



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FERNANDO CÉSAR ARAÚJO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* e *in vivo* DE EXTRATO DE
SEMENTES DE *Licania tomentosa*.**

FORTALEZA

2018

FERNANDO CÉSAR ARAÚJO MOREIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE EXTRATO DE
SEMENTES DE *Licania tomentosa*.

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Erika Freitas Mota.

Co-orientador: Ms. José Joaquim Lopes Neto.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M837a Moreira, Fernando César Araújo.
Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extrato de sementes de *Licania tomentosa*. /
Fernando César Araújo Moreira. – 2018.
57 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Erika Freitas Mota.

Coorientação: Prof. Me. José Joaquim Lopes Neto.

1. *Licania tomentosa*. 2. Bioacessibilidade. 3. Hepatoproteção. I. Título.

CDD 570

FERNANDO CÉSAR ARAÚJO MOREIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE EXTRATO DE
SEMENTES DE *Licania tomentosa*.

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Erika Freitas Mota.

Co-orientador: Ms. José Joaquim Lopes Neto.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Erika Freitas Mota (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ms. José Joaquim Lopes Neto (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Silvia Helena e Francisco
Humberto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas, por nunca permitir me faltar nada.

Aos meus pais **Silvia Helena Medeiros** e **Francisco Humberto Moreira**, por serem meus pilares e minha força, por estarem sempre ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis e não me permitirem desistir em nenhuma das adversidades. Ao meu irmão **Guilherme Moreira** por estar junto de mim em diversos momentos da minha vida e sempre manter a chama de minha curiosidade acesa, com as mais diversas perguntas.

À professora **Erika Freitas Mota**, por ter me orientado, ajudado e compreendido em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis, com toda a sua calma, paciência e carinho.

Ao meu co-orientador **Joaquim Lopes**, por ter me transmitido tanto conhecimentos científicos, como acerca dos mais variados assuntos, além da paciência por me acompanhar em cada passo e cada revisão, sempre atencioso e amável.

À professora **Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho** por ter me aceitado e acolhido tão bem em seu laboratório, ter confiado a mim a bolsa PIBIC e me orientado também durante o meu estágio.

Ao **Luiz Carlos Filho** e o **Pedro Matheus Tabosa** por sua ajuda fundamental nesse projeto, principalmente nos momentos de manipulação dos animais, chegando cedo e ficando até tarde no laboratório, acompanhando inclusive nos finais de semana, não sei o que teria sido desse projeto sem a ajuda de vocês. Além dos vários momentos de brincadeira e alegria que tornaram essa caminhada mais leve e prazerosa.

A todas as outras amigas que fiz no Biopropec em especial, **Rute Xavier**, **Thiago Almeida**, **Leonardo Vieira**, **Thaís Borges**, **Felipe de Castro**, **Chayenne de Sá**, **Emanuel Francelino** e **Bosco Carvalho** por todas as risadas e bons momentos proporcionados. Ao “seu” **Valdenor** por sempre manter o local de trabalho limpo e alegre com seu alto astral.

Ao **Paulo Ricardo** por ter sido um grande companheiro nessa jornada e pelos inúmeros momentos de apoio e motivação, me incentivando a sempre buscar mais e ser cada vez melhor.

À minha psicóloga **Selma Araújo** por me ajudar com minha resiliência, a lidar com as frustrações da vida e vencer meus traumas, sendo fundamental para a minha saúde mental perante tantas dificuldades.

Ao **Bruno Guilhon** por sua amizade forte e sincera, desde o primeiro dia de curso, com todas as suas loucuras que lhe são características. Junto ao **Valber Silva** e a **Thaís Abreu**, formando uma equipe maravilhosa e com ideias criativas para todos os trabalhos, dando origem ao tão conhecido “Lipinho”. Ao **Lucas Nunes** por ter nos acompanhado durante alguns semestres, mesmo nos trocando depois.

As minhas amigas, **Kamila Medeiros**, **Karol Rodrigues**, **Brenda Sombra**, em especial por terem estrelado em um episódio único de Dr. House. E tornarem certas disciplinas mais tranquilas.

A todos os outros amigos de turma, **Eudson Marques**, **Scarlat Paiva**, **Edilane Fernandes**, **Karine Lopes**, **Carol Sena**, **Átila Monteiro**, **Mércia Kesley**, **Jenny Colares**, **Marinetty Sousa**, **Thaís Souza**, **Naele Coelho**, **Luana Nobre**, **Quintino**, **Biatriz Alcântara**, **Mirele Rodrigues**, **André Luis**, **Caroll Gurgel**, **Saulo Gonçalves**, **Santiago Bezerra**, **Renata São Paio**, **Ianna Queiroz**, **Ítalo Lourenço**, que me marcaram de alguma forma e vivenciaram boa parte desses momentos comigo.

Ao **Thalis Carvalho** que por infortúnios da vida não tive a felicidade de conhecer, mas sempre demonstrou ser uma pessoa simpática e amável.

À **Niédila Alves** por ter me suportado e aconselhado durante vários momentos em minha época de monitoria, não só acerca da faculdade em si, mas sobre a vida.

Aos meus amigos do LADMI **Irlânia Coelho**, **Andreza Freitas**, **Mateus Leal**, **Ruthyelle Oliveira** e **Érica** pelas várias brincadeiras durante a época de monitoria.

A todos os meus amigos de outros semestres em especial a **Jennifer Bruna**, **Renata Carvalho**, **Gabriela Valentim**, **Caroliny Soares**, **Bianca Vasconcelos**, **Thiago Guerra**, **Thiago Loreto**, **Lucas Araújo**, **Filipe de Abreu**, **Hipólito Denizard**, **Elivânia Gomes**, **Raquel Costa**, **Laís Belmino** e **João Ravelly Queirós**.

“Biologia é o estudo de coisas complicadas,
que têm a aparência de terem sido projetadas
com um propósito.”

Richard Dawkins

RESUMO

A espécie vegetal *Licania tomentosa* Benth, encontrada no semiárido brasileiro é conhecida por suas propriedades medicinais, atribuídas à presença de fitoquímicos como flavonoides e taninos, amplamente conhecidos por sua capacidade antioxidante tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*. O presente estudo objetivou analisar a capacidade do extrato etanólico seco proveniente das sementes de *Licania tomentosa* (EELt), quanto à atividade antioxidante *in vitro* e o efeito hepatoprotetor *in vivo*. O rendimento de EELt após processo extrativo foi de 20,76%. Através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, ácidos orgânicos e galocatequina foram identificados como constituintes da preparação. A concentração de fenóis totais foi de $359,18 \pm 7,04$ µg equivalentes de ácido gálico por mg de extrato, enquanto que os testes de neutralização dos radicais ABTS e DPPH exibiram, respectivamente, uma capacidade de neutralização média (CN₅₀) de $102,33 \pm 12,21$ µg/mL e $74,31 \pm 7,25$ µg/mL. O teste de digestão gastrointestinal *in vitro* apresentou uma bioacessibilidade de compostos fenólicos no valor de 33,28%, enquanto que o índice de atividade antioxidante bioacessível é de 11,35%. O teste de hepatoproteção *in vivo* mostrou-se inconclusivo, por não estabelecer um estresse oxidativo hepático, nesse contexto, sugere-se mais ensaios para esclarecer se o extrato tem capacidade hepatoprotetora *in vivo*.

Palavras-chave: *Licania tomentosa*. Bioacessibilidade. Hepatoproteção.

ABSTRACT

The plant species *Licania tomentosa* Benth, found in the Brazilian semiarid region, is known for its medicinal properties, attributed to the presence of phytochemicals such as flavonoids and tannins, widely known for their antioxidant capacity in both *in vitro* and *in vivo* models. The objective of the present study was to analyze the capacity of the dry ethanolic extract from the seeds of *L. tomentosa* (EELt), in antioxidant activity *in vitro* and the *in vivo* hepatoprotective effect. The EELt yield after extractive process was 20.76%. Through liquid chromatography coupled to mass spectrometry, organic acids and gallic acid were identified as constituents of the preparation. The total phenol concentration was 359.18 ± 7.04 μg gallic acid equivalent per mg of extract, whereas the ABTS and DPPH radical inhibition test exhibited, respectively, an average scavenger concentration (SC_{50}) of 102.33 ± 12.21 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 74.31 ± 7.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The *in vitro* gastrointestinal digestion test presented 33,28% of bioaccessible phenolic compounds, while the index of bioaccessible antioxidant activity was 11,35%. The *in vivo* hepatoprotection test was shown to be inconclusive because it did not establish hepatic oxidative stress. In this context, further assays are suggested to clarify whether the extract has hepatoprotective capacity *in vivo*.

Keywords: *Licania tomentosa*. Bioaccessibility. Hepatoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Bioma Caatinga, abrangendo a maioria dos estados da região Nordeste	17
Figura 2 - Mecanismo de ressonância responsável pela estabilidade do fenol	20
Figura 3 – Estrutura do ácido ascórbico (Vitamina C) e do tocoferol (Vitamina E)	21
Figura 4 – Esquema mostrando a organização das classes de compostos fenólicos	23
Figura 5 – Estrutura química dos dois principais precursores dos ácidos fenólicos e um exemplo de cada produto	23
Figura 6 – Estrutura química de dois flavonoides amplamente citados na literatura, a catequina e a quercetina	24
Figura 7 – Fotos da árvore de <i>Licania tomentosa</i> , junto com suas folhas, fruto e semente ...	28
Figura 8 – Cromatograma da UPLC-QTOF realizado com o extrato etanólico da semente de <i>Licania tomentosa</i>	41
Figura 9 – Dosagem das enzimas hepáticas utilizadas como biomarcadores para estresse oxidativo	47
Figura 10 – Níveis de malondialdeído determinados em macerados de fígado	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens envolvendo os modelos de bioacessibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	26
Tabela 2 – Resultado dos ensaios realizados para a quantificação de fenóis totais, junto com a determinação da atividade antioxidante pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP	40
Tabela 3 – Compostos fitoquímicos detectados no extrato da semente de <i>Licania tomentosa</i> (EELt) via UPLC-QTOF em modo de ionização negativo e positivo	42
Tabela 4 – Polifenóis totais, atividade antioxidante e índices de bioacessibilidade nos sobrenadantes antes e após a digestão gastrointestinal simulada	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EELt	Extrato etanólico de sementes de <i>Licania tomentosa</i>
UPLC-QTof	Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a sistema de quadrupolo/tempo de voo
BEH	Etileno com pontes hibridizadas
Caco-2	Cultura heterogênea de células do tecido epitelial de adenocarcinoma colorretal humano
DPPH	2,2-diphenil-1-picrilhidrazila
ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina
FRAP	Poder de redução do íon ferro
LDH	Lactato desidrogenase
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
MDA	Malondialdeído
HNE	4-Hidroxinonenal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Caatinga	16
1.2	Plantas nutricionais e terapêuticas	17
1.3	Radicais livres	18
1.4	Estresse oxidativo	19
1.5	Antioxidantes	20
1.6	Compostos fenólicos	22
1.7	Bioacessibilidade dos compostos fenólicos	25
1.8	<i>Licania tomentosa</i> Benth.	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Obtenção do extrato etanólico da semente de <i>L. tomentosa</i>	30
3.2	Caracterização química e atividade antioxidante <i>in vitro</i>	31
3.2.1	Determinação de fenóis totais	31
3.2.2	Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH ...	31
3.2.3	Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS ^{•+} ..	32
3.2.4	Determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) ..	32
3.2.5	Identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF)	33
3.3	Bioacessibilidade de compostos fenólicos <i>in vitro</i>	33
3.3.1	Digestão gastrointestinal simulada	33
3.3.2	Quantificação e avaliação da capacidade antioxidante de compostos fenólicos totais após a digestão	34
3.3.3	Índices de bioacessibilidade	34
3.4	Avaliação da capacidade hepatoprotetora <i>in vivo</i>	34
3.4.1	Animais	34
3.4.2	Desenho experimental e coleta de material biológico	35
3.4.3	Análise hematológica	36
3.4.4	Análise dos biomarcadores hepáticos	36
3.4.5	Ensaio de peroxidação lipídica através das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	36
3.4.6	Histopatologia	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1	Rendimento do extrato	38
4.2	Caracterização química	38
4.2.1	Concentração de compostos fenólicos	38
4.2.2	Capacidade antioxidante	39
4.2.3	Identificação dos compostos fenólicos	40
4.3	Bioacessibilidade <i>in vitro</i> dos compostos fenólicos após processo de digestão simulada ..	43
4.4	Avaliação da hepatoproteção <i>in vivo</i>	46
4.4.1	Análise hematológica	46
4.4.2	Análise dos biomarcadores hepáticos	46
4.4.3	Histopatologia	48
5	CONCLUSÃO	50

REFERÊNCIAS	51
-------------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caatinga

A Caatinga, na linguagem Tupi-Guarani “mata branca”, é um bioma brasileiro caracterizado por suas altas temperaturas e escassez hídrica durante longos períodos, apresentando vegetação de aspecto seco em que, na maior parte do tempo, apenas os troncos brancos permanecem na paisagem (HAUF et al., 2010). De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Maury (2002), a Caatinga possui uma distribuição territorial com cerca de 844.453 Km², o que corresponde a 11% da área do Brasil. Mesmo com esse ambiente adverso, aproximadamente 439.196 Km² de sua área possui cobertura vegetal, apresentando um total de 932 espécies vegetais listadas, das quais 380 são endêmicas da região. Destaca-se, pelo fato de ser um bioma exclusivamente brasileiro, por abranger os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e Minas Gerais (Figura 1).

Mesmo com todas essas particularidades, a Caatinga ainda não recebe a devida atenção, tendo sua diversidade biológica subexplorada (DA SILVA, DINNOUTI, 1999). Nesse contexto, mostra-se necessário um maior investimento e valorização dessa área, já que determinadas espécies tiveram seus potenciais nutricionais e terapêuticos comprovados por diversos estudos (JUNIOR et al., 2014).

Figura 1 – Mapa do Bioma Caatinga, abrangendo a maioria dos estados da região Nordeste.



Fonte: IBGE, 2004.

1.2 Plantas nutricionais e terapêuticas

O uso de plantas medicinais não é algo recente em nossa cultura. Desde os primórdios das civilizações, em que povos antigos já faziam uso de plantas, com o intuito de aliviar sintomas causados por doenças (KHARCHOUFA et al., 2018). Costume esse que persiste até os dias atuais, com efeitos comprovados e largamente relatados na literatura, como é o caso da atividade antimicrobiana exercida por *Myracrodruon urundeuva*, *Schinopsis*

brasiliensis, *Licania tomentosa* e *L. rigida* (FARIAS et al., 2013). Além também de plantas com atividades anti-inflamatórias, anticancerígenas, cardioprotetora e antioxidante; além de várias outras (KALANTARI, DAS, 2010; KOVACIC, SOMANATHAN, 2010).

Dentre as espécies presentes na Caatinga, destacam-se *Jatropha mollissima*, *Myracrodruon urundeuva* e *Amburana cearensis* (ROQUE, ROCHA, LOIOLA, 2010) além de recentemente terem sido publicados estudos sobre a *Triplaris gardneriana* (NETO et al., 2017) e *L. tomentosa* (PESSOA et al., 2016). De acordo com Félix-Silva et al. (2018), as folhas de *Jatropha gossypifolia*, mesmo gênero que a *J. mollissima*, apresentam flavonoides como constituintes majoritários de sua composição química, que, de acordo com relatos na literatura, são os principais responsáveis pelas atividades relatadas para a espécie.

A semente de *Amburana cearensis* apresenta atividade anti-inflamatória e antitrombótica, possivelmente também por conta dos flavonoides presentes em sua constituição química (LEAL et al., 2003; LIMA et al., 2013). Já as sementes de *T. gardneriana* e a *L. tomentosa* apresentam várias classes de compostos fenólicos, como taninos, flavonoides, terpenos e saponinas, encarregados por prevenir o estresse oxidativo celular por conta de suas expressivas atividades antioxidantes. Estresse esse que pode se dar de dois modos, através da diminuição das substâncias antioxidantes ou através do aumento de radicais livres, acarretando em um desequilíbrio do balanço redox da célula (COMPORTI et al., 2010; SILVA et al., 2012; PESSOA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017).

Um estudo feito por Medeiros (2018) mostrou que tanto a semente quanto a polpa da *L. tomentosa* possuem potenciais nutricionais, pois ambos demonstraram possuir teor de fibras alimentares e minerais semelhantes ao de frutas popularmente já consumidas, além de não apresentarem lectinas e inibidores de proteases, proteínas consideradas como fatores antinutricionais.

1.3 Radicais livres

Radicaís livres são espécies reativas de determinadas substâncias que, ao serem oxidadas, assumem uma forma instável por conta do desemparelhamento de elétrons em sua camada de valência. Essa geração de radicais livres é um processo natural do metabolismo, sendo relevante para algumas funções, como é o caso da geração de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), em que são formadas espécies reativas de oxigênio (ERO's) (BARBOSA et al., 2010).

Ao final da cadeia transportadora de elétrons, a enzima citocromo oxidase doa quatro elétrons ao oxigênio, resultando na formação de água. Porém, parte do oxigênio não é devidamente reduzido, gerando assim espécies reativas de oxigênio (ERO's), sendo os radicais superóxido (O_2^{\cdot}) e hidroxila (OH^{\cdot}) alguns exemplos, além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser um radical livre, possui alta reatividade (BARBOSA et al., 2010).

Por serem instáveis, os radicais livres acabam por reagir com diferentes biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, gerando reações indesejadas e potencialmente prejudiciais ao organismo (BALOGUN et al., 2016).

1.4 Estresse oxidativo

Apesar de a geração de radicais livres ser algo comum ao próprio metabolismo, alguns fatores podem intensificar esse processo, sendo a inflamação um deles. Fatores exógenos também influenciam nessa geração de radicais livres como, raios ultravioleta, poluição atmosférica, radiação e até mesmo a ingestão de xenobióticos, como solventes orgânicos e bebidas alcoólicas. Como citado anteriormente, ao aumentar a geração de radicais livres, há um desequilíbrio do balanço redox, culminando em um estresse oxidativo celular (COMPORTI et al., 2010).

Em relação à participação do etanol como fator desencadeador na formação de radicais livres, sua metabolização se dá, principalmente, no tecido hepático e possui três vias de degradação. A principal delas é a via em que a enzima álcool desidrogenase (ADH) é intermediária, pois nesse processo o álcool é convertido em acetaldeído, aos custos da redução do NAD^+ a $NADH$, em que rapidamente esse acetaldeído, por ser tóxico à célula, é convertido em acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH2), ocasionando um desequilíbrio no balanço de $NAD^+/NADH$ da célula.

Esse excesso de $NADH$ acaba por interferir na cadeia transportadora de elétrons. As outras duas vias são a dos peroxissomos, que biotransformam o etanol por intermédio da catalase e a dos microsossomos que se utilizam da citocromo P450 2E1. De maneira que, quando ingerido em grandes quantidades, a metabolização do etanol pelas três vias gera mais ERO's, ocasionando assim um desequilíbrio na quantidade de radicais livres e antioxidantes na célula (BARBOSA et al., 2010; EZHILARASAN et al., 2018).

Esse desequilíbrio no balanço redox da célula culmina em várias injúrias aos

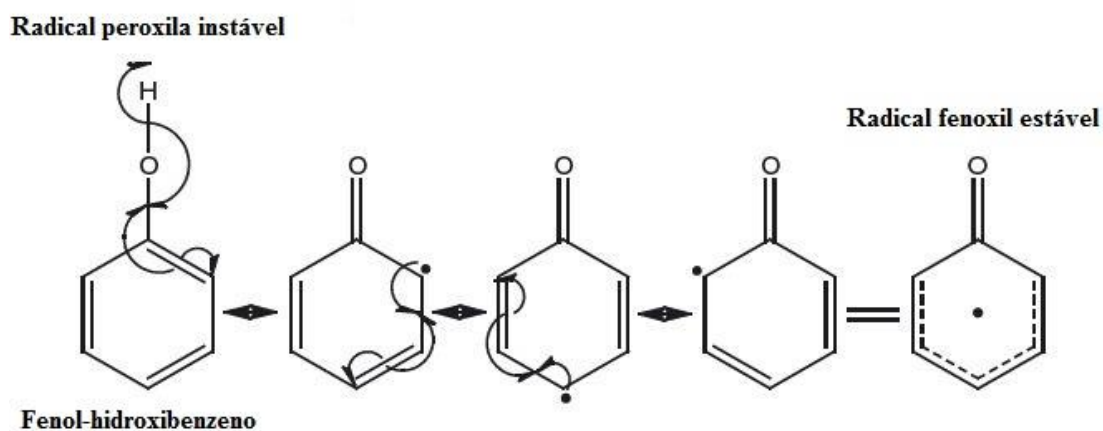
componentes celulares, já que as espécies reativas são altamente instáveis. Dentre as injúrias estão danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), em proteínas e na membrana celular, ocasionando a lise da mesma, eventos que podem ser associados ao desenvolvimento de patologias de ordem tanto metabólica (diabetes, obesidade etc) quanto degenerativas (câncer, Parkinson, Alzheimer etc) (EZHILARASAN et al., 2018).

1.5 Antioxidantes

Junto a essa problemática dos efeitos deletérios das espécies reativas, os organismos vivos desenvolveram formas de defesa contra esses radicais, o sistema de antioxidantes, que consiste em moléculas enzimáticas e não-enzimáticas, que em baixas concentrações diminuem a oxidação local, podendo ser classificados como primários ou secundários (CRAFT et al., 2012).

Os antioxidantes primários são aqueles que atuam diretamente no radical livre, seja através da doação de um elétron ou um próton, neutralizando e estabilizando-o (CRAFT et al., 2012; EZHILARASAN, 2018). Os antioxidantes primários costumam ser moléculas que possuem ligações duplas conjugadas, para que ao se oxidar, o elétron desemparelhado que restou na molécula entre em fenômeno de ressonância e a mesma não se torne instável. A presença de um grupamento fenol é algo bem comum nas substâncias antioxidantes (CRAFT et al., 2012) (Figura 2).

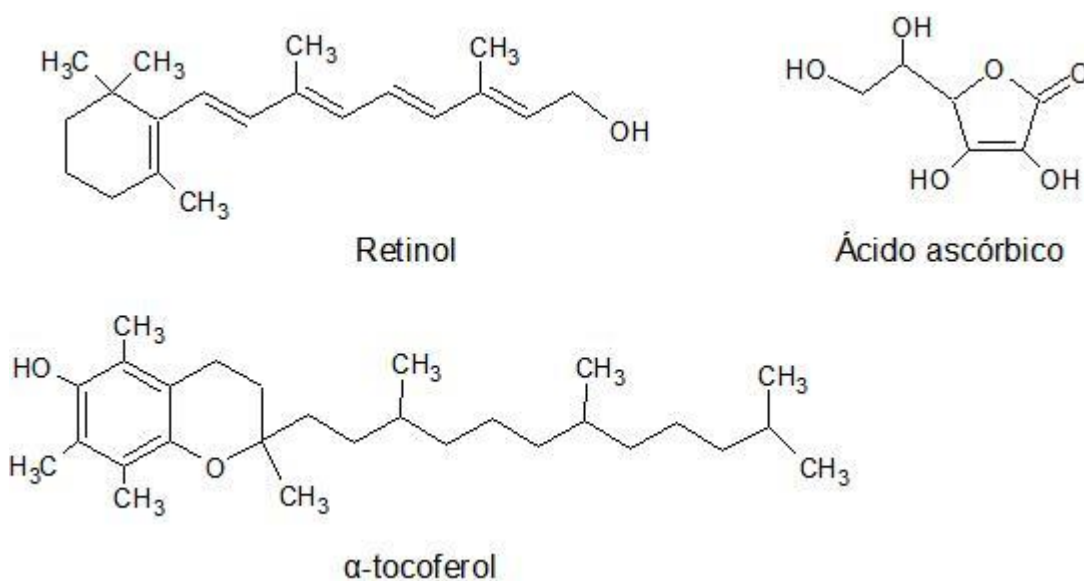
Figura 2 – Mecanismo de ressonância responsável pela estabilidade do fenol.



Fonte: Adaptado de Craft et al. (2012).

São alguns exemplos de antioxidantes primários o retinol, o ácido ascórbico e o tocoferol, conhecidos, respectivamente, por vitaminas A, C e E (Figura 3), além de uma classe de moléculas oriundas de vegetais denominada de compostos fenólicos (SARANGARAJAN et al., 2017).

Figura 3 - Estrutura do retinol (Vitamina A), ácido ascórbico (Vitamina C) e do tocoferol (Vitamina E).



Fonte: Adaptado de Zanotti e Berni (2004) e Craft et al. (2012).

Já no caso dos antioxidantes secundários, o mecanismo de ação é sobre os catalisadores das reações geradoras de radicais livres, como o $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, ou qualquer outro metal de transição, por exemplo, que ao reagir com o peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila (OH^\bullet) (BARBOSA et al., 2010; CRAFT et al., 2012; EZHILARASAN, 2018).

Grande parte dos antioxidantes enzimáticos são primários, sendo os mais citados a enzima superóxido dismutase (SOD), que age sobre o ânion radical superóxido (O_2^\bullet) transformando-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a catalase (CAT) que age sobre o peróxido de hidrogênio formando água (H_2O) e oxigênio (O_2), e a glutatona peroxidase (GPx) que age, em conjunto com a glutatona, sobre os peróxidos de modo geral (LI et al., 2015; BALOGUN et al., 2016; ROCHA-SANTOS et al., 2018).

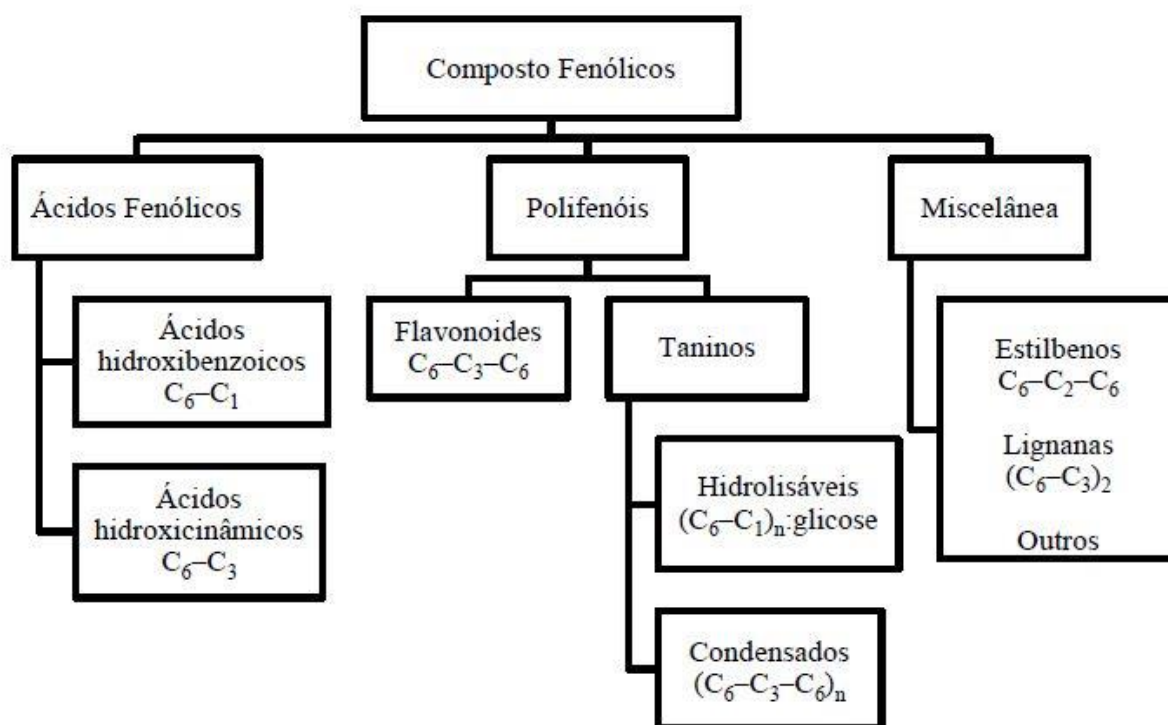
1.6 Compostos fenólicos

Outro grupo que vem sendo amplamente estudado dentro dos antioxidantes não enzimáticos, são os compostos fenólicos, moléculas que possuem um anel aromático com pelo menos uma hidroxila (OH) ligada a um de seus carbonos. Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário de plantas e adquiridos através da dieta, com atividade antioxidante amplamente relatada na literatura (CRAFT et al., 2012; MICHALAK, 2006; BIANCHI, ANTUNES, 1999).

Os compostos fenólicos são sintetizados como uma linha de defesa das plantas contra situações de estresse, tanto causados por fatores bióticos, como infecção e injúrias, como causados por fatores abióticos, luz, frio, entre outros. Sendo estas substâncias fitoquímicas as principais responsáveis por parte das características medicinais atribuídas a algumas plantas. Além disso, constituem um dos principais influenciadores nas propriedades organolépticas dos alimentos de origem vegetal, como os taninos, presente nos vinhos e que conferem adstringência, característica destes (HARBERTSON et al., 2012).

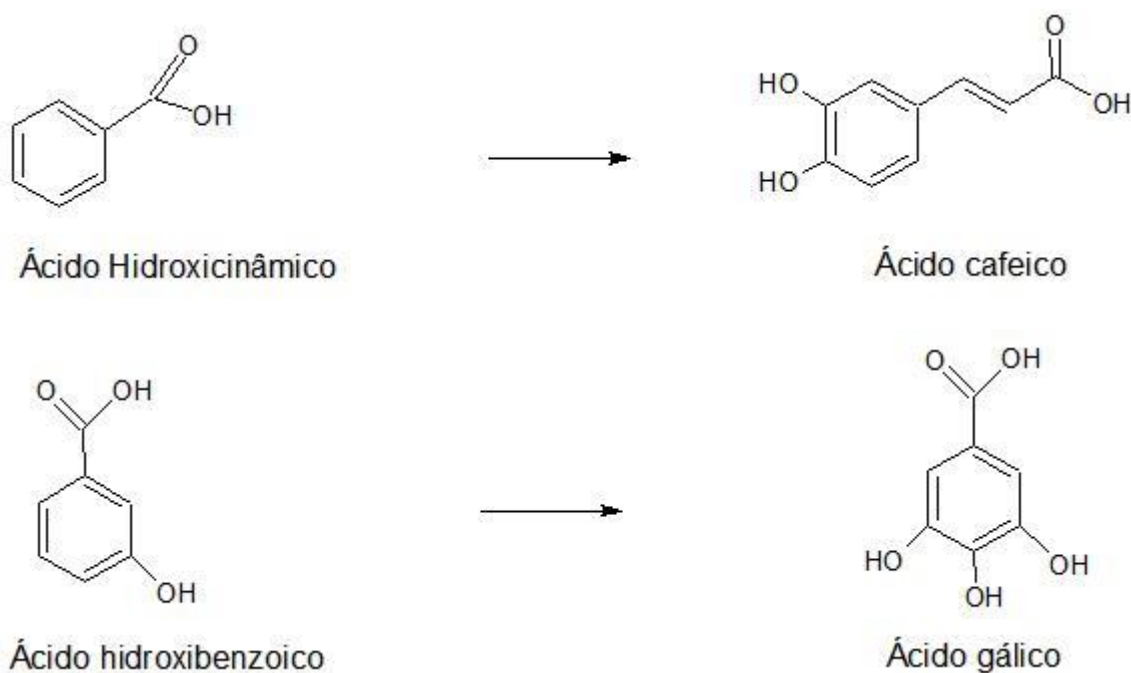
Os compostos fenólicos podem ser divididos em três grandes grupos, são estes os ácidos fenólicos, polifenóis e miscelâneas (Figura 4). Os ácidos fenólicos são caracterizados pela presença de um grupamento COOH ligado a um dos carbonos do composto fenólico, alguns exemplos bem relatados na literatura são o ácido gálico, ácido vanílico e ácido sirínico, provenientes do ácido hidroxibenzoico e o ácido cafeico, ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico, provenientes do ácido hidroxicinâmico, como evidenciado na Figura 5 (CHANDRASEKARA, 2018).

Figura 4 – Esquema mostrando a organização das classes de compostos fenólicos.



Fonte: Neto (2017).

Figura 5 – Estrutura química dos dois principais precursores dos ácidos fenólicos e um exemplo de cada produto.

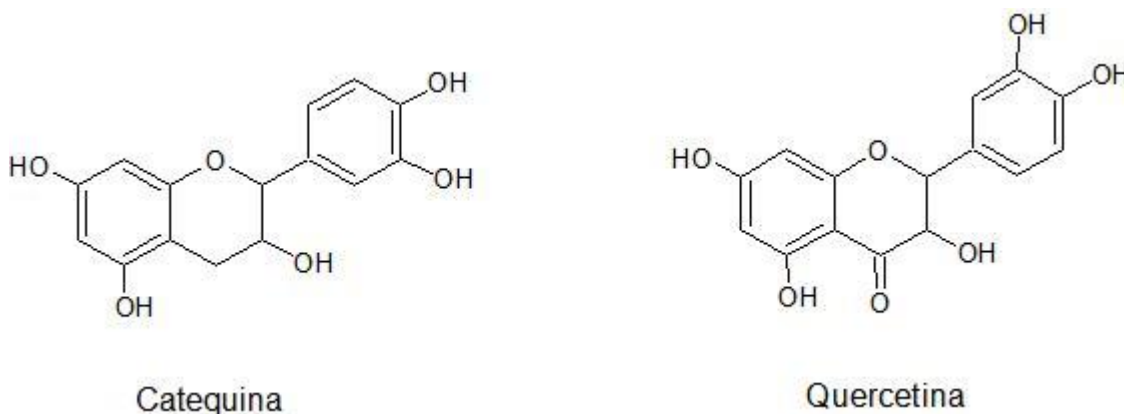


Fonte: Adaptado de Craft et al. (2012).

Os polifenóis são compostos fenólicos caracterizados pela presença de dois ou mais fenóis, sendo os polifenóis mais conhecidos os flavonoides, que se subdividem em diferentes famílias: flavanois (ex.: catequina), um flavonóis (e.x: quercetina), antocianinas (ex.: cianidina), entre outros (SOARES, MATEUS, FREITAS, 2018). De acordo com Scalbert e Williamsom (2000), mais da metade dos polifenóis ingeridos, através da dieta, são flavonoides (Figura 6).

Dentro da classe dos polifenóis, há também os taninos, que podem ser subclassificados em hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados pela ligação de várias moléculas de determinado ácido fenólico em uma molécula de açúcar central, normalmente a glicose, em que os mesmos ao entrar em contato com algum ácido diluído, possuem as ligações entre o açúcar e os ácidos hidrolisadas (LADDHA, KULKARNI, 2018). Já os taninos condensados consistem na ligação direta entra flavonoides, e o mesmo não é hidrolisado ao entrar em contato com ácido (LADDHA, KULKARNI, 2018).

Figura 6 – Estrutura química de dois flavonoides amplamente citados na literatura, a catequina e a quercetina.



Fonte: Adaptado de Rice-Evans, Miller e Paganga (1995).

O mecanismo para a ação antioxidante dos fenóis pode ser primário ou secundário, sendo que a primeira consiste na doação de elétrons ou prótons para o radical livre e, por conta da ressonância, uma característica intrínseca do anel aromático, o composto fenólico não fica instável, mesmo possuindo um elétron desemparelhado. Enquanto que seu mecanismo de ação secundário (indireta) atua quelando os metais que reagem com o peróxido de hidrogênio, ferro e cobre ou qualquer outro metal de transição, e formam radicais hidroxilas (KOPPENOL, 1993; FERNANDEZ et al., 2002).

1.7 Bioacessibilidade dos compostos fenólicos

É relevante ressaltar que nem todos os fenóis ingeridos pela alimentação são absorvidos pelo organismo, pois os mesmos dependem de diferentes fatores para se tornarem bioacessíveis. Desta forma, a bioacessibilidade pode ser definida como a fração de bioativos que são liberados da matriz alimentar e se tornam passíveis de absorção, permitindo assim uma maior acurácia sobre a capacidade antioxidante *in vivo* dos extratos (GLEESON, RYAN, BRAYDEN, 2016; BARBA et al., 2017).

A bioacessibilidade difere entre os tipos de matriz e de composto bioativo, de maneira que os fatores como a liberação, solubilidade, hidrofobicidade, massa molecular, configuração de isômeros, entre outros, são variáveis que determinam a bioacessibilidade da amostra que se deseja estudar, já que cada fase do trato gastrointestinal possui suas peculiaridades. Diversas são as maneiras de se avaliar essa bioacessibilidade, como ensaios *in vivo*, *ex vivo* ou até mesmo *in vitro* que, neste último caso, consiste em simular o trato gastrointestinal através da adição de substâncias e da regulação de pH e temperatura, realizando então as análises qualitativas e quantitativas com o produto formado pelas reações. Uma das técnicas que auxiliou a aperfeiçoar esse processo foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, capaz de permitir uma análise mais profunda da amostra antes e depois do processo de digestão, identificando os compostos ali presentes a partir de seus dados espectroscópicos (GLEESON, RYAN, BRAYDEN, 2016; BARBA et al., 2017; NETO et al., 2017; GONG et al., 2018).

Nos estudos *in vivo*, os modelos animais escolhidos possuem metabolismo semelhante ao de humanos, de maneira que essas pesquisas permitem uma maior fidelidade e melhor aproximação da fisiologia humana, como é o caso do uso de porcos ou macacos. Porém, os mesmos ainda possuem muitas complicações para serem utilizados. Como alternativa, há também o uso de ratos e camundongos, que são animais usuais para testes laboratoriais *in vivo*, porém a diferença de metabolismo torna esse modelo menos ideal (CARDOSO et al., 2015).

Como alternativa menos trabalhosa e custosa, além de mais rápida, foram desenvolvidos testes *in vitro* que simulam a digestão que ocorre no trato gastrointestinal dos animais monogástricos, tendo suas vantagens e desvantagens descritas na tabela 1. Ao acoplar a técnica com o uso de uma cultura heterogênea de células do tecido epitelial de

adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), que tendem a simular a barreira intestinal, permitem determinar a absorção de compostos bioativos pelo intestino (BARBA et al., 2017).

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens envolvendo os modelos de bioacessibilidade *in vivo* e *in vitro*.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
<i>In vivo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Situação <i>in vivo</i> • Permite amostragem suficiente para estudos farmacocinéticos • Seleção de indivíduos para populações alvo específicas de intenção de uso 	<ul style="list-style-type: none"> • Incertezas sobre a relevância em humanos quando algum modelo animal é utilizado • Falta de um padrão certificado de referência para comparação de dados entre estudos/laboratórios • Considerações éticas e financeiras
<i>In vitro</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Ferramentas de triagem de alto rendimento • Provê informações sobre a eficiência em cada etapa da digestão • Validação e padronização com material referencial • Custo, automatização e miniaturização 	<ul style="list-style-type: none"> • Dinâmica do meio gastrointestinal não é completamente reproduzida com bioquímicos e cultura de células • Efeito da microbiota intestinal e metabolismo hepático não é considerado

Fonte: Adaptado de Fernandez-García, Carvajal-Lérida, Pérez-Gálvez (2009).

Para a determinação da bioacessibilidade são utilizadas tanto ações químicas quanto mecânicas para simular a digestão como esta realmente ocorre, para isso se utilizam substâncias para alterar o pH do meio, tornando-o ácido para a fase gástrica e básico na fase intestinal, além da adição de enzimas que são comumente encontradas no trato gastrointestinal, como é o caso da pepsina para a fase gástrica, enquanto que na fase intestinal há a adição de tripsina e extrato biliar. Junto a todos esses passos, estabelece-se o período de 2 h para cada etapa de reação, em banho-maria a 37 °C com agitação. Após cada passo são retiradas alíquotas de cada amostra a ser estudada, para então serem feitos os testes de

avaliação do poder antioxidante de cada amostra, análise da composição química, acompanhando as alterações que ocorreram na amostra ao longo do processo. (FERNANDEZ-GARCÍA, CARVAJAL-LÉRIDA, PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; ETCHEVERRY, GRUSAK, FLEIGE, 2012).

1.8 *Licania tomentosa* Benth.

Chrysobalanaceae é uma família de plantas angiospermas, possuindo em torno de 525 espécies divididas em 20 gêneros. A *L. tomentosa*, objeto de estudo aqui utilizado, se encontra dentro das 417 espécies neotropicais dessa família, que possuem desde árvores até arbustos e lianas (MONTEIRO et al., 2012).

L. tomentosa (Benth.) Fritsch, popularmente conhecida como oiti ou oitizeiro, é nativa da Mata Atlântica com forte prevalência no nordeste brasileiro. Possui em torno de 15 metros de altura e copa frondosa (Figura 7a). Caracterizada por raízes pivotantes, folhas perenes simples, flores brancas e fruto oval com casca amarelada quando maduro (Figura 7b), medindo em torno de 12 a 16 centímetros de comprimento (MACHADO et al., 2006). Seu período de floração está compreendido entre os meses de agosto e setembro, com frutificação nos meses de novembro a janeiro (NETO, SOUZA, 2011).

Várias utilidades são relatadas para *L. tomentosa*, como o uso da madeira para construções, ornamentação da área urbana por conta da sombra formada pela sua copa frondosa (LORENZI, 1992), além do seu uso para compostagem (ALVES, PASSONI, 1997). Dentre as propriedades medicinais comprovadas para a planta, destacam-se a atividade antiviral contra o vírus da herpes simples (MIRANDA et al., 2002), sua propriedade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, além da atividade antioxidante comprovada em modelos *in vitro*, como a neutralização do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (SILVA et al., 2012). Quanto à composição química das sementes, estudos anteriores mostraram a presença de compostos fenólicos (FARIAS et al., 2013; PESSOA et al., 2016).

Figura 7 – Fotos da árvore de *Licania tomentosa*, junto com suas folhas, fruto e semente. (a) árvore; (b) frutos, folhas e sementes.



Fonte: Camilo (2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos, do potencial antioxidante e atividade hepatoprotetora do extrato etanólico de sementes de *L. tomentosa* Benth. contra estresse oxidativo induzido por etanol em roedores.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato etanólico da semente de *L. tomentosa* (EELt);
- Realizar a determinação da composição química do EELt;
- Avaliar o potencial antioxidante e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos *in vitro* do EELt;
- Avaliar o potencial hepatoprotetor *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato etanólico da semente de *L. tomentosa*

Primeiramente, houve a coleta dos frutos maduros de *L. tomentosa*, de Novembro a Janeiro de 2017, no Campus do Pici da UFC, cidade de Fortaleza, estado do Ceará. A planta foi identificada pelo taxonomista Dr. Edson de Paula Nunes e uma excicata com número EAC 40215 foi depositado no Herbário Prisco Bezerra dessa mesma universidade. O trabalho conta com o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) de nº AE3463E, além do registro de número 47978-1, para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Vale ressaltar que, o próprio IBAMA costuma fornecer sementes de seus bancos para estudos do grupo proponente do projeto.

Para a elaboração do extrato, as sementes foram separadas da polpa do fruto e, em seguida, desidratadas em estufa ventilada a 50 °C até verificação de peso constante. Posteriormente, as sementes foram moídas em moinho rotatório (Cadence, MDR301, Itajaí, Brasil). A farinha obtida foi armazenada em frasco hermeticamente fechado e armazenada a temperatura ambiente.

Para extração, a farinha das sementes foi então submetida à imersão em etanol P.A. (1:2 m/v) à temperatura ambiente com duas trocas de solvente a cada três dias de extração, seguindo a metodologia descrita por Pessoa (2015), com modificações. Feito isso, a solução extrativa foi filtrada para retirada da torta e impurezas menores. Por fim, a eliminação do solvente foi realizada por destilação em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada (40-50 °C). O extrato etanólico da semente de *L. tomentosa* (EELt) bruto obtido foi então acondicionado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração (-20 °C) até o momento das análises.

3.2 Caracterização química e atividade antioxidante *in vitro*

3.2.1 Determinação de fenóis totais

A quantidade de fenóis no EELt foi determinada de acordo com o protocolo de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), com modificações. A reação se deu através da mistura de 50 μL de reagente de Folin-Ciocalteau (33%) com 50 μL da amostra. Após três minutos sob abrigo de luz, foram adicionados 100 μL de solução carbonato de sódio 10 %, com posterior incubação de 30 minutos sob abrigo de luz. Para a construção da curva padrão, foi utilizado ácido gálico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em seis diferentes diluições. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Epoch, Take 3 module, BioTek, Winooski, EUA) utilizando 700 nm como comprimento de onda, se utilizando água destilada como branco para calibrar o espectrofotômetro. O resultado foi expresso em mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato. O teste foi realizado em triplicata.

3.2.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

A metodologia utilizada para esse ensaio seguiu o protocolo proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Uma solução de DPPH 150 μM foi preparada, através da adição de 5,914 mg de DPPH em 100 mL de etanol, sendo preparada e utilizada somente no dia do ensaio e mantida sob refrigeração e abrigo de luz até o momento do uso. Com a solução radical preparada, foram feitas diluições seriadas do EELt, iniciando na concentração de 1 mg/mL.

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 22 μL de cada diluição nos poços, com posterior adição de 200 μL da solução de DPPH. A microplaca foi mantida sob abrigo de luz por 30 minutos, com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (Epoch, Take 3 module, BioTek, Winooski, EUA) sob o comprimento de onda de 520 nm. Como branco e controle positivo, foram utilizados, respectivamente, o etanol e ácido gálico. Sendo o teste realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em capacidade de neutralização média (CN_{50}).

3.2.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS^{•+}

A segunda metodologia utilizada para determinar a atividade antioxidante do extrato foi através do ensaio com o radical livre 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) de acordo com o proposto por Rufino et al. (2007), com modificações. O radical ABTS^{•+} foi preparado através da reação de 5 mL de solução estoque ABTS com 88 µL de persulfato de potássio. Com o radical preparado, foi feita a diluição do mesmo com álcool etílico, até apresentar absorvância de 0,70 a 734 nm. Para a construção da curva padrão, foi utilizada uma solução de quercetina 2 mM em cinco diluições. O mesmo procedimento de diluição foi realizado com a solução do extrato (1 mg/mL).

A mistura reacional foi incubada sob abrigo de luz por seis minutos, com leitura da absorvância realizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220, Curitiba, Brasil), utilizando 734 nm como comprimento de onda. O álcool etílico puro foi utilizado como branco. Os resultados foram expressos em CN₅₀ e em mg equivalentes de quercetina/g de extrato.

3.2.4 Determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)

Outra metodologia utilizada para determinar a atividade antioxidante de EELt foi através do ensaio de redução do ferro, feito de acordo com o protocolo de Rufino et al. (2006). O preparo do reagente FRAP foi feito através da adição de 25 mL de tampão acetato 0,3 M em uma mistura de 2,5 mL de solução 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) 10 mM com 2,5 de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Para construção da curva padrão, foi utilizada uma solução de sulfato ferroso 2 mM em quatro diluições, o mesmo procedimento de diluição foi feito com a solução do extrato 1 mg/mL.

A solução contendo a amostra e o reagente foi incubada em banho-maria (Nova Ética, Dubnoff série 304/D, Vargem Grande Paulista, Brasil) a 37 °C por 30 minutos. A leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220, Curitiba, Brasil), utilizando 595 nm como comprimento de onda. O reagente FRAP foi utilizado como branco. Os resultados foram expressos em µM de equivalentes de sulfato ferroso/mg de extrato.

3.2.5 Identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF)

A identificação dos compostos fenólicos presentes no EELt foi realizada em sistema Acquity UPLC acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QTOF) (Waters Corporation, Milford, EUA), em colaboração com o Laboratório de Química e Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, Ceará).

As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna Waters Acquity UPLC BEH, temperatura fixa de 40 °C, fase móvel composta por água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 minutos), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL. Leucina encefalina foi utilizada com lock mass. Modo de aquisição MS^E (espectrometria de massas de alta energia). O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation, Milford, EUA).

3.3 Bioacessibilidade de compostos fenólicos *in vitro*

3.3.1 Digestão gastrointestinal simulada

A digestão *in vitro* foi realizada de acordo com o descrito por Helal et al. (2014), com modificações. De início, 1 g de amostra recebeu 5 mL de fluido gástrico, com pH 2,5, 2g/L de NaCl e 300 U/mL de pepsina, com incubação de 2 h em banho-maria (Nova Ética, Dubnoff série 304/D, Vargem Grande Paulista, Brasil) a 37°C com agitação, seguido de resfriamento em banho de gelo por 10 minutos. Uma alíquota de 1,5 mL foi retirada de cada amostra, o pH ajustado para 7,5 com NaHCO₃ 0,1 M, com posterior adição de 3,5 mL de fluido intestinal artificial, com pH 7,5; 8,4 mg/mL de NaHCO₃ 0,1 M, 0,8 g/L de pancreatina e 5 g/L de extrato de bile. Mais 2 h de incubação a 37°C com agitação, seguido de banho de gelo por 10 minutos. Logo após, mais uma alíquota de 1,5 mL foi retirada e acidificada até atingir pH 2,5 para evitar alterações dos compostos fenólicos presentes na amostra. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C em centrífuga (Hettich Rotina 380R, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi filtrado e mantido em refrigeração a -20°C até o momento das análises. Houve dois tipos de tratamentos, um com a amostra recebendo os fluidos com as enzimas e outro com a amostra recebendo os fluidos sem as enzimas, para analisar o efeito das mesmas sobre as amostras. O ensaio foi realizado em

duplicata, e como padrão de comparação foi utilizado o ácido gálico.

3.3.2 Quantificação e avaliação da capacidade antioxidante de compostos fenólicos totais após a digestão

Os sobrenadantes coletados após a digestão simulada *in vitro* tiveram seus compostos fenólicos totais quantificados, através do reagente de Folin-Ciocalteu (item 3.2.1). Enquanto que suas respectivas capacidades antioxidantes foram determinadas pelo método de neutralização do DPPH, já comentado anteriormente no item 3.2.2.

3.3.3 Índices de bioacessibilidade

Para uma melhor compreensão das mudanças ocasionadas pela digestão, são calculados os índices de bioacessibilidade para cada amostra, da seguinte maneira:

- A bioacessibilidade de compostos fenólicos (BCF) indica a fração de compostos fenólicos que permaneceram bioacessíveis:

$BCF = CF_D / CF_A \times 100$, onde CF_D representa a concentração dos compostos fenólicos após a digestão, enquanto que CF_A representa a concentração de compostos fenólicos antes do processo de digestão simulada;

- O índice de atividade antioxidante bioacessível (IAAB) representa a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos bioacessíveis:

$IAAB = A_D / A_A \times 100$, onde A_D corresponde à atividade antioxidante após a digestão, enquanto que A_A corresponde à atividade antioxidante antes do processo de digestão simulada.

3.4 Avaliação da capacidade hepatoprotetora *in vivo*

3.4.1 Animais

Ao total foram utilizados 25 ratos machos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), convencionais, obtidos com o Biotério Central da UFC (BIOCEN-UFC), todos com três semanas de idade. Os mesmos foram alojados no Biotério Experimental do Laboratório de

Bioprospecção de Recursos Regionais, Departamento de Biologia da UFC, em temperatura de $23,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro e umidade do ar de 45-55%. Mantidos em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho (Biotécnicas, São Paulo, Brasil), ração balanceada (Biobase, Biotécnicas, São Paulo Brasil) e água *ad libitum* até atingirem o peso de aproximadamente 180 g para iniciar os testes. Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFC (CEUA-UFC), sob o protocolo de nº 122/2017.

3.4.2 Desenho experimental e coleta de material biológico

A avaliação da capacidade hepatoprotetora do EELt consistiu na utilização do protocolo modificado, proposto por Rochette et al. (2013). Os 25 ratos foram separados aleatoriamente em 5 grupos, com 5 animais em cada, nomeados de A a E. Os animais receberam tratamento intragástrico, pela manhã, uma vez ao dia durante 15 dias, onde cada grupo recebeu os seguintes tratamentos:

Grupo A: 1 mL de solução fisiológica durante os 15 dias;

Grupo B: 1 mL de solução fisiológica por 14 dias, a partir do 15° foram três doses de etanol, totalizando 5 g/Kg, com intervalo de 12 h entre cada;

Grupo C: EELt 100 mg/Kg por 14 dias, a partir do 15° foram três doses de etanol, totalizando 5 g/Kg, com intervalo de 12 h entre cada;

Grupo D: EELt 200 mg/Kg por 14 dias, a partir do 15° foram três doses de etanol, totalizando 5 g/Kg, com intervalo de 12 h entre cada;

Grupo E: Silimarina 100 mg/Kg por 14 dias, a partir do 15° foram três doses de etanol, totalizando 5 g/Kg, com intervalo de 12 h entre cada;

Passadas 6 h após a última dose de etanol, todos os animais foram anestesiados com anestésico inalatório e o sangue coletado diretamente pelo plexo retro-orbital em tubo. Duas coletas foram realizadas, uma em tubo heparinizado para análise hematológica, outra em tubo não-heparinizado com posterior separação do soro sanguíneo por centrifugação a 3000 x g (Hettich Rotina 380R, Tuttlingen, Alemanha) durante 10 minutos e utilizado para a análise dos biomarcadores bioquímicos.

Após eutanásia, o fígado foi excisado, liberto de gordura e pesado. Com divisão em duas porções. A primeira foi imediatamente fixada em solução de formalina a 10% e encaminhada para análise histopatológica, enquanto que a segunda foi homogeneizada em

tampão Tris-HCL gelado a 0,1 M (pH 7,2), centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos, estocando o sobrenadante a -80 °C até a realização do teste de peroxidação lipídica.

3.4.3 Análise hematológica

A mensuração quantitativa dos componentes celulares sanguíneos como, hemoglobinas e linfócitos, foi feita em analisador hematológico automatizado (Sysmex, pocH-100iV Diff, São Paulo, Brasil), com seus valores comparados aos valores de intervalo indicativos de normalidade para a espécie.

3.4.4 Análise dos biomarcadores hepáticos

A mensuração quantitativa das enzimas lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) foi determinada utilizando kits laboratoriais, conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em unidade de atividade enzimática por litro (U/L).

3.4.5 Ensaio de peroxidação lipídica através das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio foi baseado no protocolo descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com modificações. Homogenato foi preparado em tampão Tris/HCl 50 mM (pH7,4), com parte do fígado excisado, na proporção de 1:10. Após o preparo, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 2.500 rpm (Hettich Rotina 380R, Tuttlingen, Alemanha) e o sobrenadante armazenado em -80 °C até o uso. No dia da análise, foram adicionados 200 µL do sobrenadante em uma solução contendo 500 µL de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,8%, 500 µL de tampão ácido acético (pH 3,0), 200 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 8,1% e 100 µL de água destilada.

As soluções foram incubadas em banho-maria a 95 °C por 2 horas (Modelo 304/D, Vargem Grande Paulista, Brasil), depois foram resfriadas em temperatura ambiente e lidas a 532 nm (Epoch, Take 3 module, BioTek, Winooski, EUA). Os resultados foram expressos em equivalentes de malondialdeído (MDA) nmol/g de tecido hepático.

3.4.6 Histopatologia

Os tecidos foram desidratados em álcool, incorporados em parafina, cortados em secções de 4-5 mm de espessura e corados com hematoxilina-eosina. Logo após, as secções foram examinadas em microscópio óptico (Labomed, Lx 300, São Paulo, Brasil) para verificação de alterações estruturais nos hepatócitos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento do extrato

O extrato etanólico das sementes de *L. tomentosa* (EELt) apresentou um rendimento de 20,76%, valor já esperado para preparações que visam a obtenção de metabólitos secundários. De acordo com Farias et al (2013), o extrato das sementes de *L. tomentosa* apresentou um rendimento de somente 4,4%, um valor inferior ao encontrado no presente no estudo. Contudo, quando comparado com o rendimento obtido para o extrato das sementes de *L. rígida*, também realizado pelo Farias et al (2013), o rendimento mostrou-se similar, com um valor de 28,1%.

4.2 Caracterização química

4.2.1 Concentração de compostos fenólicos

O teste de fenóis totais permitiu determinar a concentração de fenóis presentes no extrato e estabelecer uma relação com uma substância fenólica amplamente conhecida, o ácido gálico, um ácido orgânico com alta capacidade antioxidante. A concentração de polifenóis totais apresentada por EELt foi de $194,8 \pm 0,59$ mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato (Tabela 2), um valor alto se comparado com o apresentado por Pessoa et al (2016), que trabalhou também com EELt e obteve um quantitativo de $108,47 \pm 6,90$ mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato.

O mesmo se aplica para outras espécies vegetais, pois de acordo com Hua, Yi-fei e Zhi-qin (2018), a semente de *Citrus reticulata*, popularmente conhecida como tangerina, apresentou um valor máximo de $2,81 \pm 0,04$ mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato. Da Silva et al. (2014) realizaram o teste de polifenóis totais em várias frutas consumidas cotidianamente, onde boa parte dessas frutas apresentaram um valor inferior ao obtido pela semente de *L. tomentosa*, como é o caso da goiaba e do abacaxi que apresentaram 17,23 e 9,90 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato, respectivamente (CHEN et al., 2014; DIRAR et al., 2018).

4.2.2 Capacidade antioxidante

O resultado do ensaio de atividade antioxidante total, pela captura do radical ABTS, mostrou que o EELt apresentou uma capacidade antioxidante de $32,22 \pm 1,1$ mg equivalentes de quercetina/g de extrato (Tabela 2), significando que cada 1 g de extrato apresenta o mesmo efeito que 32 mg de quercetina. Outra maneira de expressar a capacidade antioxidante é através da capacidade de neutralização média (CN₅₀), que apresentou um valor de $144,54 \pm 6,76$ mg/L. Um valor alto se comparado com um extrato de procianidinas obtidas a partir das sementes de uva, fruta já conhecida por sua capacidade antioxidante, pois de acordo com Zhou et al. (2018), o extrato apresentou uma CN₅₀ média de $37,25 \pm 1,48$ mg/L.

Na neutralização do DPPH, outra metodologia para avaliar a capacidade antioxidante, o EELt apresentou uma CN₅₀ de $74,31 \pm 7,25$ µg/mL (Tabela 2), valor próximo ao encontrado para o extrato de procianidinas, que apresentou uma CN₅₀ de $83,81 \pm 5,33$ mg/L (ZHOU et al., 2018). Enquanto que o ácido gálico, utilizado como controle, apresentou uma CN₅₀ de $8,55 \pm 1,11$ µg/mL. Ou seja, aqui é possível observar uma boa atividade antioxidante para o extrato, pois apesar de apresentar um valor alto se comparado diretamente com o ácido gálico, um composto fenólico puro, o mesmo apresenta um valor próximo ao encontrado para o extrato da semente de outra espécie.

Para o ensaio de atividade antioxidante total pela redução do ferro, FRAP, o valor obtido para o poder redutor de EELt foi de $725 \pm 132,48$ µM equivalentes de sulfato ferroso/mg de extrato (Tabela 2), um valor alto se comparado ao obtido para o abacaxi que, de acordo com Yeoh e Ali (2017), apresentou $28,31$ µM equivalentes de sulfato ferroso/mg de peso do fruto.

Os ensaios de neutralização do ABTS e DPPH permitem analisar a ação primária desses fenóis, em que eles interagem diretamente com o radical livre, doando prótons ou elétrons, estabilizando a substância oxidante. Enquanto que no método FRAP, os compostos presentes em EELt, em especial os fenóis, agem de maneira secundária, pois o mesmo reduz um metal de transição que se, em sua forma oxidada, encontrar o peróxido de hidrogênio, reage e forma um radical hidroxila. Essa análise mais geral permite um maior conhecimento acerca das diferentes vias de ação antioxidante da amostra em estudo.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios realizados para a quantificação de fenóis totais, junto com a determinação da atividade antioxidante pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP. mg: miligramas; g: grama; CN₅₀: capacidade de neutralização média; L: litro; μM: micromolar; FeSO₄: sulfato ferroso.

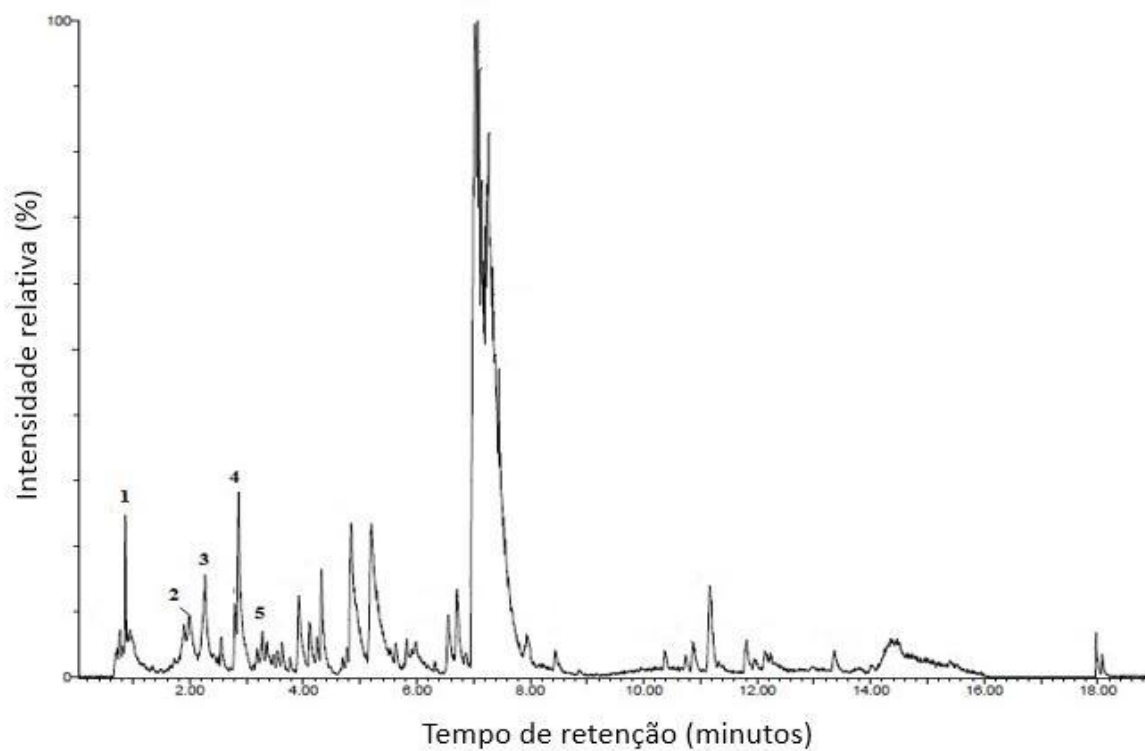
Ensaio	Unidade	Amostra
Fenóis totais	mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato	194,8
	mg equivalentes de quercetina/g de extrato	32,22 ± 1,1
ABTS	CN ₅₀ (mg/L)	144,54 ± 6,76
DPPH	CN ₅₀ (mg/L)	74,31 ± 7,25
FRAP	μM equivalentes de FeSO ₄ /mg de peso	725 ± 132,28

Fonte: Autor.

4.2.3 Identificação dos compostos fenólicos

EELt foi submetido à cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-QTOF) para identificar os compostos fenólicos presentes na preparação. A galocatequina e sua forma isomérica, substâncias identificadas no extrato (Figura 8 e tabela 3), são conhecidas por exibirem forte atividade antioxidante em testes *in vitro* (NANJO et al., 1996; PLUMB et al., 2002). Apesar da identificação de somente esses dois compostos como fenólicos, há relatos na literatura da presença de vários flavonoides na semente das plantas do gênero *Licania*, como quercetina, canferol, catequina, epicatequina, entre outros (PESSOA et al., 2016). Vale ressaltar que por se tratar de um extrato etanólico, pode haver vários tipos diferentes de substâncias, como o ácido naftalenodicarboxílico-hexose, não-fenólicas.

Figura 8 - Cromatograma da UPLC-QTOF realizada com extrato etanólico da semente de *Licania tomentosa*. 1= Ácido naftalenodicarboxílico-hexose, 2= Dímero de galocatequina (isômero), 3= Galocatequina, 4= Substância não identificada, 5= Glicosídeo-O do ácido hidroxi-jasmônico.



Fonte: Autor.

Tabela 3 – Compostos fitoquímicos detectados no extrato das sementes de *Licania tomentosa* (EELt) via UPLC-QTOF nos modos de ionização negativo e positivo. Os números em parênteses na coluna de produtos iônicos são referentes a intensidade relativa. Tr: tempo de retenção.

Pico no.	Tr min	[M+H] ⁻ (m/z) Observada	[M-H] ⁻ (m/z) Calculada	Produtos Iônicos (MS/MS) ^a	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Composto Proposto	Referência
1	0,88	377,0858	377,0873	341,1105 (45), 215,0400 (20), 179,0588 (42)	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	-4,0	Ácido naftalenodicarboxílico-hexose	ZHANG et al., 2017
2	1,98	609,1234	609,1244	441,0832 (40), 423,0777 (30), 305,0716 (20)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	-1,6	Dímero de galocatequina (isomer)	STANISAVLJEVIC et al., 2015
3	2,27	305,0653	305,0661	167,0403 (10), 218,1079 (20)	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	-2,6	Galocatequina	WANG et al., 2017
4	2,84	443,1910	443,1917	305,0705 (8),	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	-1,6	Não identificado	-
5	3,27	387,1671	387,1655	163,1183 (10)	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	4,1	Glicosideo-O do ácido hidroxi-jasmônico	FARAG et al., 2016

Fonte: Autor.

4.3 Bioacessibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos após processo de digestão simulada

Após a digestão simulada, os valores encontrados para a bioacessibilidade de compostos fenólicos (BCF) do EELt foram de 33,28 e 37,91 % para a digestão com e sem enzimas, respectivamente (Tabela 4). Enquanto que o ácido gálico apresentou valores menores, 23,57 e 11,02 % para digestão com e sem enzimas, respectivamente. Esses valores são esperados tanto para o ácido gálico (NETO et al., 2017) como para outros ácidos fenólicos. Segundo Martini, Conte e Tagliazucchi (2018), alguns ácidos hidroxibenzóicos exibiram bioacessibilidade em torno de 28,1 a 43,4 %.

Em sementes de *Opuntia albicarpa* cv. Reyna e *Opuntia ficus-indica* cv. Rojo pelon, os valores para compostos fenólicos bioacessíveis encontrados foram baixos, se comparado com o presente estudo, apresentando uma bioacessibilidade de somente 0 a 14 %. Segundo Alminger et al. (2014), matrizes altamente processadas, como extratos fenólicos exibem uma bioacessibilidade de compostos fenólicos próximas a 100 %, enquanto que matrizes sólidas exibem um valor em torno de 30 a 100 %.

As diferenças obtidas para a quantificação de fenóis entre as duas digestões, com e sem enzimas, podem ter sido ocasionadas pela interação proteína-composto fenólico. Segundo Shahidi e Senadheera (2018), existem quatro tipos de interações entre proteínas e compostos fenólicos, sendo a hidrofóbica e as ligações de hidrogênio as principais, onde o grupo hidroxila dos fenóis se liga ao grupo carbonila das proteínas, formando complexos que podem ser solúveis ou insolúveis, além da possibilidade de reações enzimáticas alterarem as estruturas do composto fenólico.

Vale ressaltar que o ácido gálico, assim como muitos ácidos fenólicos, apresenta instabilidade em pH alto, acredita-se que o principal responsável por essa instabilidade são os grupos hidroxila presentes na substância (FRIEDMAN, JÜRGENS, 2000). Talvez por isso o ácido gálico, um composto puro, apresentou valores tão baixos de bioacessibilidade.

Outro ponto a se analisar na bioacessibilidade é o índice de atividade antioxidante bioacessível, aqui analisado pela neutralização do radical DPPH, que teve o valor alterado durante a digestão. Como observado na tabela 4, apesar de a quantidade de fenóis ser próxima entre a digestão com enzimas e a digestão sem enzimas para EELt, as suas capacidades antioxidantes foram reduzidas, possivelmente pela interação já descrita, na qual o grupo hidroxila do composto fenólico, responsável pela atividade antioxidante, ficou inativado pela interação com o grupo carbonila da proteína. Enquanto que os valores apresentados pelo ácido gálico foram drasticamente reduzidos pelo processo da digestão, não só por conta das

enzimas, como também pelo pH do meio. O esperado é que a atividade antioxidante seja proporcional a quantidade de compostos fenólicos na amostra, porém em certos casos os compostos fenólicos perdem sua capacidade antioxidante por conta da interação com outras moléculas, alterações na temperatura ou pH do meio.

Tabela 4 – Polifenóis totais, atividade antioxidante e índices de bioacessibilidade nos sobrenadantes antes e após digestão gastrointestinal simulada.

Amostra	Tratamento	Fenóis Totais ($\mu\text{g de eaq/mg de extrato}$)	BCF (%)	DPPH (N %)	IAAB (%)
EELt	Antes da digestão	$16,71 \pm 0,32^c$		$10,65 \pm 2,87^b$	
	Pós-intestinal	$5,56 \pm 0,55^e$	$33,28 \pm 3,28^b$	$1,21 \pm 0,44^c$	$11,35 \pm 4,17^b$
	Pós-intestinal sem enzimas	$6,33 \pm 0,50^e$	$37,91 \pm 3,02^a$	$3,35 \pm 1,35^c$	$31,48 \pm 12,65^a$
Ácido Gálico	Antes da digestão	$99,37 \pm 1,42^a$		$62,48 \pm 1,59^a$	
	Pós-intestinal	$31,73 \pm 3,72^b$	$23,57 \pm 2,76^c$	$1,65 \pm 0,71^c$	$2,64 \pm 1,13^b$
	Pós-intestinal sem enzimas	$11,02 \pm 2,11^d$	$11,02 \pm 2,11^d$	$3,08 \pm 1,26^c$	$4,92 \pm 2,02^b$

EELt: extrato etanólico das sementes de *Licania tomentosa*; eaq: equivalentes de ácido gálico; BCF: bioacessibilidade de compostos fenólicos; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; N%: percentual de neutralização do radical DPPH; IAAB: índice de atividade antioxidante bioacessível;

Resultados são expressos como média \pm desvio padrão para fenóis totais e atividade antioxidante;

^{a-e} Diferenças significativas dentro da mesma coluna são mostradas por letras diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

4.4 Avaliação da hepatoproteção *in vivo*

4.4.1 Análise hematológica

A análise hematológica mostrou que todos os parâmetros investigados (como hemoglobinas e leucócitos) apresentaram valores dentro dos níveis de referência para a espécie. De acordo com Lu e Cederbaum (2008), um dos efeitos colaterais da ingestão de etanol é o surgimento de inflamações, então o esperado seria um aumento nos níveis de leucócitos do animal tratado com etanol, indicando que houve inflamação em algum ponto. Enquanto que os animais tratados com EELt deveriam apresentar níveis semelhantes aos tratados somente com salina e silimarina, de forma que ficassem o mais próximo da normalidade.

4.4.2 Análise dos biomarcadores hepáticos

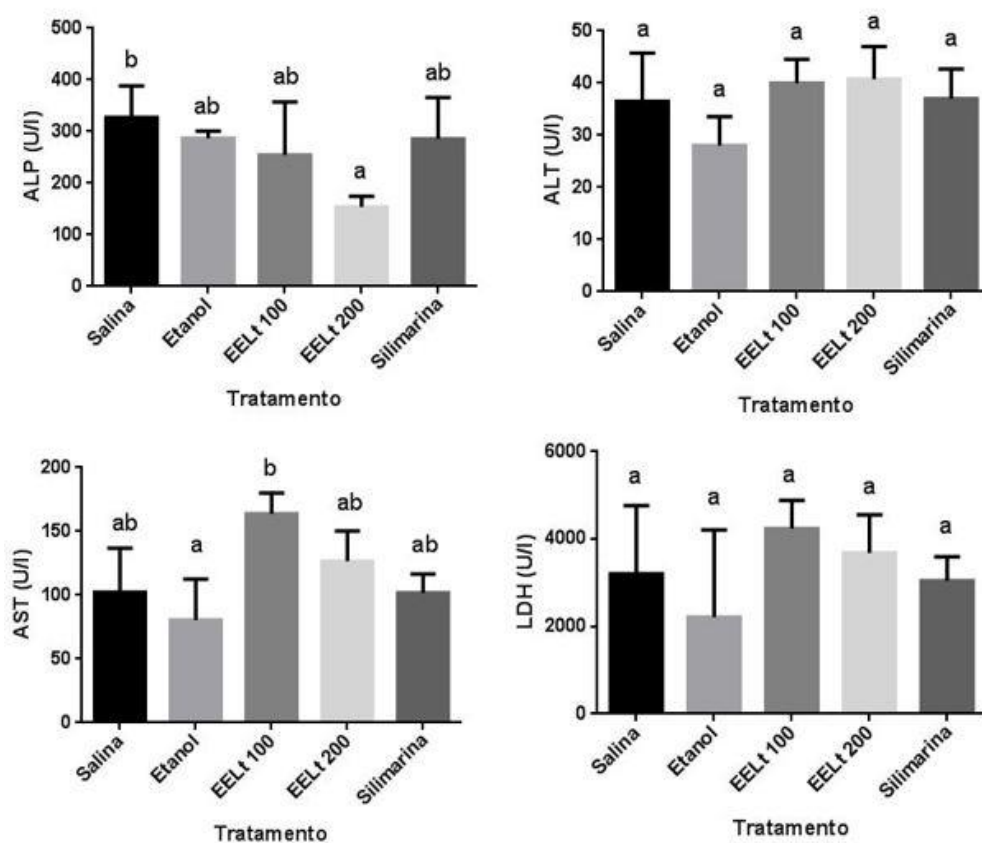
Outra análise para se estabelecer a presença, ou não, de estresse oxidativo é a quantificação da atividade das quatro principais enzimas marcadoras de dano hepático, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e lactato desidrogenase (LDH). Essas quatro enzimas são encontradas em grande quantidade somente em células de determinados órgãos, sendo o fígado um dos principais, de forma que a sua quantidade esperada na corrente sanguínea deve ser baixa, a não ser que ocorra injúria no órgão liberando assim o conteúdo celular no sangue, como é o esperado em casos de estresse oxidativo hepático (SEBAI et al., 2015).

Porém, ao quantificar as mesmas enzimas na corrente sanguínea (Figura 9), somente a ALP e AST mostraram-se alteradas quando comparadas com o grupo salina. No caso da ALP, o grupo tratado somente com EELt 200 mg/Kg foi o que apresentou menor valor, porém esse fato em isolado não é o suficiente para inferir que houve hepatoproteção, já que todos os outros parâmetros avaliados se apresentaram dentro da normalidade. Outro ponto é que a diferença estatística foi somente com o controle, grupo esse que não recebeu agente indutor de estresse, de forma que essa alteração não é relevante para indicar estresse oxidativo (no caso do tratamento só com etanol) ou proteção (tratamentos com etanol mais silimarina ou

EELt). Outra enzima que apresentou diferença estatística entre dois grupos, etanol e EELt 100 mg/Kg, foi a AST, pois os valores obtidos para o grupo tratado somente com etanol foi menor que o obtido para o grupo tratado com EELt 100 mg/Kg que no caso, mais uma vez, esse fato em isolado não define a existência de hepatoproteção ou hepatotoxicidade.

O resultado esperado para esse teste seria, altos níveis das enzimas para o grupo tratado com etanol, e valores semelhantes entre o grupo tratado com silimarina e o grupo tratado somente com salina, já que a silimarina possui seu efeito hepatoprotetor amplamente relatado na literatura (SEBAI et al., 2015). De maneira que para o EELt ser considerado também hepatoprotetor, os níveis enzimáticos para o grupo que recebeu o mesmo como tratamento, deveriam ser próximos ao do grupo da silimarina.

Figura 9 - Níveis plasmáticos das enzimas hepáticas utilizadas como biomarcadores para estresse oxidativo. U/l: unidades por litro; ALP: Fosfatase alcalina; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase; EELt 100: extrato etanólico de *L. tomentosa* 100 mg/kg; EELt 200: extrato etanólico de *L. tomentosa* 200 mg/kg. Diferenças significativas para cada amostra são mostradas por letras diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).



4.4.3 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)

O ensaio TBARS parte da premissa de estimar a peroxidação lipídica que houve no tecido a partir dos subprodutos formados pela metabolização do etanol. Ou seja, ao ocorrer a peroxidação lipídica da membrana dos hepatócitos, é formado o malonaldeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE). Porém para esse teste, o relevante é somente o MDA, pois o mesmo reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), forma um cromóforo capaz de ter sua absorvância lida em espectrofotômetro, e consequentemente estipular a peroxidação lipídica que ocorreu no tecido (GAO et al., 2018).

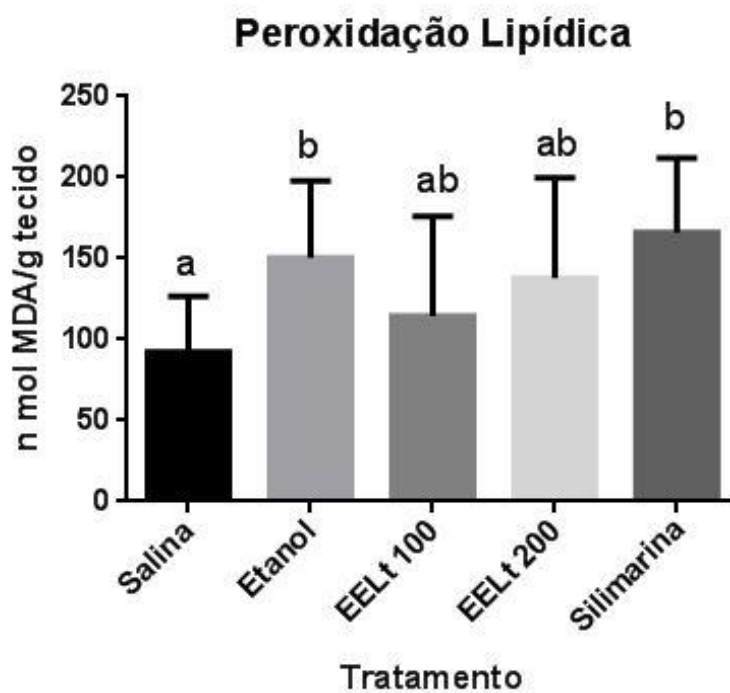
Ao analisar o gráfico da peroxidação lipídica (Figura 10), é possível notar que o grupo que recebeu salina, apresentou níveis menores de MDA que o grupo tratado com etanol e silimarina, enquanto que os tratados com EELt foram intermediários.

Analisando esse gráfico isoladamente, seria possível inferir que o EELt foi ainda mais eficiente que a silimarina na hepatoproteção. Porém ao interpretar o conjunto de dados, isso não se mostra suficiente para fazer esse tipo de inferência. O ideal, de acordo com Sebai et al. (2015), seria que o grupo tratado somente com etanol apresentasse as maiores quantidades de MDA no tecido, enquanto que o grupo tratado com EELt deveria se aproximar ao máximo do grupo que recebeu silimarina ou somente salina, evidenciando que o extrato possui capacidade evitar a peroxidação lipídica.

4.4.3 Histopatologia

A análise histopatológica permitiu inferir que não houve alteração estrutural nos tecidos hepáticos dos animais experimentais, quer na presença ou ausência de etanol, somente uma degeneração hidrópica, que pode significar a presença de citotoxicidade, porém a mesma foi desconsiderada por estar presente também no grupo controle e ser considerada um artefato decorrente da confecção das lâminas para a análise microscópica. De acordo com Sebai et al. (2015), o esperado seria a presença de alterações morfológicas no tecido, como uma leve esteatose microvesicular, nos grupos tratados somente com etanol, enquanto que os tratados com silimarina e EELt deveriam apresentar a morfologia semelhante aos tratados somente com salina, indicando ali que houve de fato uma hepatoproteção.

Figura 10 - Níveis de malondialdeído determinados em macerados de fígado. EELt 100: extrato etanólico de *L. tomentosa* 100 mg/kg; EELt 200: extrato etanólico de *L. tomentosa* 200 mg/kg. Diferenças significativas para cada amostra são mostradas por letras diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$)



Fonte: Autor.

5 CONCLUSÃO

O EELt apresentou um alto rendimento de extração, assim como os testes *in vitro* evidenciaram tanto uma boa capacidade antioxidante, como bioacessibilidade. A partir da caracterização química, foram identificados dois compostos fenólicos conhecidos por sua capacidade antioxidante, a galocatequina e um dímero de galocatequina. Porém não foi possível avaliar a capacidade hepatoprotetora, já que não houve o estabelecimento do estresse oxidativo induzido por etanol. Sugere-se que sejam realizados novos experimentos, com outro protocolo já estabelecido, para a verificação da capacidade antioxidante desse extrato.

REFERÊNCIAS

- ALVES, W. L.; PASSONI, A. A. Composto e vermicomposto de lixo urbano na produção de mudas de oiti (*Licania tomentosa* (Benth)) para arborização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1053-1058, 1997.
- BALOGUN, F. O.; ASHAF, A. O. T. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Dicoma anomala* Sond. aqueous root extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 36, n. 4, p. 504-513, 2016.
- BARBA, F. J.; MARIUTTI, L. R.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORLIEN, V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 195-206, 2017.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CAMILO, J. **Oiti {*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch}**. A Planta da Vez, 2015. Disponível em: < <http://www.aplantadavez.com.br/2015/01/oiti-licania-tomentosa-benth-fritsch.html> >. Acesso em: 3 nov. 2018.
- CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENCO, H.; COSTA, S.; NUNES, M. L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 5-23, 2015.
- CHANDRASEKARA, A. Phenolic acids. **Reference Module in Food Science**, 2018.
- CHEN, S.; TEOH, N. C.; CHITTURI, S.; FARREL, G. C. Coffee and non-alcoholic fatty liver disease: Brewing evidence for hepatoprotection?. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 29, n. 3, p. 435-441, 2014.
- COMPORTI, M.; SIGNORINI, C.; LEONCINI, S.; GARDI, C.; CICCOLI, L.; GIARDINI, A.; VECCHIO, D.; AREZZINI, B. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. **Genes & nutrition**, v. 5, n. 2, p. 101, 2010.
- CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148-173, 2012.

DA SILVA, J. M. C.; DINNOUTI, A. Análise de representatividade das unidades de conservação federais de uso indireto na Floresta Atlântica e Campos Sulinos. **Padrões de Biodiversidade da Mata Atlântica do Sul e Sudeste. São Paulo, Campinas. <http://www.conservation.org.br/ma/index.html>**, p. 1-16, 1999.

DA SILVA, L. M. R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; DE FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014.

DE ALMEIDA, T. S.; NETO, J. J. L.; SOUSA, N. M.; PESSOA, I. P.; VIEIRA, L. R.; DE MEDEIROS, J. L.; BOLIGON, A. A.; HAMERS, A. R. M.; FARIAS, D. F.; PEIJNENBURG, A.; CARVALHO, A. F. U. Phenolic compounds of *Triplaris gardneriana* can protect cells against oxidative stress and restore oxidative balance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 1261-1268, 2017.

DE MEDEIROS, J. L. **Caracterização nutricional, atividade antioxidante e segurança de uso de frutos de oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]**. Tese (Tese em Bioquímica) – UFC. Fortaleza, 2018.

DIRAR, A. I., ALSAADI, D. H. M., WADA, M., MOHAMED, M. A., WATANABE, T., & DEVKOTA, H. P. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. **South African Journal of Botany**, 2018.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 317, 2012.

EZHILARASAN, D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective. **Arab Journal of Gastroenterology**, 2018.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

FÉLIX-SILVA, J., GOMES, J. A., FERNANDES, J. M., MOURA, A. K., MENEZES, Y. A., SANTOS, E. C., TAMBOURGI, D. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; ZUCOLOTTI, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 213, p. 12-20, 2018.

FERNANDEZ, M. T.; MIRA, M. L.; FLORENCIO, M. H.; JENNINGS, K. R. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, n. 2, p. 105-111, 2002.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition research**, v. 29, n. 11, p. 751-760, 2009.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101-2110, 2000.

GAO, M.; MENG, X.; GUO, X.; ZHU, J.; FAN, A.; WANG, Z.; ZHAO, Y. All-active antitumor micelles via triggered lipid peroxidation. **Journal of Controlled Release**, v. 286, p. 381-393, 2018.

GLEESON, J. P.; RYAN, S. M.; BRAYDEN, D. J. Oral delivery strategies for nutraceuticals: Delivery vehicles and absorption enhancers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 90-101, 2016.

GONG, L.; LI, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J.; SUN, B.; In vitro evaluation of the bioaccessibility of phenolic acids in different whole wheats as potential prebiotics. **LWT**, 2018.

HARBERTSON, J. F.; PARPINELLO, G. P.; HEYMANN, H.; DOWNEY, M. O. Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 999-1008, 2012.

HAUFF, S. N. Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga. **Brasília: Programa das Nações Unidas Para o Desenvolvimento**, 2010.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to in vitro gastro-pancreatic digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 506-516, 2014.

JÚNIOR, L. R. P.; DE ANDRADE, A. P.; ARAÚJO, K. D., BARBOSA, A. S.; BARBOSA, F. M. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509-520, 2014.

KALANTARI, H.; DAS, D. K. Physiological effects of resveratrol. **Biofactors**, v. 36, n. 5, p. 401-406, 2010.

KALANTARI, H.; FORUOZANDEH, H.; KHODAYAR, M. J.; SIAHPOOSH, A.; SAKI, N.; KHERADMAND, P. Antioxidant and hepatoprotective effects of Capparis spinosa L. fractions and Quercetin on tert-butyl hydroperoxide-induced acute liver damage in mice. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 8, n. 1, p. 120-127, 2018.

KHARCHOUFA, L.; MERROUNI, I. A.; YAMANI, A.; ELACHOURI, M. Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco: toxicity concerns. **Toxicon**, 2018.

KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3713-3717, 2002.

KOPPENOL, W. H. The centennial of the Fenton reaction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 6, p. 645-651, 1993.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: focus on antioxidant action, cell signaling and safety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 2, p. 86-100, 2010.

LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. Tannins and Vascular Complications of Diabetes: An update. **Phytomedicine**, 2018.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; DA SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 1. ed. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2003.

LEAL, L. K. A. M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, J. B.; RIBEIRO, R. A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* AC Smith. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 4, p. 335-340, 2003.

LI, S.; TAN, H. Y.; WANG, N.; ZHANG, Z. J.; LAO, L.; WONG, C. W.; FENG, Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087-26124, 2015.

LIMA, L. R.; CAVALCANTE, R. R. L.; MARTINS, M. C. C.; PARENTE, D. M.; CAVALCANTE, A. A. M. C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (AC Smith) (Imburana-de-cheiro). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 415-422, 2013.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 5, p. 723-738, 2008.

MACHADO, R. R. B.; MEUNIER, I. M. J.; SILVA, J. A. A.; CASTRO, A. A. J. F. Árvores nativas para a arborização de Teresina, Piauí. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 1, n. 1, p. 10-18, 2006.

MARTINI, S.; CONTE, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after in vitro gastro-intestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 424-436, 2018.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MAURY, C. M. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. **MMA/SBF**, 2002.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Caatinga**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga> >. Acesso em: 22 out. 2018.

MIRANDA, M. M. F. S.; GONÇALVES, J. L. S.; ROMANOS, M. T. V.; SILVA, F. P.; PINTO, L.; SILVA, M. H.; EJZEMBERG R.; GRANJA, L. F. Z.; WIGG, M. D. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytomedicine**, v. 9, n. 7, p. 641-645, 2002.

MONTEIRO, K. L.; DE OLIVEIRA, C.; E SILVA, B. M. S.; MÔRO, S. F. V.; DE CARVALHO, D. A. Caracterização morfológica de frutos, de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, 2012.

NETO, E. M. L.; Melo, R. Comportamento e características das espécies arbóreas nas áreas verdes públicas de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v. 7, n. 1, 2011.

NETO, J. J. L. **Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos de sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd (Polygonaceae)**. Dissertação (Dissertação em Bioquímica) – UFC. Fortaleza, 2017.

NETO, J. J. L., DE ALMEIDA, T. S., DE MEDEIROS, J. L., VIEIRA, L. R., MOREIRA, T. B., MAIA, A. I. V., RIBEIRO, P. R. V.; DE BRITO, E. S.; FARIAS, D. F.; CARVALHO, A. F. U. Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 999-1007, 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PESSOA, I. P. **Caracterização química, atividade antioxidante e segurança de uso de sementes de *Licania rígida* Benth.** Dissertação (Dissertação em Bioquímica) – UFC. Fortaleza, 2015.

PESSOA, I. P.; NETO, J. J. L.; DE ALMEIDA, T. S.; FARIAS, D. F.; VIEIRA, L. R.; DE MEDEIROS, J. L.; BOLIGON, A. A.; PEIJNENBURG, A.; CASTELAR, I.; CARVALHO, A. F. U. Polyphenols composition, antioxidant activity and cytotoxicity of seeds from two underexploited wil *Licania* species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. **Molecules**, V. 21, n. 1755, 2016.

RAJALAKSHMI, S.; VIJAYAKUMAR, S.; ARULMOZHI, P. Ethnobotanical survey of medicinal plants in Thanjavur and its surrounding (Tamil Nadu-India). **Acta Ecologica Sinica**, 2018.

RAMÍREZ-MORENO, E.; HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; GOÑI, I. Intestinal bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of pulp and seeds of cactus pear. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 62, n. 8, p. 839-843, 2011.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA-SANTOS, C.; BASTOS, F. F.; DANTAS, R. F.; HAUSER-DAVIS, R. A.; RODRIGUES, L. C.; BASTOS, V. C.; BASTOS, J. C. Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in blood and liver from a hypoxia-tolerant fish under oxygen deprivation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 163, p. 604-611, 2018.

ROCHETTE, N. F. G.; MOTA, E. F.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; BEZERRA, C. F.; DE OLIVEIRA, M. L. M.; DA SILVA, A. C. M.; DE MIRANDA, M. R. A.; DE MELO, D. F. Effect of the pretreatment with acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice on ethanol-

induced oxidative stress in mice–Hepatoprotective potential of acerola juice. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 3, p. S16-S21, 2013.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SARANGARAJAN, R.; MEERA, S.; RUKKUMANI, R.; SANKAR, P.; ANURADHA, G. Antioxidants: Friend or foe?. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 2017.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Total phenolic content, free radical scavenging and antimicrobial activities of Passiflora subpeltata seeds. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 4, p. 67, 2013.

SEBAI, H.; JABRI, M. A.; SOULI, A.; HOSNI, K.; RTIBI, K.; TEBOURBI, O.; EL-BENNA, J.; SAKLY, M. Chemical composition, antioxidant properties and hepatoprotective effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract against alcohol-induced oxidative stress in rat. **General physiology and biophysics**, v. 34, n. 3, p. 263-275, 2015.

SHAHIDI, F.; SENADHEERA, R. Encyclopedia of Food Chemistry: Protein–Phenol Interactions. **Reference Module in Food Science**, 2015.

SILVA, C. P.; SAMPAIO, G. R.; FREITAS, R. A. M. S.; TORRES, E. A. F. S. Polyphenols from guaraná after in vitro digestion: Evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. **Food Chemistry**, v. 267, p. 405-409, 2018.

SILVA, J. B. N. F.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; FELIPE, C. F. B. Antibacterial and antioxidant activities of *Licania tomentosa* (Benth.) fritesch (Crhysobalanaceae). **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 2, p. 459-464, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in enzymology**. Academic press, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, S.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Polyphenol Interactions and Food Organoleptic Properties. **Reference Module in Food Science**, 2015.

YEOH, W. K.; ALI, A. Ultrasound treatment on phenolic metabolism and antioxidant capacity of fresh-cut pineapple during cold storage. **Food chemistry**, v. 216, p. 247-253, 2017.

ZANOTTI, G.; BERNI, R. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. **Vitamins and hormones**, v. 69, p. 271-295, 2004.

ZHANG, H.; YANG, Y.; ZHOU, Z. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 1, p. 256-263, 2018.

ZHOU, P.; ZHANG, L.; LI, W.; ZHANG, S.; LUO, L.; WANG, J.; SUN, B. In vitro evaluation of the anti-digestion and antioxidant effects of grape seed procyanidins according to their degrees of polymerization. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 85-95, 2018.