antioxidante padrão AA (5-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e do ECSp (5-1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) não sofreram hemólise durante o período avaliado (240 min). A hemólise foi observada nas doses mais altas de AA, 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 4 A).

Eritrócitos incubados com AAPH apresentaram hemólise oxidativa de aproximadamente 40%. O AA promoveu redução da hemólise oxidativa a partir da concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Contudo, na concentração de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o AA passou

a ser pró-oxidante (Figura 4B). O ECSp foi capaz de reduzir a hemólise oxidativa a partir de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, promovendo redução de 26, 48, 65, 64 e 62% nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

O MDA gerado pela peroxidação lipídica nos eritrócitos tratados com AAPH foi de $4.000 \text{ nmol.mL}^{-1}$ (Figura 4C). A incubação com AA reduziu o MDA gerado em 44, 43 e 66% nas concentrações de 50, 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A maior concentração de AA ($1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) promoveu elevação da concentração de MDA em 25% comparado ao grupo controle. Todas as concentrações do ECSp avaliadas promoveram redução na concentração de MDA produzido, sendo de 37, 36, 56, 72 e 80% nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ECSp, respectivamente.

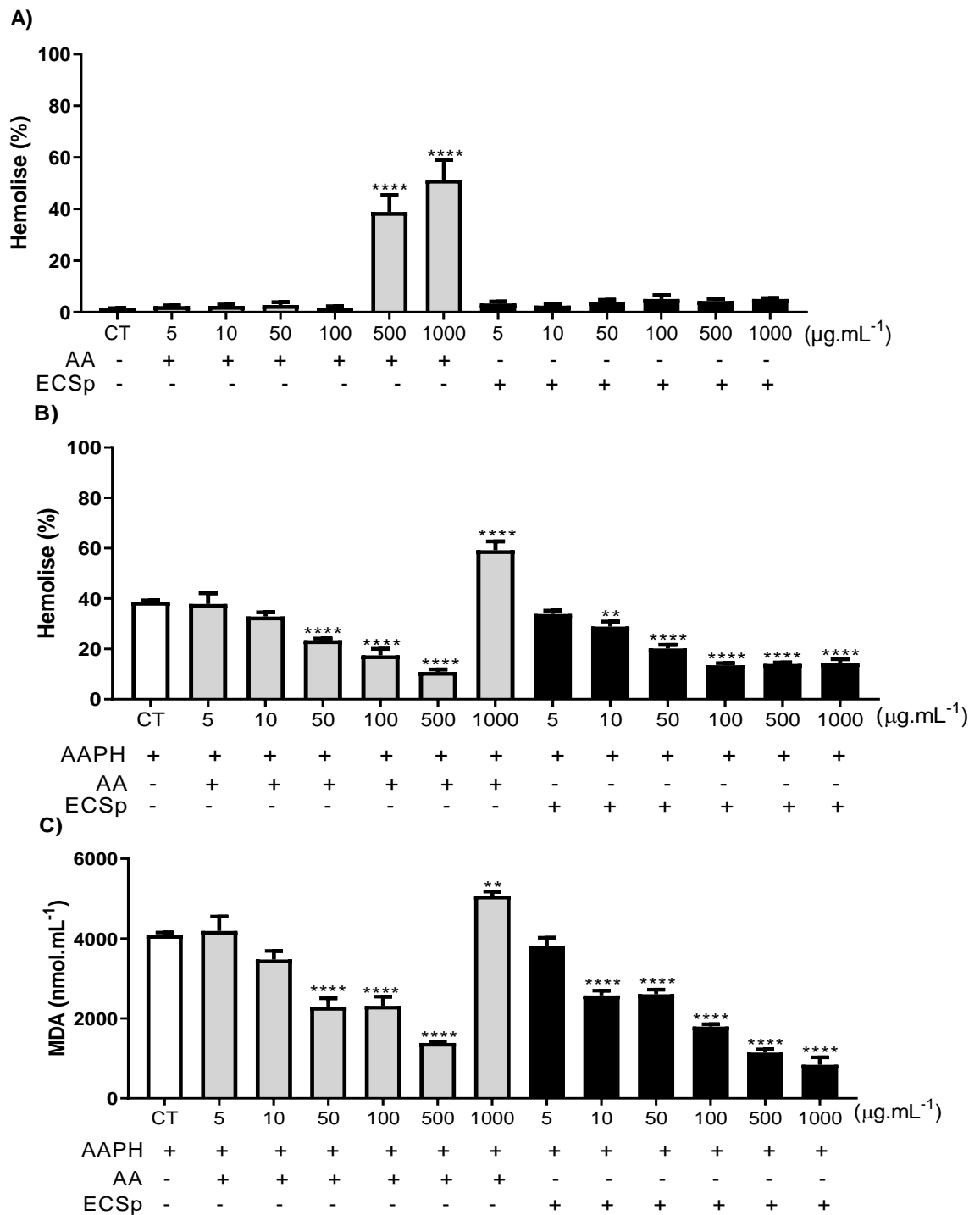


Figura 4: Hemólise e conteúdo de MDA em eritrócitos humanos avaliados após 240 min de tratamento. Atividade de AA ou ECSp em (A) hemólise, (B) inibição da hemólise induzida por AAPH e (C) conteúdo de malondialdeído gerado no processo de peroxidação lipídica induzida por AAPH. AA= Ácido ascórbico; ECSp= Extrato aquoso da casca do caule de *Spondias purpurea*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ e **** $P < 0.0001$ comparados com o grupo CT.

3.2.5 Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em PBMC

Os PBMC foram incubados na presença ou ausência de ECSp e após 2 h adicionado H_2O_2 . A adição de H_2O_2 elevou o nível de ROS nas PBMC em aproximadamente 2 vezes, como demonstrado pela marcação positiva para DCFH por citometria de fluxo (Figura 5A). A incubação das PBMC com diferentes concentrações do ECSp ($5\text{-}100\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) promoveu a redução intensidade de fluorescência de DCFH em todas as concentrações avaliadas, sendo que os níveis de espécies reativas de oxigênio reduziram em células incubadas com 5, 10, 50 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ECSp promoveram redução de 48, 60, 74 e 53% nos níveis de DCFH, respectivamente, quando comparado ao grupo ECSP 0 (Figura 5B).

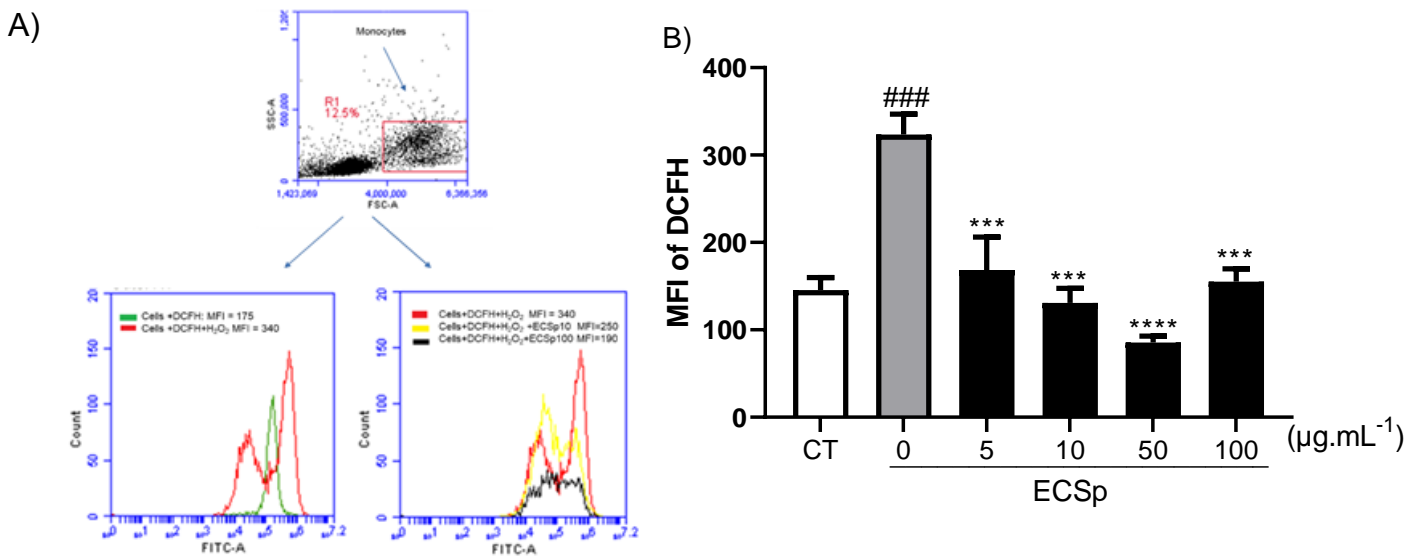


Figura 5: Estresse oxidativo induzido por H₂O₂ em PBMC. A) Sobreposição dos gráficos do tipo histograma representativos de cada condição de incubação de células marcadas com DCFH. B) Média da intensidade de fluorescência de células marcadas DCFH incubadas com H₂O₂ e ECSp (0-100 µg.mL⁻¹). ECSp= Extrato aquoso da casca do caule de *Spondias purpurea*. Os dados são apresentados como média ± EPM. ###P<0,0001 comparados ao grupo CT e *** P<0,001 comparados ao grupo ECSp (0).

3.3 Atividade antioxidante enzimática endógena

No ensaio que avalia a atividade de SOD, foi observado que a atividade de SOD basal foi de 21 %. Após a adição de hidroxilamina atividade desta enzima foi reduzida a 0,8%. O ECSp foi capaz de promover a redução NBT, o qual é determinado indiretamente pela mudança de cor no ensaio, promovendo um aumento na atividade desta enzima em todas as concentrações avaliadas (Figura 6 A). Quando avaliado a atividade da catalase, observamos que o ECSp nas concentrações de 500 e 1000 µg.mL⁻¹, promoveu uma redução na atividade desta enzima, quando comparado ao grupo CT e H₂O₂ (figura 6 B). Todavia, observamos um aumento na disponibilidade de GSH a partir da concentração de 10 µg.mL⁻¹ (figura 6 C).

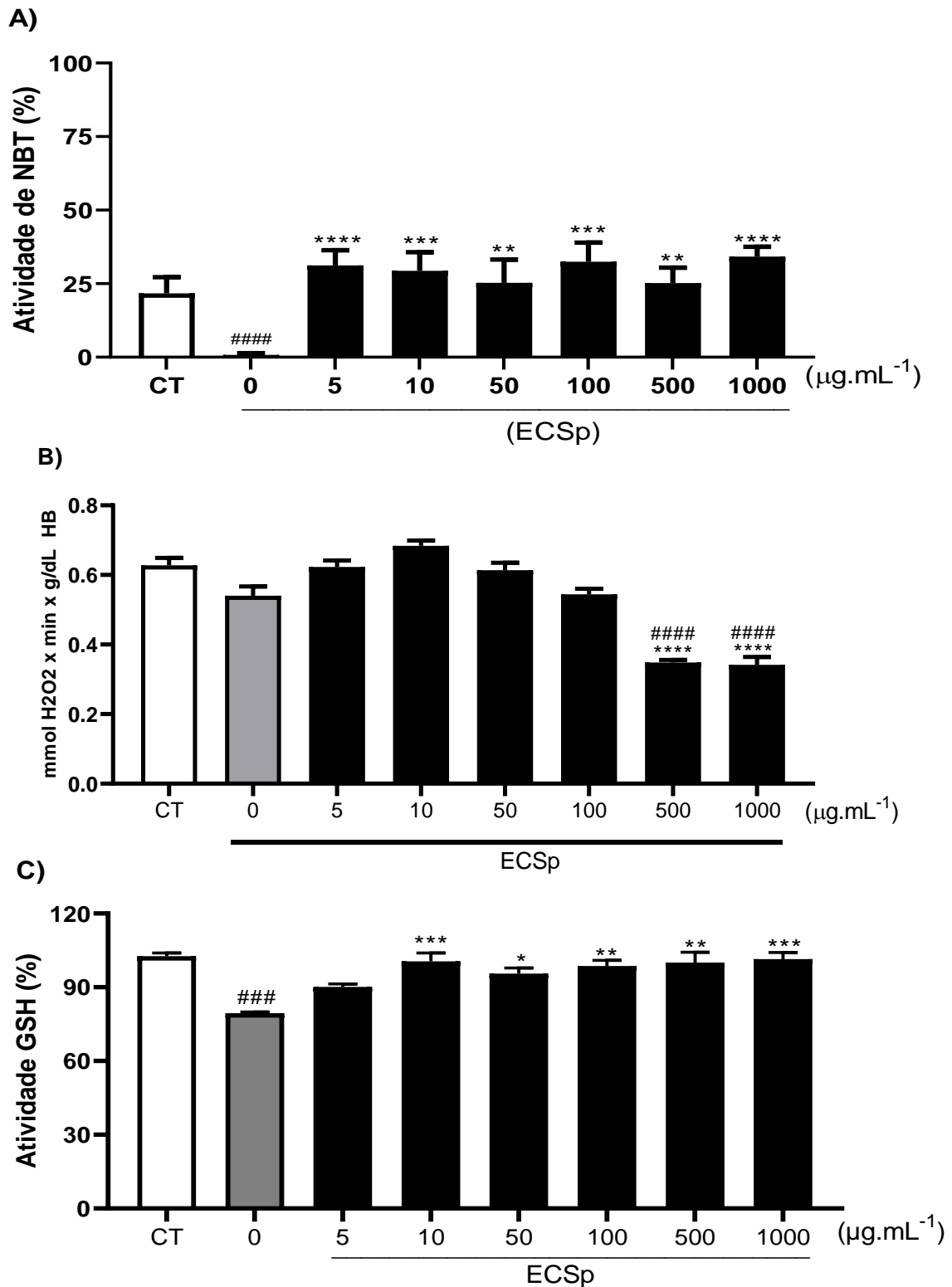


Figura 6. Atividade antioxidante enzimática. (A) Atividade de superóxido dismutase; (B) Atividade de catalase e (C) disponibilidade de glutatona reduzida. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. # $P < 0.05$ e ### $P < 0.0001$ comparados com o grupo Controle (CT), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.001$ comparados com o grupo ECSp (0).

3.4 Animais

3.4.1 Toxicidade aguda

Os animais que receberam 2 e 5 g.Kg⁻¹ do ECSp por via oral não apresentaram sinais de toxicidade ou mortalidade. Não foram observadas alterações na massa corporal, ingesta alimentar e hídrica. Adicionalmente, observou-se aumento no fígado de 26 e 22% e redução nos níveis de plaquetas de 23 e 28% para os grupos 2 g.Kg⁻¹ e 5 g.Kg⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Toxicidade aguda: órgãos e parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas tratadas com 2 e 5 g.Kg⁻¹ do ECSp por via oral.

Parâmetros	Control	2 g.Kg ⁻¹	5 g.Kg ⁻¹
Fígado (g.100 g ⁻¹ MC)	4,03±0,07 ^a	5,07±0,25 ^b	4,96±0,18 ^b
Rim (g.100 g ⁻¹ MC)	1,12±0,04 ^a	1,11±0,06 ^a	1,12±0,03 ^a
Baço (g.100 g ⁻¹ MC)	0,31±0,02 ^a	0,32±0,02 ^a	0,30±0,02 ^a
Coração (g.100 g ⁻¹ MC)	0,50±0,02 ^a	0,51±0,01 ^a	0,53±0,01 ^a
Pulmão (g.100 g ⁻¹ MC)	0,66±0,02 ^a	0,72±0,02 ^a	0,74±0,07 ^a
SN (g.100 g ⁻¹ MC)	1,79±0,05 ^a	1,92±0,05 ^a	1,72±0,07 ^a
Eritrócitos (10 ⁶ .µL ⁻¹)	10,26±0,40 ^a	9,68±0,09 ^a	9,44±0,11 ^a
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	14,22±0,47 ^a	13,82±0,15 ^a	13,40±0,23 ^a
Hematócrito (%)	56,46±2,51 ^a	53,86±0,61 ^a	51,54±0,59 ^a
VCM (fL)	54,98±0,51 ^a	55,62±0,42 ^a	54,60±0,31 ^a
HCM (pg)	13,86±0,12 ^a	14,26±0,11 ^a	14,18±0,13 ^a
CHCM (%)	25,22±0,30 ^a	25,68±0,05 ^a	26,00±0,16 ^a
RDW-SD (fL)	26,48±0,57 ^a	26,12±0,16 ^a	25,84±0,40 ^a
RDW-CV (%)	19,82±0,40 ^a	18,72±0,12 ^a	18,70±0,07 ^a
Plaqueta (10 ³ .µL ⁻¹)	919,00±244,00 ^a	706,20±34,86 ^b	661,00±31,26 ^b
Leucócitos (10 ³ .µL ⁻¹)	2,06±0,25 ^a	4,83±0,41 ^b	5,07±0,23 ^b
Neutrófilo (%)	0,09±0,03 ^a	0,11±0,01 ^a	0,08±0,02 ^a
Linfócito (%)	1,98±0,24 ^a	4,71±0,40 ^b	4,97±0,24 ^b
Monócito (%)	0,02±0,01 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a
Eosinófilo (%)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Basófilo (%)	0,01±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a

Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos com P<0,05.

3.4.2 Atividades do ECSp sobre o metabolismo

A dieta hiperlipídica (HFD) administrada durante 120 d induziu aumento na massa corporal dos animais em 47%, comparados aos animais alimentados com dieta padrão (grupo Control) (Figura 7A). Após 60 d de tratamento com água (HFD-CT), sinvastatina 30 mg.Kg⁻¹ (HFD-Sinv) e ECSp 400 mg.Kg⁻¹ (HFD-ECSp), foi observado massa corporal e acúmulo de tecido adiposo branco semelhantes entre os animais alimentados com HFD, independentemente do tratamento (Figura 7A e 7B). Adicionalmente, não foi observado alteração na ingestão calórica entre os tratamentos (Figura 7C). Contudo, os animais alimentados com HFD apresentaram uma menor ingestão de água quando comparados ao grupo Control (Figura 7D). Não foram observadas diferenças nas massas dos órgãos avaliados após a eutanásia entre os tratamentos (dados não apresentados).

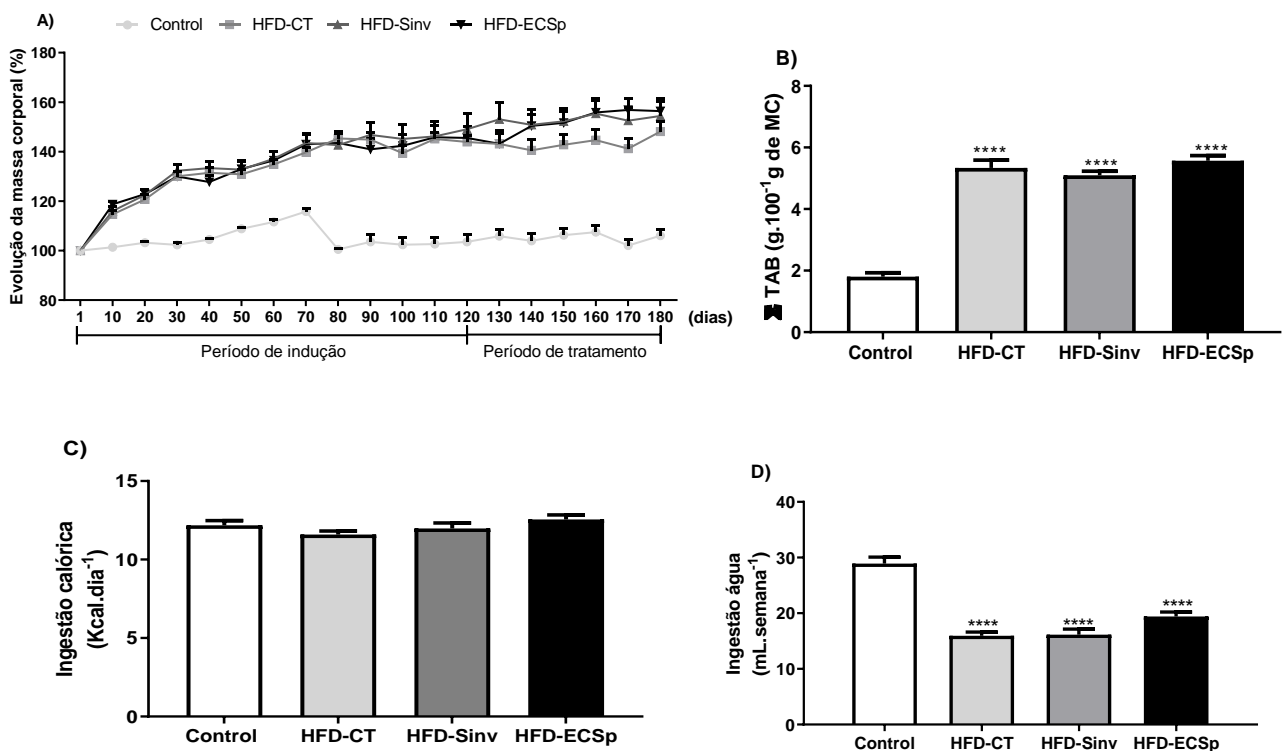


Figura 7. (A) Evolução da massa corporal, (B) somatório dos depósitos de tecido adiposo branco, (C) ingestão calórica e (D) consumo de água de animais alimentados com HFD durante 180 dias. Entre os dias 120 e 180 com água (HFD-CT), Sinvastatina (30 mg.Kg⁻¹ de massa corporal, HFD-Sinv) ou ECSp (400 mg.Kg⁻¹ de massa corporal, HFD-ECSp). Um grupo de animais foi tratado por igual período com dieta controle e água (Control). **P<0.001, ***P<0.0001 e ****P<0.0001 comparado com o grupo Control.

Em relação a dieta controle, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento de 35, 30 e 73% nos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicemia, respectivamente. Comparados aos animais do grupo HFD-CT, o tratamento com sinvastatina e com o ECSp reduziu o nível de colesterol em 17 e 16%, respectivamente. Os níveis séricos de triglicerídeos e glicose não diferiram entre os grupos avaliados. Não foram observadas alterações nos níveis séricos de AST entre todos os grupos avaliados. O nível sérico da enzima hepática ALT apresentou uma elevação de 188% quando compararmos Control e HFD-CT. Os tratamentos HFD-Sinv e HFD-ECSp reduziram os níveis séricos de ALT.

Tabela 3. Massa corporal e parâmetros bioquímicos de camundongos alimentados com dieta controle (Control-água), dieta hipercalórica (HFD-CT), dieta hipercalórica e sinvastatina (HFD-Sinv, 30 mg.Kg⁻¹ MC), e dieta hipercalórica e *Spondias purpurea* (HFD-ECSp, 400 mg.Kg⁻¹ MC).

	Control	HFD-CT	HFD-Sinv	HFD-ECSp
Parâmetros	g·100 g ⁻¹	g·100 g ⁻¹	g·100 g ⁻¹	g·100 g ⁻¹
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	161,6±1,6 ^a	218,4±17,7 ^b	181,4±4,6 ^a	182,7±3,3 ^a
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	171,1±6,3 ^a	221,8±11,5 ^b	185,4±3,4 ^a	197,0±10,2 ^{ab}
Glicemia (mg.dL ⁻¹)	82,5±2,6 ^a	143,0±5,6 ^b	149,6±5,9 ^b	134,3±7,4 ^b
AST (U.L ⁻¹)	82,8±5,6 ^a	71,5±6,8 ^a	76,3±8,6 ^a	62,5±4,5 ^a
ALT (U.L ⁻¹)	24,9±3,3 ^a	71,8±8,9 ^b	54±10,7 ^{ab}	40,6±8,9 ^a

Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos com P<0,05.

Com exceção dos olhos, observamos que a HFD aumentou os níveis de MDA em todos os órgãos avaliados (Figura 6), sendo observado um aumento de 50, 224, 157 e 84% nos níveis de MDA no sistema nervoso, rins, fígado e coração, respectivamente (Tabela 4). Observamos ainda que o ECSp foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA de todos os tecidos avaliados, com exceção dos olhos. Em comparação com HFD-CT, o nível de MDA no coração, fígado, rim e sistema nervoso

reduziram 46%, 67% 61% e 72%, respectivamente (Figura 6). O tratamento HFD-Siv não foi eficiente na redução de MDA sistema nervoso.

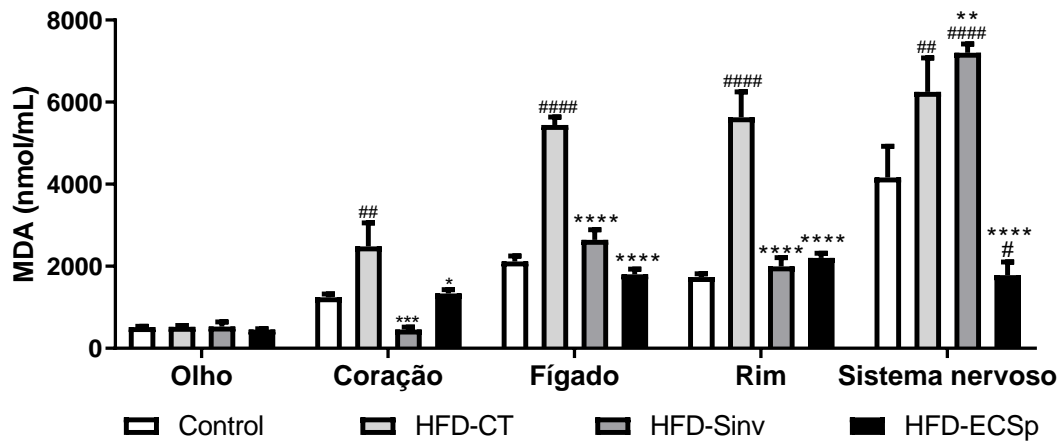


Figura 6. Dosagem de MDA ($\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) nos diferentes órgãos de camundongos alimentados com HFD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ e **** $P < 0.0001$ versus grupo Control. ## $P < 0.001$ e #### $P < 0.0001$ versus grupo HFD.

4 Discussão

Durante o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo, as espécies reativas promovem danos aos componentes celulares. Esse efeito deletério pode causar o desenvolvimento de diversas doenças como obesidade, dislipidemias, diabetes e câncer [1–4]. Assim, é crescente a busca por plantas ou compostos que possam ser utilizados como alternativas naturais para o tratamento dessas doenças.

Nas cascas do caule de *S. purpurea* foram identificados diversos compostos com atividade antioxidante como: di-O-hexosideo, ácido hidroxicítrico, ácido cítrico, ácido gálico, catequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de (epi)galocatequina e ácido elágico. Alguns compostos já foram descritos em diferentes partes de *S. purpurea*. O composto epigalocatequina foi descrito presente nas folhas [17], bem como, ácido gálico, derivados de campeferol e derivados de quercetina foram descritos para as cascas do fruto de *S. purpurea* [18]. Sendo que esses compostos apresentam atividade antioxidante, através da eliminação das EROs ou através da modulação de enzimas antioxidantes [19–21].

A atividade antioxidante do ECSp foi avaliada *in vitro* através dos ensaios de captura de radicais livres, ABTS e DPPH e ensaios de proteção a macromoléculas

contra agentes oxidantes. Nos ensaios de ABTS e DPPH o ECSp se mostrou tão eficiente quanto os compostos isolados AA e BHT. A ação antioxidante observada no ECSp corrobora com dados atribuídos ao gênero *Spondias*, como a atividade antioxidante nas cascas de *S. pinnata*, em frutos de *S. purpurea*, *S. tuberosa* e *S. dulcis*, e nas folhas de *S. purpurea* e *S. dulcis* [12,17,22–24].

As EROs são capazes de promoverem oxidação de proteínas, DNA e lipídeos [25–27]. Adicionalmente, o ECSp foi capaz de impedir a oxidação de proteínas e a fragmentação de DNA causada por agentes oxidantes. Esse efeito protetor pode ser atribuído as classes de compostos presentes no ECSp, uma vez que, fenóis totais e flavonoides de são capazes de prevenir danos oxidativo *in vitro* e *in vivo* [28–30].

Devido à sua suscetibilidade à oxidação, os eritrócitos têm sido utilizados como modelo celular para investigar danos oxidativos nas membranas biológicas. O processo de oxidação dos lipídeos de membrana, causadas pelas EROs, pode levar a formação de MDA, que tem sido associada a uma variedade de eventos patológicos. Os resultados demonstraram que o ECSp não possui propriedades hemolíticas, além de ser capaz de prevenir a hemólise oxidativa e a peroxidação lipídica induzida por AAPH. A capacidade do ECSp em reduzir o subproduto da peroxidação lipídica, MDA, corrobora com a redução de MDA descrito para o fígado de animais diabéticos tratados com *S. tuberosa* [9].

Adicionalmente, PBMC foram utilizados para avaliar efeitos citoprotetores do ECSp. Nesse ensaio, o ECSp foi capaz de diminuir a produção intracelular de EROs em PBMC. Demonstrando que ECSp possui efeitos citoprotetores, atuando na membrana celular, além de diminuir a produção intracelular de EROs.

Para combater o excesso de EROs, o organismo dispõe de sistema antioxidantes enzimáticos composto por três enzimas. A enzima SOD é a primeira linha de defesa celular contra os danos das EROs. Esta enzima é responsável por converter superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Em nosso estudo, foi possível observar um aumento na atividade da enzima SOD após a incubação com o ECSp. A segunda enzima do sistema antioxidante é a CAT, responsável por converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio [33]. O ECSp foi capaz de reduzir a atividade da enzima catalase nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ após cinco minutos. Nossos resultados corroboram com os dados descritos para casca do caule de *S. tuberosa*, a qual foi capaz de aumentar a atividade de superóxido dismutase e catalase [9].

A terceira enzima do sistema antioxidante é a GPx, que converte peróxido de hidrogênio em água, utilizando nesse processo duas moléculas de GSH, gerando uma de GSSH [34]. Nesse estudo avaliamos a disponibilidade de GSH. A GSH funciona como um substrato e um cofator para a atividade desta enzima. Quando incubados com ECSp, não foi observado alterações na disponibilidade de GSH. Essas ações antioxidantes observadas *in vitro* podem ser atribuídos aos constituintes químicos encontrados no ECSp.

O estresse oxidativo pode ocorrer em resposta à dieta hipercalórica em indivíduos obesos, dislipidêmicos, diabéticos, bem como com síndrome metabólica [35,36]. Este quadro ocorre elevada taxa de peroxidação lipídica, com consequência sobre o desenvolvimento de dislipidemias e agravo do quadro de obesidade. Além disso, a obesidade pode aumentar a lipoperoxidação miocárdica [37,38]. Assim, avaliamos o potencial do ECSp na proteção oxidativa em animais obesos após exposição a dieta hiperlipídica e seu pontencial em atuar sobre as dislipidemias. Vale ressaltar que o modelo foi validado, pois a dieta hiperlipídica induziu nos animais do grupo HFD os sinais clássicos da síndrome metabólica- obesidade (aumento da massa corporal total e da massa gorda), hiperglicemia e hiperlipidemia, que se correlacionou com aumento de MDA nos tecidos.

A administração do ECSp foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica no coração, fígado e rim, bem como reduzi-la no sistema nervoso e olhos. Os resultados demonstraram a capacidade do ECSp em prevenir e reduzir os danos oxidativo em órgãos-vitais. Os resultados *in vitro* corroboraram as propriedades farmacológicas observadas para os animais com síndrome metabólica tratados com o ECSp.

O ECS também demonstrou efeito o anti-hiperlipidêmico pela redução de colesterol, de forma semelhante ao do medicamento comercial sinvastatina. Esse resultado pode resultar da ação sinérgica dos vários compostos presentes no ECSp, dentre eles a catequina e seus derivados. Os compostos epigalocatequina-3-galato e (-) – epigalocatequina efetivos na promoção da redução de colesterol através da inibição da síntese de hidroxil-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGR) [39,40].

A ausência de mortalidade e sinais de toxicidade após a administração de altas doses do ECSp em modelo animal corroborou os dados observados para a casca do caule de *S. tuberosa* [41], estimulando a avaliação clínico de suas propriedades farmacológicas. Além disso, a administração do ECSp promoveu uma redução nos níveis de plaquetas, esse resultado pode indicar um possível efeito antitrombótico do

ECSp, uma vez que outras espécies do gênero *Spondias* como *S. dulcis* e *S. pinnata* apresentaram essa propriedade farmacológica [23,42].

Conclusão

No ECSp foram identificados diferentes compostos químicos, corroborando com ações farmacológicas relatadas neste estudo, tais como propriedades antioxidante e anti-hipercolesterolêmica. Além disso, o ECSp apresentou efeitos antioxidantes *in vitro*, como a proteção de macromoléculas contra diferentes espécies reativas. Os ensaios *in vivo* demonstraram que os efeitos antioxidantes observados anteriormente são reproduzidos em modelo animal, contribuindo com a redução dos níveis de MDA em diversos órgãos, além de apresentar propriedades anti-hipercolesterolêmicas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

5 Referências

1. Lü, J.-M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 840–860.
2. Sultan, S. Reviewing the Protective Role of Antioxidants in Oxidative Stress Caused by Free Radicals. *Asian Pacific Journal of Health Sciences* **2014**, *1*, 401–406.
3. Stocker, R.; Keaney, J.F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews* **2004**, *84*, 1381–1478.
4. Taleb, A.; Ahmad, K.A.; Ihsan, A.U.; Qu, J.; Lin, N.; Hezam, K.; Koju, N.; Hui, L.; Qilong, D. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *102*, 689–698.

5. Rahman, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* **2007**, *2*, 219–236.
6. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, *39*, 44–84.
7. Pisoschi, A.M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* **2015**, *97*, 55–74.
8. Boligon, A.A.; Pereira, R.P.; Feltrin, A.C.; Machado, M.M.; Janovik, V.; Rocha, J.B.T.; Athayde, M.L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 6592–6598.
9. de Moura Barbosa, H.; Amaral, D.; do Nascimento, J.N.; Machado, D.C.; de Sousa Araújo, T.A.; de Albuquerque, U.P.; Guedes da Silva Almeida, J.R.; Rolim, L.A.; Lopes, N.P.; Gomes, D.A.; et al. *Spondias tuberosa* inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *227*, 248–257.
10. Chaudhuri, D.; Ghate, N.B.; Panja, S.; Mandal, N. Role of phenolics from *Spondias pinnata* bark in amelioration of iron overload induced hepatic damage in Swiss albino mice. *BMC Pharmacol Toxicol* **2016**, *17*.
11. de Almeida, C.L.F.; Brito, S.A.; de Santana, T.I.; Costa, H.B.A.; de Carvalho Júnior, C.H.R.; da Silva, M.V.; de Almeida, L.L.; Rolim, L.A.; dos Santos, V.L.; Wanderley, A.G.; et al. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*.
12. Muñiz, A.; Garcia, E.; Gonzalez, D.; Zuñiga, L. Antioxidant Activity and In Vitro Antiglycation of the Fruit of *Spondias purpurea*. *Evid Based Complement Alternat Med* **2018**, *2018*, 5613704.
13. Rufino, M. do S.M.; Alves, R.E.; de 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* **2010**, *121*, 996–1002.
14. Gupta, D.; Gupta, R.K. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2011**, *11*, 13.
15. Kumar, A.; Chattopadhyay, S. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 1377–1384.
16. Cunha, J. da S.M. da; Alfredo, T.M.; Santos, J.M. dos; Junior, V.V.A.; Rabelo, L.A.; Lima, E.S.; Boleti, A.P. de A.; Carollo, C.A.; Santos, E.L. dos; Souza, K. de P. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidiabetic activity of *Apis mellifera* bee tea. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0197071.
17. de Almeida, C.L.F.; Brito, S.A.; de Santana, T.I.; Costa, H.B.A.; de Carvalho Júnior, C.H.R.; da Silva, M.V.; de Almeida, L.L.; Rolim, L.A.; Dos Santos, V.L.; Wanderley, A.G.; et al. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 6593073.
18. Engels, C.; Gräter, D.; Esquivel, P.; Jiménez, V.M.; Gänzle, M.G.; Schieber, A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International* **2012**, *46*, 557–562.
19. Abdel-Salam, O.M.E.; Shaffie, N.M.; Omara, E.A.; Yassen, N.N. Chapter 16 - Citric Acid an Antioxidant in Liver. In *The Liver*, Patel, V.B., Rajendram, R., Preedy, V.R., Eds.; Academic Press: Boston, 2018; pp. 183–198 ISBN 978-0-12-803951-9.
20. Bernatoniene, J.; Kopustinskiene, D.M. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules* **2018**, *23*, 965.
21. Verotta, L.; Panzella, L.; Antenucci, S.; Calvenzani, V.; Tomay, F.; Petroni, K.; Caneva, E.; Napolitano, A. Fermented pomegranate wastes as sustainable source of ellagic acid: Antioxidant properties, anti-inflammatory action, and controlled release under simulated digestion conditions. *Food Chemistry* **2018**, *246*, 129–136.

22. Hazra, B.; Biswas, S.; Mandal, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern Med* **2008**, *8*, 63.
23. Islam, S.Md.A.; Ahmed, K.T.; Manik, M.K.; Wahid, Md.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 Pac J Trop Biomed* **2013**, *3*, 682–691.
24. Zeraik, M.L.; Queiroz, E.F.; Marcourt, L.; Ciclet, O.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D.H.S.; Cuendet, M.; da Silva Bolzani, V.; Wolfender, J.-L. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. *Journal of Functional Foods* **2016**, *21*, 396–405.
25. AbdulSalam, S.F.; Thowfeik, F.S.; Merino, E.J. Excessive Reactive Oxygen Species and Exotic DNA Lesions as an Exploitable Liability. *Biochemistry* **2016**, *55*, 5341–5352.
26. Reeg, S.; Grune, T. Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23*, 239–255.
27. Su, L.-J.; Zhang, J.-H.; Gomez, H.; Murugan, R.; Hong, X.; Xu, D.; Jiang, F.; Peng, Z.-Y. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 5080843.
28. Nobre, C.B.; Sousa, E.O.; Camilo, C.J.; Machado, J.F.; Silva, J.M.F.L.; Filho, J.R.; Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M. Antioxidative effect and phytochemical profile of natural products from the fruits of “babaçu” (*Orbignia speciosa*) and “buriti” (*Mauritia flexuosa*). *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *121*, 423–429.
29. Park, Y.-S.; Cvikrová, M.; Martincová, O.; Ham, K.-S.; Kang, S.-G.; Park, Y.-K.; Namiesnik, J.; Rombolà, A.D.; Jastrzebski, Z.; Gorinstein, S. In vitro antioxidative and binding properties of phenolics in traditional, citrus and exotic fruits. *Food Research International* **2015**, *74*, 37–47.
30. Haza, A.I.; Morales, P. Effects of (+)-catechin and (-)-epicatechin on heterocyclic amines-induced oxidative DNA damage. *J Appl Toxicol* **2011**, *31*, 53–62.
31. Gong, X.; Rubin, L.P. Role of macular xanthophylls in prevention of common neovascular retinopathies: retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *572*, 40–48.
32. Rodrigues Sá, R.; da Cruz Caldas, J.; de Andrade Santana, D.; Vieira Lopes, M.; dos Santos, W.N.L.; Graças Andrade Korn, M.; de Freitas Santos Júnior, A. Multielementar/centesimal composition and determination of bioactive phenolics in dried fruits and capsules containing Goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chemistry* **2018**.
33. Gaeta, L.M.; Tozzi, G.; Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clinica Chimica Acta* **2002**, *322*, 117–120.
34. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* **2018**, *54*, 287–293.
35. Chung, A.P.Y.S.; Gurtu, S.; Chakravarthi, S.; Moorthy, M.; Palanisamy, U.D. Geraniin Protects High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress in Sprague Dawley Rats. *Front Nutr* **2018**, *5*.
36. Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* **2017**, *114*, 1752–1761.
37. Amirkhizi, F.; Siassi, F.; Minaie, S.; Djalali, M.; Rahimi, A.; Chamari, M. IS OBESITY ASSOCIATED WITH INCREASED PLASMA LIPID PEROXIDATION AND OXIDATIVE STRESS IN WOMEN? *ARYA Atherosclerosis* **2010**, *2*.
38. Vincent, H.K.; Powers, S.K.; Dirks, A.J.; Scarpace, P.J. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *International Journal of Obesity* **2001**, *25*, 378.
39. Cuccioloni, M.; Mozzicafreddo, M.; Spina, M.; Tran, C.N.; Falconi, M.; Eleuteri, A.M.; Angeletti, M. Epigallocatechin-3-gallate potently inhibits the in vitro activity of hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase. *J Lipid Res* **2011**, *52*, 897–907.

40. Zhou, J.; Mao, L.; Xu, P.; Wang, Y. Effects of (–)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Energy Expenditure and Microglia-Mediated Hypothalamic Inflammation in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2018**, *10*.
41. Barbosa, H.M.; Nascimento, J.N.D.; Araújo, T. a. S.; Duarte, F.S.; Albuquerque, U.P.; Vieira, J.R.C.; Santana, E.R.B.D.; Yara, R.; Lima, C.S.A.; Gomes, D.A.; et al. Acute Toxicity and Cytotoxicity Effect of Ethanolic Extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark: Hematological, Biochemical and Histopathological Evaluation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2016**, *88*, 1993–2004.
42. Manik, Mohammad K; Islam, Shawkat M.A; Wahid, Md. A; Morshed, Mohammed M; Kamal, Sonia; slam, Md. S; Ahmed, Kh. T. Investigation of in vitro antioxidant, antimicrobial and thrombolytic activity of the exocarp of *Spondias pinnata* (Anacardiaceae). *Canadian Chemical Transactions* **2013**, *1*, 191–201.
43. Nwidu, L.L.; Elmorsy, E.; Oboma, Y.I.; Carter, W.G. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Spondias mombin* leaf and stem extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Taibah University Medical Sciences* **2018**, *13*, 262–271.

6. Anexos



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 20 de janeiro de 2019.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Potencial biológico de *Spondias purpurea L.***", registrada sob o protocolo de nº 37/2018, sob a responsabilidade de Kely de Picoli Souza e Kátia Avila Antunes – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 09/11/2018.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	21/01/2019 a 19/03/2019
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>Nº de animais</i>	170 C57Bl/6
<i>Peso/idade</i>	30 dias
<i>Sexo</i>	140 machos e 30 fêmeas
<i>Origem</i>	Biotério Central UFGD

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do potencial biológico de *Spondias purpurea*

Pesquisador: KATIA AVILA ANTUNES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13444918.7.0000.5160

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.479.938

Apresentação do Projeto:

Introdução

As plantas têm sido usadas como fonte medicinal para prevenir e tratar diversos tipos de doenças, e isso acontece devido as plantas produzirem vários metabolitos e, os metabolitos secundários, tem se destacado devido apresentarem muitas atividades biológicas, dentre as quais encontram as atividades antioxidantes e as anticoagulantes (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Os antioxidantes atuam no equilíbrio entre a formação dos compostos oxidantes e a atuação do sistema de defesa antioxidante do organismo.

Quando em excesso, as espécies reativas, cuja produção acontece naturalmente durante o metabolismo celular, produção de energia ou quando

ocorre alguma disfunção biológica (BARREIROS et al., 2006), causam efeitos prejudiciais ao organismo, como peroxidação dos lipídeos de

membrana, danos às proteínas, enzimas e DNA, desencadeando o surgimento de diversas

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

CEP: 79.803-010

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

doenças, como
câncer, envelhecimento precoce,
disfunções cognitivas, neurodegenerativas, quadro de síndrome metabólica, doenças cardiovasculares,
além disso, pode também, causar
alterações hemostática (HALLIWELL et al., 1992; SILVA et al., 2011, Cedrim et al., 2018).
Estudos têm demonstrado que extratos de planta apresentam potencial antioxidante, além de melhorar o
quadro de síndrome metabólica,
adicionalmente, os metabolitos secundários, como as saponinas e os compostos fenólicos, podem inibir a
adesão, agregação e secreção plaquetária
atuando como antitrombóticos além de apresentarem potencial antioxidante (GUGLIELMONE et al., 2005;
SHI et al., 2012, Casagrande et al.,
2014, Antunes et al 2017). Outro constituinte descrito com potencial antioxidante e capaz de inibir a ativação
de plaquetas é o kampferol (CHOI et
al., 2015). Além disso, estudos apontam que antioxidantes como flavonóis, flavonas e lignanas tem sido
capaz de melhorar o quadro de doenças
cardiovasculares, além de algumas flavonas estarem sendo descritas com potencial antiagregante, inibindo
a atividade da enzima COX1,
responsável pela homeostasia (SILVA et al., 2002; ARTS e HOLLMAN., 2005).
São considerados doenças cardiovasculares as doenças que afetam a função do coração e dos vasos
sanguíneos. Adicionalmente, as doenças que
acometem o sistema circulatório são as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo e geram
grandes despesas aos países, principalmente pela grande quantidade de medicamentos para o tratamento
das mesmas (WHO, 2004).
com atividades antitrombótica, anticoagulante e antiplaquetária que são necessários para o

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

tratamento

dessas doenças (PAWLACZYK et al., 2011; SHI et al., 2012; SALU et al., 2014). Dentre os eventos tromboticos mais importantes estão o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral, a isquemia transitória e a doença arterial obstrutiva periférica (LIMA et al., 2006). Porém, os tratamentos com drogas antitromboticas podem trazer efeitos adversos aos pacientes, como hemorragias e imunossupressão. Esta e outras desvantagens nos tratamentos com drogas anticoagulantes acabam incentivando a busca por novas opções terapêuticas (ALVARENGA et al., 2011; OSTROWSKI et al., 2014) e plantas medicinais têm sido, a primeira fonte de moléculas anticoagulantes e antitrombóticas (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Uma planta promissora é a *Spondias purpurea*, a qual pertence à família Anacardiaceae e ao gênero *Spondias*. Espécies deste gênero são utilizadas popularmente para diversos fins e algumas apresentam diversos potenciais biológicos comprovados, um exemplo é a *Spondias mangifera* utilizadas como antibacteriana, antidiarreica (ARIF et al., 2008). A espécie *Spondia dulcis* é utilizada para diversos fins, onde as cascas dos frutos são utilizadas como adstringente, antidiarreica e no tratamento de infecções oculares (RAHMATULLAH et al., 2009), a fruta é utilizada para o tratamento de úlceras, dores de garganta e inflamações além de apresentar potencial antioxidante, antitrombótico e antimicrobiano sem efeitos tóxicos (ISLAM et al., 2013).

Dentre as espécies do gênero *Spondias* encontra-se a *Spondias purpurea* L. e estudos demonstraram que nas cascas da fruta desta espécie já foram identificados ácidos fenólicos e flavonol-o-glicosilados, totalizando 21 compostos, dentre

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

CEP: 79.803-010

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

esses, Oligossídeos de quercetina, canferol, canferídeo e raminetina (ENGELS et al., 2012). Sendo que esses compostos estão relacionados a um possível potencial antioxidante. No entanto ainda não foram avaliadas as atividades antioxidantes, tampouco atividade trombolítica, sendo que esses quadros são responsáveis por diversos óbitos no mundo e atualmente, os medicamentos utilizados nos tratamentos destas doenças apresentam efeitos colaterais como hemorragias, no caso dos medicamentos antitrombolíticos (ISLAM et al., 2013). Spondias purpurea pertence à família Anacardiaceae e é conhecida pela importância econômica, sendo utilizado para produção de geleias, sorvetes, entre outros. Considerando que as plantas apresentam uma importante fonte terapêutica, usados para diferentes fins biológicos, a avaliação do potencial de Spondias purpurea torna-se extremamente relevante

2. Hipótese

Doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte no mundo e incluem acidentes vasculares por obstrução de vasos. A obstrução pode ser ocasionada por trombos, os quais em alguns casos podem ser dissolvidos por medicamentos e assim, reduzindo as consequências do acidente vascular bem como o risco de ocorrência de um novo acidente vascular. Atividade antifibrinolítica tem sido relatada para algumas espécies do gênero Spondias. Portanto, buscamos avaliar o potencial antitrombótico de Spondias purpurea.

3. Metodologia do Projeto

Ensaio de proteção contra hemólise oxidativa induzida por 2,2'- azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

CEP: 79.803-010

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

Preparação de suspensões de eritrócitos: Serão coletados 15 mL de sangue periférico de doadores saudáveis. O sangue será centrifugado a 2000 g, o plasma e a camada leucocitária serão descartados. Os eritrócitos serão lavados três vezes em NaCl 0,9 % e, após as lavagens, será preparada suspensão de eritrócitos a 10 % em NaCl 0,9 %.

- Ensaio de hemólise e inibição da hemólise oxidativa: A capacidade hemolítica e inibição da hemólise oxidativa do extrato será determinada seguindo método descrito por Campos et al. (2014), com modificações. Os ensaios serão realizados com suspensões de eritrócitos 10 %. Os eritrócitos serão pré-incubados a 37 °C, durante 30 min em tubos de ensaio na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico ou extrato (50-500 g.mL⁻¹). Posteriormente será adicionado NaCl 0,9 % ou 2,2'- azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 50 mM, para avaliar a capacidade hemolítica e inibição da hemólise oxidativa, respectivamente. As amostras permanecerão a 37 °C durante 240 min, com agitação periódica. O etanol será utilizado como controle do solvente na concentração final de 0,8 %. A porcentagem de hemólise será determinada através da mensuração da absorbância a 540 nm, pela equação descrita a seguir. Serão realizados três experimentos independentes em duplicata

Atividade antitrombotilica in vitro

Será avaliada através da lise de coágulos pré formados apartir de sangue humano. Para este ensaio, sangue venoso de voluntários saudáveis (n = 10), serão transferidos para microtubos esteril préviamente pesados (500 µl/microtubo), estes serão incubados a 37 °C durante 45 minutos. Após a

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

CEP: 79.803-010

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

formação do coágulo, o soro será removido completamente (sem perturbar o coágulo formado) e cada microtubo será novamente pesado para determinar o peso do coágulo. Em cada microtubo será adicionado 100 µl da amostra avaliada (estreptoquinase ou água serão utilizadas como controle positivo ou negativo, respectivamente). Todos os tubos serão novamente incubados a 37 °C durante 90 minutos e observado a lise do coágulo. Após a incubação, o fluido liberado será removido e os tubos pesados novamente para observar a diferença de peso após a interrupção do coágulo. A diferença obtida no peso antes e após a lise do coágulo será expresso como porcentagem de lise de coágulos

4. Metodologia de Análise de Dados

Todos os resultados obtidos serão expressos como média \pm erro padrão da média, com auxílio do programa GraphPad Prism 7.0

5. Critério de Inclusão e Exclusão

Critério de Inclusão:

Serão incluídos adultos saudáveis, com faixa etária entre 18 e 40 anos, alimentados, não fumantes e que não fazem uso de medicamentos de uso contínuo

Critério de Exclusão:

Serão excluídos pessoas não saudáveis, menores de 18 anos, pessoas que fizeram uso de bebida alcoólica e aqueles que fazem uso de medicamentos de uso contínuo, tais como anticoncepcional e anticoagulante

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial biológico de *Spondias purpurea* L.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a composição centesimal e o teor de ácido ascórbico

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

- Avaliar a capacidade antioxidante: Teor de compostos antioxidantes e a atividade antioxidante
- Avaliar o potencial antitrombofílico: Antiagregante plaquetário, Antifibrinolítico e antitrombótico

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta das amostras de sangue será realizada por profissional qualificado, farmacêutico com especialização em análises clínicas, no entanto, durante o processo de coleta o doador voluntário poderá apresentar dor, hipotensão, náuseas e injúria vascular, caso isso ocorra o procedimento será interrompido

Benefícios:

Os resultados deverão originar trabalhos de doutorado e iniciação científica que serão publicados como artigos científicos em revistas internacionais e os resultados parciais serão apresentados em eventos científicos e tecnológicos. Com a execução da proposta espera-se:

- Cientificamente:

Espera-se que a administração dos extratos nos animais, promova à redução da agregação plaquetária. Espera-se que a administração dos extratos nos animais, promova à redução da atividade fibrinolítica. Espera-se que a administração dos extratos promova à melhora nos parâmetros avaliados no quadro de síndrome metabólica. Intelectualmente:

Ampliar e aprimorar a produção científica do grupo de pesquisa envolvido através do desenvolvimento de pesquisas especializadas com previsão de, no mínimo, 2 artigos científicos de nível internacional até o final do projeto.

Divulgar os resultados em eventos científicos.

Formação de recursos humanos: Formação de 01 doutor em Ciências da Saúde.

- Benefícios à sociedade

Obter produtos que contribuam com o a saúde e o bem-estar das pessoas.

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

Estabelecer bases técnico-científicas para conhecer novos compostos de atividades terapêuticas relevantes. Aumentar opções de tecnológicas para a otimização de produtos elaborados na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia.

- Ambientais

Favorecer o incentivo da preservação da espécie em estudo e incentivar seu uso sustentável.

Bioprospectar novas alternativas e melhores técnicas de uso e manejo da *Spondias purpurea*

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão coletados casca do caule, folhas e frutos de *Spondias purpurea*, a casca do caule e as folhas serão submetidas a

secagem em estufa, moídas, preparado os extratos, liofilizados e armazenados em freezer. Os frutos serão submetidos a sanitização, despulpados

congelados, liofilizados, preparado extrato, liofilizado e mantido em freezer. Estão previstas as seguintes avaliações: Antioxidante, antitrombofílico,

síndrome metabólica e toxicidade. A avaliação antioxidante será realizada através da quantificação dos compostos fenólicos, captura dos radicais livres ABTS e DPPH, proteção contra hemólise oxidativa induzida por AAPH e inibição da peroxidação lipídica.

A Atividade antitrombofílica será realizada através dos ensaios de in vitro e in vivo. In vitro através dos ensaios de lise de coagulo, atividade

fibrinolítica e antiplaquetária. No ensaio in vivo, serão utilizados 50 animais machos os quais serão divididos e tratados por gavagem durante 14 dias

com: a) 400 mg/kg de extrato aquoso da polpa de *S. purpurea* (n=10); b) 400 mg/kg de extrato aquoso da casca do caule de *S. purpurea* (n=10); c)

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

UF: MS

Município: DOURADOS

CEP: 79.803-010

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

400 mg/kg de extrato aquoso de folhas de *S. purpurea* (n=10); d) 100 mg/kg de ácido acetil salicílico (AAS) (n=10); e) Água (n=10). No primeiro dia de tratamento será realizado o tempo de sangramento e após os 14 dias de tratamento os animais serão eutanasiados e realizado o teste de tempo de protrombina e o teste de tempo de tromboplastina parcial ativada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide "Conclusões ou Pendências ou Lista de Inadequações"

Recomendações:

Vide "Conclusões ou Pendências ou Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP/UFGD, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 510 de 2016, na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação deste protocolo de Pesquisa em virtude do(a) pesquisador(a) ter atendido as recomendações do parecer n. 3.375.505.

Conforme orientações das resoluções vigentes que regem a ética em pesquisa com seres humanos:

- * o pesquisador deve comunicar qualquer evento adverso imediatamente ao Sistema CEP/CONEP;
- * o pesquisador deve apresentar relatório parcial e final ao Sistema CEP/CONEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1252150.pdf	11/06/2019 09:57:53		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	11/06/2019 09:56:06	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE.pdf	11/06/2019	KATIA AVILA	Aceito

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br



Continuação do Parecer: 3.479.938

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09:54:58	ANTUNES	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso.pdf	07/05/2019 15:16:37	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	07/05/2019 15:15:58	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Compromisso.pdf	07/05/2019 15:15:36	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	07/05/2019 15:14:56	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	06/11/2018 11:17:37	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito
Outros	resol_aprov.pdf	06/11/2018 11:16:54	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito
Folha de Rosto	FDR.pdf	06/11/2018 11:15:55	KATIA AVILA ANTUNES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DOURADOS, 01 de Agosto de 2019

**Assinado por:
Leonardo Ribeiro Martins
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Melvin Jones, 940

Bairro: Jardim América

CEP: 79.803-010

UF: MS

Município: DOURADOS

Telefone: (67)3410-2853

E-mail: cep@ufgd.edu.br