



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FRANCISCO CIRINEU DAS CHAGAS NETO

DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO SECO DE *Libidibia ferrea* (JUCÁ) COMO ALIMENTO FUNCIONAL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO.

FORTALEZA

2018

FRANCISCO CIRINEU DAS CHAGAS NETO

DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO SECO DE *Libidibia ferrea* (JUCÁ) COMO ALIMENTO FUNCIONAL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal.

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria
Pontes Thé.

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)

- N385d Neto, Francisco Cirineu das Chagas Neto.
Desenvolvimento do extrato seco de *Libidibia ferrea* como alimento funcional: caracterização química e avaliação das atividades antioxidantes e anti-inflamatória em modelo de neuroinflamação. / Francisco Cirineu das Chagas Neto Neto. – 2018.
81 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
Coorientação: Profa. Dra. Patrícia Maria Pontes Thé.
1. Alimento funcional. 2. Antioxidantes. 3. *Caesalpinia*. 4. Neuroproteção. I. Título.

CDD 615

FRANCISCO CIRINEU DAS CHAGAS NETO

DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO SECO DE *Libidibia ferrea* (JUCÁ) COMO ALIMENTO FUNCIONAL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Bianca Oliveira Louchard
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais que, com muito carinho e apoio,
não mediram esforços para que eu chegasse até
esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde e pela força que me fez chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Pedro e Lúcia, pelo amor, por sempre primarem pela minha educação, dando apoio as minhas decisões e suporte quando precisei.

Aos meus irmãos, Soraya, Mara e Juan, que contribuíram com minha educação, me dando conselhos, exemplos e ajudando nas minhas decisões.

Agradeço a minha namorada, Nadiejda, por todo carinho e paciência nos dias mais difíceis, acalmando-me e mostrando o meu melhor.

Agradeço a Universidade Federal do Ceará e ao Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos pelo suporte técnico e pelo ambiente criativo que proporcionou a realização das minhas análises.

Agradeço a minha orientadora, professora Dra. Kalyne, por todo apoio e confiança desde a graduação, por todos os ensinamentos, por acreditar no meu potencial e por me estimular a ser um profissional melhor.

A minha coorientadora, professora Dra. Patrícia, pelo empenho em contribuir com minha educação, dando suporte e me instruindo quando necessitei.

Agradeço aos colegas de CEFAC pelos momentos leves de trabalho, pela ajuda e por colaborar no meu crescimento pessoal e profissional durante esse tempo.

Agradeço a professora Dra. Antônia pela valiosa ajuda, por todo empenho e cada contribuição dada para o aprimoramento deste trabalho.

Agradeço a Dra. Arcelina pelo suporte fundamental nas minhas análises e pelas considerações construtivas durante a elaboração da presente dissertação.

A CAPES pelo apoio recebido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, que fizeram parte da minha formação, pelo incentivo em seguir em frente e por serem a válvula de escape durante os períodos mais difíceis.

Aos funcionários do departamento de farmácia pela convivência harmoniosa, pelas conversas, e por todo empenho na realização de suas atividades.

Agradeço a todos aqueles que, de forma direta e indireta, contribuíram para o meu crescimento e formação pessoal e profissional. Muito obrigado!

“De nada vale o brilho da inteligência se o coração permanece às escuras”.

(Bezerra de Menezes)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO SECO DE *Libidibia ferrea* COMO ALIMENTO FUNCIONAL: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO.

Caesalpinia ferrea, recentemente reclassificada como *Libidibia ferrea* L.P. Queiroz, é uma árvore pertencente à família Fabaceae, utilizada tradicionalmente no tratamento do diabetes e distúrbios gastrointestinais. No presente estudo otimizou-se a extração de compostos fenólicos obtidos das folhas de *L. ferrea*, utilizando um planejamento fatorial 2^3 , no qual foram investigados os efeitos da concentração de solvente (metanol em água (v/v)), a proporção de folhas de *L. ferrea* em solvente (p/v) e tempo de homogeneização (min) em ultra-turrax®. O extrato com maior teor de fenóis foi liofilizado e caracterizado quimicamente (HPLC e RMN), além de determinado o teor de fenóis totais e flavonoides do liofilizado. Investigou-se as características nutricionais através do teor de proteína bruta e quantificação de minerais, e os potenciais antioxidante (sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)) e anti-inflamatório, avaliando o efeito do extrato sobre o aumento da concentração de nitrito em cultura de micróglia induzida por LPS. A otimização sugeriu que a extração com 40% de metanol durante 4 minutos de homogeneização, usando 24% de folhas secas (p/v) apresentou o maior teor de fenóis totais (283,7 mgAG/g). No extrato liofilizado foi quantificado o teor fenóis totais (260 mgEAG/g) e de flavonoides totais (21,1 mgEQ/g), que estão relacionados a presença de ácido gálico, quercetina-3-O-glicosídeo e campferol-3-O-glicosídeo na planta determinados por CLAE e RMN. O extrato seco não foi citotóxico, apresentou 4,19% de proteína bruta e alto teor de minerais, tais como Fe (21,65 mg / 100g de extrato seco), Mn (4,38 mg / 100g de extrato seco) e Zn (31,52 mg / 100g de extrato seco). O extrato mostrou atividade antioxidante/sequestradora do radical DPPH, com IC50 de $10,5 \pm 1,01$ µg/mL, e anti-inflamatória (extrato: 50µg/mL) reduzindo de maneira significativa a produção de nitrito em células microgliciais BV2. Diante dos resultados obtidos o extrato seco padronizado de *L. ferrea* apresentou características nutricionais interessantes e potenciais antioxidante e anti-inflamatório, tornado o jucá uma fonte em potencial para um alimento funcional.

Palavras-chave: Alimento funcional, Antioxidantes, *Caesalpinia*, Neuroproteção.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DRIED EXTRACT FROM *Libidibia ferrea* AS A FUNCTIONAL FOOD: CHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES IN A NEUROINFLAMMATION MODEL.

Caesalpinia ferrea, recently reclassified as *Libidibia ferrea* L.P. Queiroz, is a tree belonging to the Fabaceae family, traditionally used in the treatment of diabetes and gastrointestinal disorders. In the present study, the extraction of phenolic compounds obtained from *L. ferrea* leaves was optimized using a factorial design 2³, in which was investigated the effects of the solvent concentration (methanol in water (v/v)), the proportion of *L. ferrea* leaves in solvent (w/v) and homogenization time (min) in ultra-turrax®. The extract with a higher phenol content was freeze-dried and chemically characterized (HPLC and NMR), in addition to the total phenol content and flavonoids content of the lyophilized. It was investigated the nutritional characteristics through the crude protein content and quantification of minerals, antioxidant properties (DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)) and anti-inflammatory potencies, evaluating the effect of the extract on the increased nitrite concentration in LPS-induced microbial culture. The optimization suggested that the extraction with 40% of methanol during 4 minutes of homogenization, using 24% of dry leaves (w/v) had the highest total phenol content (283.7 mgGAE/g). In the freeze-dried extract, the total phenol content (260 mgGAE/g) and total flavonoids (21.1 mgQE / g) were quantified, which are related to the presence of gallic acid, quercetin-3-O-glycoside and campferol-3-O glycoside in the plant determined by HPLC and NMR. The dry extract was non-cytotoxic, presenting 4.19% crude protein and high mineral content, such as Fe (21.65 mg/100 g dry extract), Mn (4.38 mg/100 g dry extract) and Zn (31.52 mg/100g dry extract). The extract showed antioxidative / sequestering activity of the DPPH radical, with an IC₅₀ of 10.5 ± 1.01 µg/mL and anti-inflammatory activity (extract: 50 µg / mL), significantly reducing nitrite production in BV2 microglial cells. In view of the results obtained the standardized dry extract of *L. ferrea* showed interesting nutritional and potential antioxidant and anti-inflammatory characteristics, making the *L. ferrea* a potential source to a functional food.

Keywords: Antioxidants, *Caesalpinia*, Functional food, Neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
v/v	Volume por volume
Min	Minuto
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
RMN	Ressonância magnética nuclear
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
BV2	Linhagem de células microgliais.
Mg	Miligrama
EAG	Equivalentes ácido gálico
EQ	Equivalentes quercetina
mL	Mililitro
g	Gramma
Kg	kilograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro.
IC50	Concentra de inibição de 50%
Kcal	kilocaloria
KJ	Kilojoule
VDR	Valor diário de referência.
IDR	Ingestão diária recomendada.
PNAD	Pesquisa nacional por amostra de domicílio.
CEFAC	Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
<i>et al.</i>	e colaboradores.
ERO	Espécie reativa de oxigênio.
ERN	Espécie reativa de nitrogênio.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
LPS	Lipopolissacarídeo.
IL	Interleucina.
DV	Droga vegetal
Solv	Solvente.
MeOH	Metanol.

rpm	Rotações por minuto.
UV-VIS	Ultravioleta -visível.
nm	Nanometro.
N	Normalidade.
p.e	Ponto de ebulição.
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.
ELFLF	Extrato liofilizado de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> .
ppm	Partes por milhão.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio.
DP	Desvio padrão.
FM50T8	Fração metanólica 50% tempo 8 minutos.
FM50T10	Fração metanólica 50% tempo 10 minutos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Jucá <i>Libidibia ferrea</i> (1- Casca, 2- Árvore, 3- Parte aérea, 4- folhas, 5- vagem, 6A- vagens, 6B- sementes).	24
Figura 02 – Mapa da distribuição geográfica do jucá (<i>Libidibia ferrea</i>) no território nacional.	25
Figura 03 – Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante.	33
Figura 04 – Morfologia e ativação de células microgлияis.	34
Figura 05 – Curva de calibração do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico a 785 nm.	52
Figura 6 – Gráfico de Pareto das variáveis estudadas para otimização do extrato de <i>L. ferrea</i> ...52	52
Figura 07 – Curva de calibração do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico UV-VIS a 785 nm.	54
Figura 08 – Cromatograma e espectros UV-VIS do ELFLF e padrão ácido gálico.....	56
Figura 09 – Perfil cromatográfico da fração metanólica (50%) do ELFLF.	57
Figura 10 – Determinação estrutural da amostra FM50T8 da fração metanólica 50%.....	58
Figura 11 – Estrutura de FM50T8	58
Figura 12 – Determinação estrutural da amostra FM50T10 da fração metanólica 50%.....	59
Figura 13 –Estrutura de FM50T10.	59
Figura 14 – Curva de calibração de quercetina obtida pelo método espectrofotométrico UV-VIS a 415 nm.	60
Figura 15 – Avaliação do potencial antioxidante do ELFLF: ensaio do sequestro do radical DPPH.	62
Figura 16 – Avaliação da viabilidade celular do ELFLF: ensaio do MTT.....	62
Figura 17 – Determinação do potencial anti-inflamatório do ELFLF, utilizando células microgлияis BV2 induzidas por LPS.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Seleção da metodologia extrativa das folhas de <i>Libidibia ferrea</i>	39
Tabela 02– Planejamento fatorial 2^3 , utilizando ponto central em triplicata (negrito), para produção de extrato de <i>Libidibia ferrea</i>	40
Tabela 03 – Condições cromatográficas utilizadas para obtenção do perfil cromatográfico do extrato liofilizado de folhas de <i>Libidibia ferrea</i>	42
Tabela 04 – Proporção de fase móvel utilizada para obtenção do perfil cromatográfico do extrato liofilizado de folhas de <i>Libidibia ferrea</i>	43
Tabela 05 – Condições cromatográficas utilizadas para purificação e coleta de dois picos da fração metanólica 50% do extrato liofilizado de folhas de <i>Libidibia ferrea</i>	43
Tabela 06 – Condições operacionais do ICP OES (configuração axial e radial).	47
Tabela 07 – Estudo preliminar da produção de extrato líquido de folhas de <i>Libidibia ferrea</i>	50
Tabela 08 – Otimização da extração de fenóis nos extratos das folhas de <i>Libidibia ferrea</i>	51
Tabela 09 – Absorvância do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria a 785 nm. ..	51
Tabela 10 – Concentração de fenóis totais do ELFLF obtidos por espectrofotometria UV-VIS a 785 nm.	53
Tabela 11 – Absorvância do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria UV-VIS a 785 nm.....	53
Tabela 12 – Prospecção fitoquímica do ELFLF.....	54
Tabela 13– Valores de absorvância do padrão quercetina obtido por espectrofotometria UV-VIS a 415nm.....	60
Tabela 14 – Valores de absorvância, concentração de flavonoides e percentual do ELFLF obtidos por espectrofotometria UV-VIS a 415nm.	60
Tabela 15 – Porcentagem de proteína bruta em amostra do ELFLF.	61
Tabela 16 – Teor de minerais em amostra de ELFLF.	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Valores diários de referência de nutrientes (VDR) de declaração obrigatória. ...	19
Quadro 02 – Valores de ingestão diária recomendada de nutrientes (IDR) de declaração voluntária - vitaminas e minerais.	20
Quadro 03 – Constituintes químicos de <i>Libidibia ferrea</i>	26
Quadro 04 – Principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).	32

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
1.1.	Segurança alimentar.....	19
1.2.	Produtos naturais como fonte de alimentos funcionais.	21
1.3.	Jucá (<i>Libidibia ferrea</i>) L.P. Queiroz.	23
1.3.1.	<i>Aspectos Geográficos, Botânicos e Etnofarmacológicos</i>	23
1.3.2.	<i>Constituintes químicos</i>	25
1.3.3.	<i>Toxicologia e atividade biológica</i>	30
1.4.	Alimentos: Pró oxidantes, estresse oxidativo e antioxidantes.....	31
1.5.	Neuroinflamação.....	33
2.	JUSTIFICATIVA.	36
3.	OBJETIVOS.	37
3.1.	Objetivo Geral:	37
3.2.	Objetivos Específicos:	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1.	Materiais.	38
4.1.1.	<i>Material Vegetal</i>	38
4.1.2.	<i>Material biológico</i>	38
4.1.3.	<i>Drogas reagentes e substâncias químicas de referência</i>	38
4.2.	Desenvolvimento e preparo do extrato de <i>Libidibia ferrea</i>	38
4.2.1.	<i>Determinação de sólidos totais</i>	40
4.3.	Fenóis totais dos extratos produzidos utilizando planejamento fatorial 2 ³	41
4.3.1.	<i>Preparo da solução padrão de ácido gálico</i>	41
4.3.2.	<i>Construção da curva de calibração</i>	41
4.4.	Escolha e preparo do extrato seco de <i>Libidibia ferrea</i>	41
4.5.	Caracterização do extrato seco de <i>Libidibia ferrea</i>	42
4.5.1.	<i>Prospecção fitoquímica do extrato seco de Libidibia ferrea</i>	42

4.5.2.	<i>Perfil cromatográfico do extrato seco das folhas de Libidibia ferrea por CLAE.</i>	42
4.5.3.	<i>Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹ H) ...</i>	44
4.6.	Teor de flavonoides.	44
4.6.1.	<i>Preparação da solução padrão de quercetina.</i>	45
4.6.2.	<i>Construção da curva de calibração.</i>	45
4.7.	Análise nutricional.	45
4.7.1.	<i>Avaliação do teor de proteína bruta.</i>	45
4.8.	<i>Avaliação da atividade antioxidante do extrato seco das folhas de L. ferrea: teste do sequestro do radical DPPH.</i>	47
4.9.	<i>Avaliação pré-clínica do extrato aquoso liofilizado de Libidibia ferrea.</i>	48
4.9.1.	<i>Avaliação da citotoxicidade (MTT).</i>	48
4.9.2.	<i>Determinação da atividade anti-inflamatória: determinação de nitrito.</i>	48
4.10.	Análise estatística.	49
5.	RESULTADOS.	50
5.1.	Desenvolvimento do extrato de <i>L. ferrea</i>	50
5.1.3	<i>Fenóis totais do extrato seco de Libidibia ferrea.</i>	53
5.2.	Material liofilizado.	53
5.2.1.	<i>Prospecção fitoquímica do extrato seco de Libidibia ferrea.</i>	54
5.2.2.	<i>Perfil cromatográfico do ELFLF por CLAE.</i>	55
5.2.3.	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN) das frações metanólicas do extrato de Libidibia ferrea.</i>	57
5.2.4.	<i>Flavonoides do extrato seco de Libidibia ferrea.</i>	60
5.2.5.	<i>Avaliação do teor de proteína bruta no extrato seco de Libidibia ferrea.</i>	61
5.2.6.	<i>Avaliação da capacidade antioxidante do extrato seco de Libidibia ferrea: teste do DPPH (Atividade sequestradora de radicais livres).</i>	61
5.2.7.	<i>Avaliação da citotoxicidade do extrato seco de Libidibia ferrea: Teste do MTT.</i>	62
5.2.8.	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato seco de Libidibia ferrea: determinação de nitrito.</i>	63

6.	DISCUSSÃO.....	64
7.	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Segurança alimentar.

Segurança alimentar e nutricional é a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, que atendam às suas necessidades nutricionais, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais. (FAO, 1996; BRASIL, 2006).

Após uma trajetória de queda que durou mais de dez anos, a insegurança alimentar em todo o mundo parece estar aumentando, afetando atualmente cerca de 11% da população mundial (FAO, 2017).

Para ser considerada de qualidade e saudável, a alimentação deve ser apropriada aos aspectos biológicos e socioculturais dos indivíduos, bem como ao uso sustentável do meio ambiente, devendo estar em acordo com as necessidades de cada fase do curso da vida, estando baseada no consumo adequado de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos) e micronutrientes (vitaminas e minerais), indispensáveis ao funcionamento metabólico (BRASIL, 2013).

A necessidade de energia de cada pessoa varia com sexo, idade, peso, altura, e a realização de atividades físicas (seja no dia a dia, no trabalho, ou com a prática de exercícios físicos). Pela legislação brasileira as recomendações de energia e nutrientes apresentadas nos rótulos dos alimentos têm como referência 8.400 kJ ou 2000 kcal/dia. Isso geralmente é indicado para uma pessoa de tamanho mediano, com atividade física baixa, no caso de homens, e atividade moderada, no caso de mulheres. Nessas condições, é necessário ingerir diariamente, por exemplo: 75 g de proteínas, 300 g de carboidratos, 600 µg de vitamina A e 1000 mg de cálcio, como apresentado nos Quadros 1 e 2 (BRASIL, 2003).

Quadro 01 – Valores diários de referência de nutrientes (VDR) de declaração obrigatória.

VALOR ENERGÉTICO	2000 KCAL - 8400KJ
Carboidratos	300 gramas
Proteínas	75 gramas
Gorduras totais	55 gramas
Gorduras saturadas	22 gramas
Fibra alimentar	25 gramas
Sódio	2400 miligramas

Fonte: ANVISA, RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003.

Quadro 02 – Valores de ingestão diária recomendada de nutrientes (IDR) de declaração voluntária - vitaminas e minerais.

VALOR ENERGÉTICO	2000 KCAL - 8400KJ
Vitamina A	600 µg
Vitamina D	5 µg
Vitamina C	45 mg
Vitamina E	10 mg
Tiamina	1,2 mg
Riboflavina	1,3 mg
Niacina	16 mg
Vitamina B6	1,3 mg
Ácido fólico	400 µg
Vitamina B12	2,4 µg
Ácido pantotênico	5 mg
Cálcio	1000 mg
Ferro	14 mg
Magnésio	260 mg
Zinco	7 mg
Iodo	130 µg
Vitamina K	65 µg
Fósforo	700 mg
Flúor	4 mg
Cobre	900 µg
Selênio	34 µg
Cromo	35 µg
Manganês	2,3 mg

Fonte: ANVISA, RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003.

No Brasil, no ano de 2013, segundo dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), 7,2 milhões de pessoas passavam fome. A região Nordeste apresentava os índices de insegurança alimentar mais alarmantes entre todas as regiões do país. Segundo a pesquisa, 38,1% dos domicílios dessa região apresentavam insegurança alimentar. (BRASIL, 2013).

Apesar dos problemas relacionados a seca e falta de alimentos, grande parte da região nordeste encontra-se em um bioma (caatinga) que apresenta grande riqueza natural. Esses recursos naturais poderiam ser fonte de subsistência e aproveitamento como alimento, podendo ainda fornecer algum benefício funcional.

Nesse contexto, o nosso grupo de pesquisa (Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos – CEFAC- UFC) vem buscando estudar produtos naturais do bioma caatinga, a fim de utilizá-las como alternativa alimentar com propriedade funcional.

1.2. Produtos naturais como fonte de alimentos funcionais.

Desde o início do século XXI nossa sociedade vem testemunhando um aumento contínuo da expectativa de vida e através disso há uma maior atenção nos cuidados, na prevenção e nos tratamentos de doenças relacionadas ao processo de envelhecimento. A população mundial está optando por mudanças no estilo de vida e pelo consumo alimentar mais saudável (SZAKÁLY *et al.*, 2012). Melhorar os hábitos alimentares pode evitar uma série de doenças relacionadas ao envelhecimento, esta ideia não significa apenas uma melhor nutrição; inclui um conceito, criado no Japão, de consumir alimentos com componentes especiais para promoção da saúde (SUITOR; MURPHY, 2013).

Na década de 1980, pesquisas apoiadas pelo governo japonês em parceria com pesquisadores dos campos das ciências alimentares, nutricionais, farmacêuticas e médicas mostraram as potencialidades de alguns alimentos, não apenas de nutrição, mas também de influenciarem nas funções fisiológicas humanas (TANEMURA; HAMADATE; URUSHIHARA, 2017). Os resultados desse projeto levaram à criação da primeira política mundial para legalização da comercialização de alimentos com funções específicas de promoção da saúde. Estes alimentos foram denominados de “*Foods for Specified Health Use*”, abreviados como FOSHU e definidos como “alimentos que exercem um impacto positivo na saúde, performance física ou estado mental de um indivíduo, em adição ao seu valor nutritivo” (SHIMIZU, 2014; DÖRR *et al.*, 2012). O conceito “alimento funcional”, introduzido na revista *Nature* em 1993, hoje é mais utilizado internacionalmente para caracterizar esses tipos de alimentos (SWINBANKS; O'BRIEN, 1993).

Um alimento funcional deve exercer um efeito melhorador ou regulador de algum processo fisiológico ou atuar na prevenção de alguma patologia, devendo ainda ser consumido como integrante de uma dieta normal (DÖRR *et al.*, 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador do registro e comercialização de alimentos funcionais, disponibiliza três resoluções que direta ou indiretamente dizem respeito as regulamentações de alimentos funcionais (Resoluções 17, 18 e 19) (BRASIL, 1999). As substâncias bioativas e

probióticos isolados são regulamentadas pela RDC 2 (2002), e as avaliações das propriedades funcionais são tratadas nas petições 4009, 406 e 403, que estão em análise na ANVISA.

A Resolução 17 aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos. As alegações de propriedade funcional e as alegações de propriedade de saúde são regulamentadas pela Resolução n° 18, que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação dessas alegações, e pela Resolução n° 19, são determinados os procedimentos para registro de alimentos com tais alegações (BRASIL, 1999).

A regulamentação dessas alegações tem como objetivo garantir que as informações sobre as propriedades e os benefícios dos alimentos e seus constituintes sejam fundamentadas em evidências científicas adequadas e sejam realizadas em um contexto que contribua para uma alimentação mais equilibrada e saudável, evitando o uso dessas informações com foco apenas em questões comerciais (BRASIL, 2013).

Diversas pesquisas de mercado apontam uma maior preocupação dos brasileiros em utilizar alimentos saudáveis. Uma das mais recentes, realizada pelo instituto internacional Euromonitor, revelou que os alimentos funcionais movimentaram US\$ 8,7 bilhões de dólares no Brasil em 2014, apresentando ainda expectativa de crescimento estimado em torno de 12% até 2019 (EUROMONITOR, 2015; MARTINS, 2015).

O cuidado cada vez maior com a qualidade de vida e o interesse por novas possibilidades que agreguem aos alimentos outras funcionalidades, além da nutrição, são temas de destaque na comunidade científica. Acrescentando-se a isso o apelo em relação ao uso sustentável dos recursos naturais fazem com que as recentes pesquisas tratem esses temas como alvos de grande interesse (CORDELL, 2015).

O uso tradicional de plantas medicinais é muito difundido no Brasil. Estima-se que cerca de 60 mil espécies vegetais sejam oriundas dos diversos biomas brasileiros: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Segundo a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil possui de 15 a 20% de toda a biodiversidade do planeta, sendo considerado, em nível mundial, o maior em número de espécies endêmicas (BARREIRO; BOLZANI, 2009; UNEP/WCMC, 2016).

São muitos os exemplos de produtos naturais que apresentam algum benefício terapêutico além de nutrir. Heleno *et al.* (2015), em estudo utilizando cogumelos comestíveis das espécies *Volvopluteus gloiocephalus* e *Clitocybe subconnexa*, observaram que as mesmas provaram ser fonte de nutrientes, minerais e de moléculas bioativas, como os ácidos fenólicos.

Outros produtos como o mel, aparecem em pesquisas recentes associando alguns de seus componentes como fenóis e flavonoides a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e auxiliar no tratamento de certos tipos de cânceres (BADOLATO *et al.*, 2017; OSÉS *et al.*, 2016).

Em relação ao uso de plantas como fonte alimentar nutricional, o chá verde, obtido das folhas de *Camellia sinensis* é um dos produtos naturais que mais se destaca nas pesquisas e no mercado de alimentos com potencial funcional, isso principalmente pelo elevado teor (em torno de 30%) de substâncias fenólicas, conferindo propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. Além disso, o extrato de chá verde é utilizado na formulação de grande variedade de produtos alimentares, incluindo: pães (WANG; ZHOU; ISABELLE, 2007), biscoitos, maçã desidratada (LAVELLI *et al.*, 2010) e vários produtos à base de carne (MITSUMOTO *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2001). Estudo recente (PINTO *et al.*, 2015) realizado por nosso grupo (CEFAC), mostrou o efeito neuroprotetor do extrato seco do chá verde em modelo experimental da doença de Parkinson, relacionado principalmente ao seu efeito antioxidante e anti-inflamatório. Pelo menos parte desse efeito está relacionado a presença de polifenóis, como catequina e epigallocatequina, na planta.

Na região Nordeste do Brasil, mais especificamente no estado do Ceará, destacam-se pesquisas relevantes utilizando produtos naturais oriundos da região, com o aproveitamento de seus recursos. Dentre as espécies investigadas podemos relacionar a *Amburana cearensis* cultivada, que tem mostrado características bromatológicas promissoras para um produto de interesse nutricional humano (LIMA *et al.*, 2012; LEAL *et al.*, 2011). Além de outras espécies como o jucá (*Libidibia ferrea*).

1.3. Jucá (*Libidibia ferrea*) L.P. Queiroz.

1.3.1. Aspectos Geográficos, Botânicos e Etnofarmacológicos

Possuindo distribuição cosmopolita, à família *Fabaceae* ou *Leguminosae*, inclui cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18 mil espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas e também uma das principais no ponto de vista econômico. No Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies. Tem como característica a presença de frutos em forma de vagem (embora haja exceções) e engloba desde espécies arbóreas até espécies herbáceas (EMBRAPA, 2017).

O jucá, *Caesalpinia ferrea*, recentemente reclassificada como *Libidibia ferrea* L.P. Queiroz (Figura 1), é conhecido popularmente como pau ferro e jucaína. Árvore nativa do

Brasil, madeira muito resistente, tem o tronco característico, liso e branco com manchas. Pode atingir de 10-15 metros de altura, seus frutos são vagens achatadas de casca dura marrom-escura, suas folhas são bipinadas, com inflorescência paniculada e legume indeiscente. A espécie ocorre naturalmente no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Figura 2) (LORENZI, 2002; LEWIS 2012). Pode ser encontrada em quase todo o Ceará, sendo mais frequente na Serra do Araripe, Serra do Apodi, parte leste, oeste e sul do estado (MAIA, 2004).

Figura 01 – Jucá *Libidibia ferrea* (1- Casca, 2- Árvore, 3- Parte aérea, 4- folhas, 5- vagem, 6A- vagens, 6B- sementes).

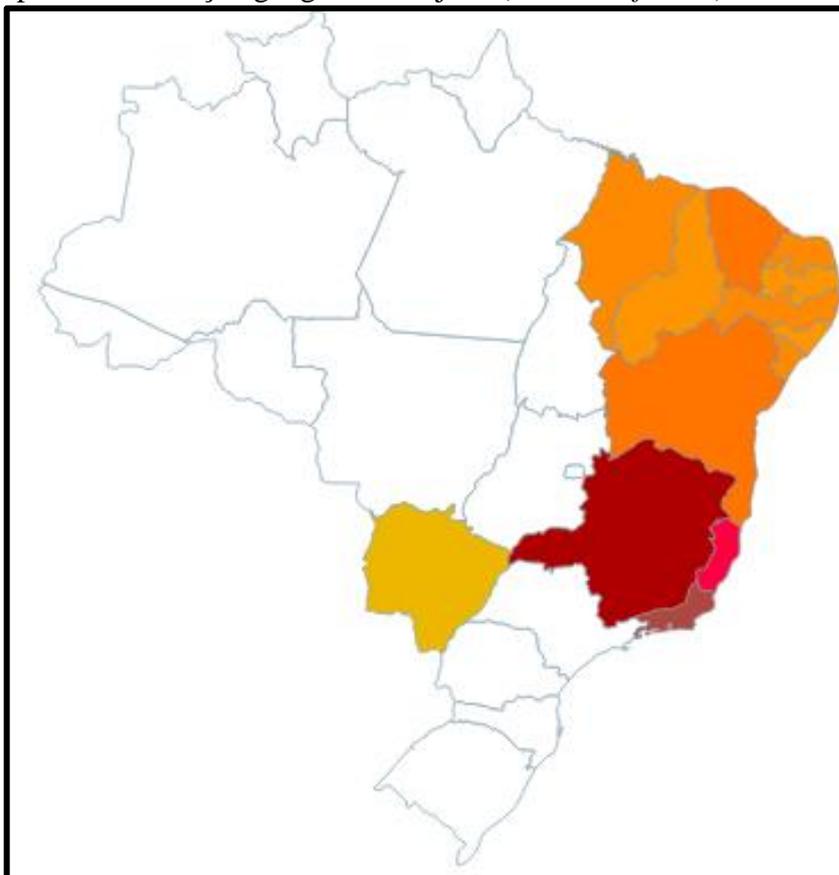


Fonte: PAULO AIRES, 2014.

O jucá apresenta valor energético de 1000 kJ/100g de farinhas obtida da semente, $42.7 \pm 1.6\%$ de proteínas e $1.8 \pm 0.2\%$ de lipídeos. Apresenta ainda valores elevados de aminoácidos essenciais e não essenciais como Treonina (318 mg/g) e Arginina (1190 mg/g) e minerais como potássio (1351 mg/100g), sódio (9,2 mg/100g) e cálcio (268 mg/100g) (CARVALHO *et al.*, 2011). As folhas possuem concentrações superiores de minerais como: ferro e manganês quando comparados aos de outras plantas medicinais como capim-santo, cidreira, colônia e malvariço, por exemplo (SILVA *et al.*, 2010).

As partes constituintes desta árvore vêm sendo utilizadas na medicina popular para o tratamento de problemas hepáticos, respiratórios, distúrbios gastrintestinais e como cicatrizante. Experimentos utilizando animais indicaram atividades analgésica, anti-inflamatória e antiúlcera para extratos dos frutos e caule da planta (BACCHI; SERTIÉ, 1994; CARVALHO *et al.*, 1996).

Figura 02 – Mapa da distribuição geográfica do jucá (*Libidibia ferrea*) no território nacional.



Fonte: LEWIS, G.P. 2012. *Libidibia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Pesquisas indicam que as propriedades terapêuticas descritas para *L. ferrea* incluem ainda o uso da entrecasca para o tratamento de feridas, contusões, combate à asma e à tosse crônica (BRAGA, 1976).

Os frutos são antidiarréicos, anticatarrais e as raízes são antitérmicas (MAIA, 2004). Bacchi e Sertie (1994) descreveram o efeito da *L. ferrea* contra úlceras gástricas. Foram relatadas ainda atividades anti-inflamatória e analgésica por Thomas *et al.* (1988) e Carvalho *et al.* (1996).

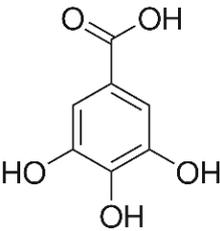
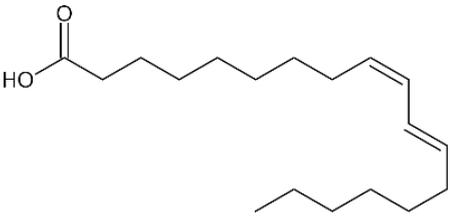
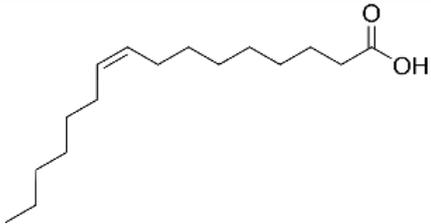
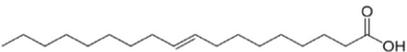
1.3.2. Constituintes químicos.

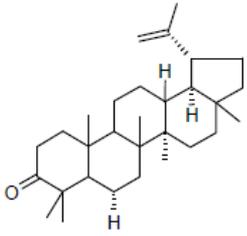
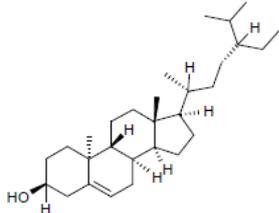
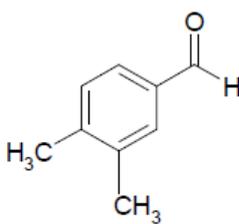
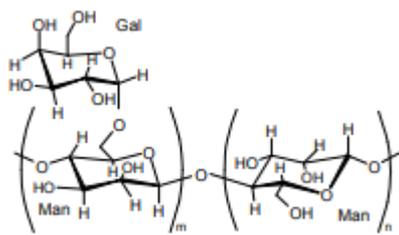
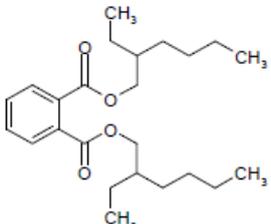
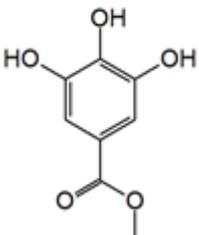
O jucá apresenta rica bioprodução de compostos secundários (Quadro 3). Destacam-se as quantidades de compostos fenólicos presentes em todas as estruturas da planta

como: taninos condensados, hidrolisados e chalconas. Estudos fitoquímicos utilizando as cascas revelaram a presença de cumarinas, flavonoides, saponinas, esteroides e taninos (GONZALEZ *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2011).

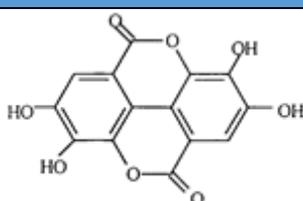
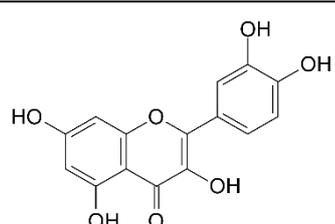
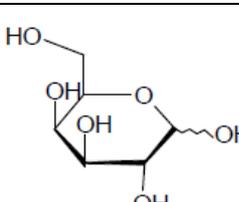
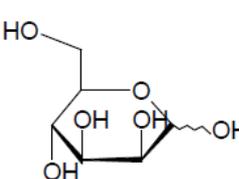
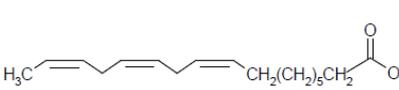
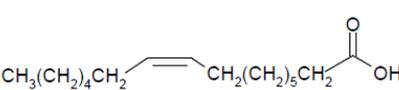
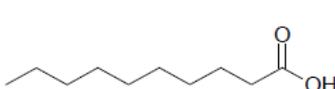
Dias *et al.* (2013), identificaram ácidos graxos nos frutos após extração por fluido supercrítico usando CO₂. Análises por cromatografia gasosa revelaram que os frutos são compostos por ácidos graxos saturados e insaturados bem como por terpenóides. Foram identificados também ácido linoleico, ácido palmítico, ácido elágico, gama-sitosterol, ácido esteárico e lupenona.

Quadro 03 – Constituintes químicos de *Libidibia ferrea*.

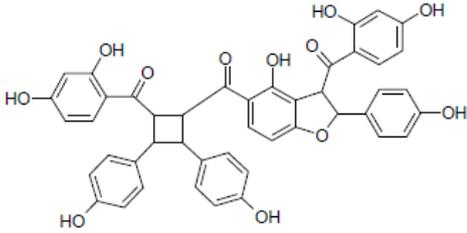
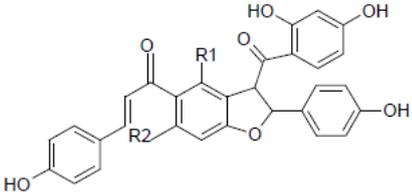
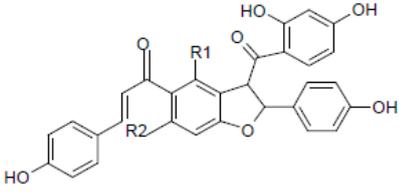
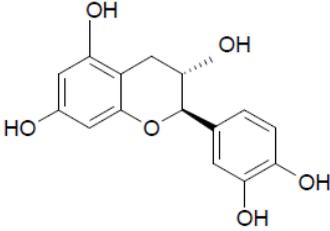
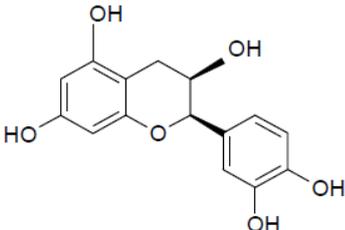
COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIA
Ácido gálico		Fruto, Folhas, Casca	Nakamura <i>et al.</i> , 2002; Vasconcelos <i>et al.</i> , 2011; Silva <i>et al.</i> , 2013; Silva <i>et al.</i> , 2014; Port's <i>et al.</i> , 2013; Araújo <i>et al.</i> , 2014.
Ácido linoléico		Fruto; Semente	Dias <i>et al.</i> , 2013; Sawada <i>et al.</i> , 2014.
Ácido palmítico		Fruto; Semente	Dias <i>et al.</i> , 2013; Sawada <i>et al.</i> , 2014.
Ácido esteárico		Fruto; Semente	Dias <i>et al.</i> , 2013; Sawada <i>et al.</i> , 2014
Ácido eláidico		Fruto	Dias <i>et al.</i> , 2013.

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIA
Lupenona		Fruto	Dias <i>et al.</i> , 2013.
Gama-sitosterol		Fruto	Dias <i>et al.</i> , 2013.
3,4-dimetilbenzaldeído		Fruto	Dias <i>et al.</i> , 2013.
Galactomana		Fruto Semente	Souza <i>et al.</i> , 2010; Cunha, A. P. 2015.
Di-2-etilhexilfitalato		Fruto	Dias <i>et al.</i> , 2013.
Metilgalato		Fruto	Nakamura <i>et al.</i> , 2002; Silva <i>et al.</i> , 2013.

Continuação.

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIA
Ácido elágico		Fruto, Casca	Ueda <i>et al.</i> , 2002; 2004; Vasconcelos <i>et al.</i> , 2011.
Quercetina		Folha	Port's <i>et al.</i> , 2013.
D-galactose		Semente	Lopes <i>et al.</i> , 2013.
D-manose		Semente	Lopes <i>et al.</i> , 2013.
Ácido linolênico		Semente	Sawada <i>et al.</i> , 2014.
Ácido palmitolênico		Semente	Sawada <i>et al.</i> , 2014.
Ácido cáprico		Semente	Sawada <i>et al.</i> , 2014.

Continuação.

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIA
Paufferol A		Casca e Entrecasca	Nozaki <i>et al.</i> , 2007.
Paufferol B	 <p style="text-align: center;">$R_1 = OH \quad R_2 = H$</p>	Casca e Entrecasca	Ohira <i>et al.</i> , 2013.
Paufferol C	 <p style="text-align: center;">$R_1 = H \quad R_2 = OH$</p>	Casca e Entrecasca	Ohira <i>et al.</i> , 2013.
Catequina		Casca e Entrecasca	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2011; Araújo <i>et al.</i> , 2014.
Epicatequina		Casca e Entrecasca	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2011.

Fonte: Adaptado de Ferreira e Soares (2015).

1.3.3. Toxicologia e atividade biológica.

Estudos sobre a toxicidade de produtos naturais são fundamentais. Bacchi *et al.* (1995) estudou os efeitos da administração oral do extrato de *L. ferrea* em ratos, o autor observou que os animais não apresentaram alteração significativa no consumo de água ou alimentos e nem modificação no peso corporal durante 30 dias de experimento. Os animais também não apresentaram sintomas de diarreia, piloereção, convulsões e sonolência. A inspeção macroscópica não indicou alterações no fígado, baço, rins e pulmões. Os pesos dos órgãos e pesos relativos não mostraram qualquer desvio significativo da normalidade.

Pesquisa sustentada por Freitas *et al.* (2012) em estudo sobre a atividade biológica das vagens do jucá utilizou ratos para avaliar a dose oral tóxica. Os pesquisadores observaram que nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg os extratos não induziram perda de peso de camundongos ou morte de qualquer extrato ou fração. A investigação sugeriu que o extrato aquoso das vagens de *L. ferrea* não apresentou toxicidade por via oral em camundongos.

Em relação a toxicidade neonatal, Peters *et al.*, (2008), avaliou a toxicidade reprodutiva de extratos aquosos de frutos de *L. ferrea* em ratos fêmeas. Observou-se que a dose administrada (300 mg/kg de peso corporal) no modelo experimental utilizado, não foi tóxica para a mãe e nem interferiu na implantação do blastocisto.

A maioria dos estudos farmacológicos realizados com *L. ferrea* são baseados na cultura popular. O chá da casca do caule e das folhas de *L. ferrea* tem sido usado para o tratamento do diabetes (VASCONCELOS *et al.*, 2011; HASSAN *et al.*, 2015). Em vista dessa importância etnomedicinal, o Ministério da Saúde incluiu esta espécie na lista nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009).

Braga (1976), na terceira edição do livro "Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará", relatou várias propriedades terapêuticas atribuídas ao jucá, incluindo: o tratamento e alívio da asma, de contusões, tosse crônica e feridas. Os frutos do jucá apresentaram atividade antimicrobiana em modelos utilizando *Streptococcus* sp., *Candida albicans* and *Lactobacillus casei*, sendo justificada pela alta concentração de substâncias polifenólicas (TRENTIN *et al.*, 2011).

Alguns experimentos em animais mostraram que o fruto e a casca apresentam potencial analgésico, anti-inflamatório e antiúlcera (BACCHI; SERTIÉ, 1994; CARVALHO *et al.*, 1996). Nakamura *et al.* (2002) em pesquisas *in vitro* utilizando os frutos de *L. ferrea*, mostraram que os mesmos apresentavam propriedades quimiopreventivas para o câncer,

estando essa propriedade possivelmente relacionada a presença de compostos como ácido gálico e metilgalato.

Mais recentemente vários estudos vêm mostrando o potencial antioxidante do jucá. Port's *et al.* (2013), através de ensaios de sequestro do radical DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linoleico, utilizando espécies vegetais oriundas da Amazônia, dentre elas o jucá, demonstraram alta capacidade antioxidante, corroborando com resultados de Hassan *et al.* (2015), que avaliaram a atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de *L. ferrea*, alcançando notável atividade de eliminação de radicais no ensaio de DPPH, quantitativamente comparável ao ácido ascórbico.

1.4. Alimentos: Pró oxidantes, estresse oxidativo e antioxidantes.

Radicais livres são espécies químicas reativas, com existência independente, que possuem um elétron não emparelhado na última camada eletrônica. Essa configuração faz dessas espécies, moléculas altamente instáveis, de meia vida curta e muito reativas quimicamente (LICHTENBERG; PINCHUK, 2015).

A participação dos radicais livres é indispensável para muitas funções fisiológicas, atuando em processos aeróbicos, como na respiração celular; durante a fagocitose celular, na exposição microbiana e na atividade física intensa, por exemplo (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Contudo, seu excesso pode causar o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/ERN) (Quadro 4) e a capacidade do organismo de combater a ação desses radicais através de mecanismos endógenos e exógenos de proteção antioxidante (Figura 3) (PISOSCHI; POP, 2015).

Quadro 04 – Principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).

ERO	Estrutura química
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$
Radical hidroxila	HO^{\cdot}
Radical hidroperoxil	HO_2^{\cdot}
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2
Oxigênio singleto	1O_2
ERN	Estrutura química
Óxido nítrico	NO^{\cdot}
Óxido nitroso	N_2O_3
Nitritos	$NO_2^{\cdot -}$
Nitratos	$NO_3^{\cdot -}$
Peroxinitritos	$ONOO$

Fonte: Bhattacharyya *et al.*, 2014.

Dessa forma, o dano induzido pelos radicais livres no estresse oxidativo provoca alterações em componentes celulares importantes como: lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; KOHEN; NYSKA, 2002). Estando direta ou indiretamente relacionados a fisiopatologia de várias doenças crônicas, como: Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, enfisema, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, cataratas e câncer, por exemplo (LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2013; TODA, 2011).

A primeira linha de defesa, os antioxidantes preventivos, atuam evitando a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), através de mecanismos como quelação de metais cofatores para a oxidação. Os antioxidantes de limpeza removem os radicais livres antes que estes ataquem estruturas importantes, mecanismo comum nos antioxidantes de origem alimentar. Os antioxidantes reparadores atuam na reparação dos danos causados, neutralizando resíduos e auxiliando na recuperação das funções, como as enzimas de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos (DNA glicosilases e endonucleases) (NIKI, 2010).

As fontes exógenas de antioxidantes estão presentes em grande parte dos alimentos. Destacam-se as vitaminas (C, E), os carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, licopeno) e os polifenóis (flavonoides, flavonas, isoflavonas, antocianos) (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

Figura 03 – Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante.



Fonte: Adaptado de PISOSCHI; POP, 2015.

1.5. Neuroinflamação.

O envelhecimento é um fenômeno biológico natural e normal a todos os seres vivos. No corpo humano, estima-se que a divisão celular e o metabolismo ocorram de forma mais abundante, até os 25 anos de idade. Além dessa idade, os produtos de metabolismo e o dano celular se acumulam e os fenótipos de envelhecimento aparecem, causando doenças. Entre estas doenças relacionadas a idade, as doenças neurodegenerativas têm despertado muita atenção devido à sua irreversibilidade, falta de tratamento eficaz e adversidades sociais e econômicas (HUNG *et al.*, 2010).

Atualmente, as doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e a doença de Huntington afetam dezenas de milhões de pessoas em todo o mundo e infelizmente à medida que a população mundial envelhece a incidência de muitas dessas doenças continua a aumentar, esperando-se mais do que o dobro até 2050 (MARSH; BLURTON-JONES, 2017).

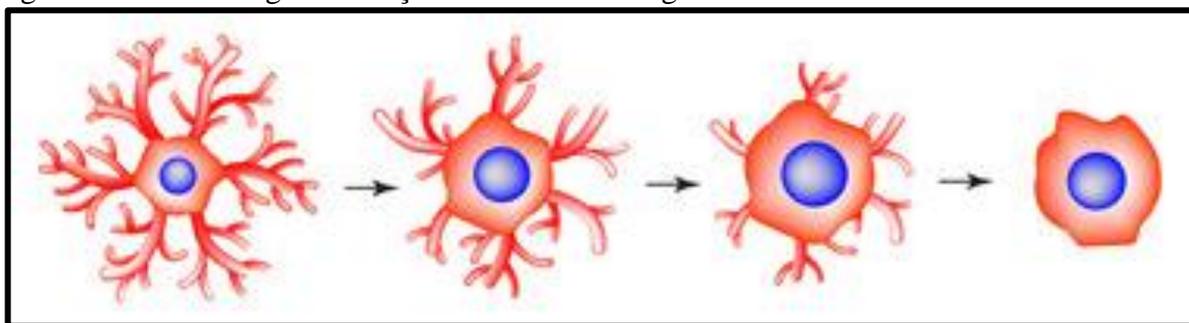
Alguns mecanismos fisiopatológicos já descritos na literatura relacionam as doenças neurodegenerativas às disfunções mitocondriais e a produção excessiva de radicais livres, resultando em estresse oxidativo (LIN; BEAL, 2006). Ao longo dos últimos anos a neuroinflamação crônica emergiu como um novo mecanismo patológico comum que demonstra impulsionar a progressão da neurodegeneração (HENEKA *et al.*, 2015; WANG; LIU; ZHOU, 2015). A neuroinflamação persistente já foi documentada em grande parte das doenças

neurodegenerativas progressivas, incluindo: Alzheimer, Doença de Parkinson e Doença de Huntington (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; MINGHETTI, 2005; LIU; GAO; HONG, 2003).

Neuroinflamação é a resposta inflamatória no sistema nervoso central diante de várias lesões neuronais. As principais células envolvidas na neuroinflamação são micróglia, astrócitos e neurônios (LEE; SUK, 2017). Os neurônios contribuem para a neuroinflamação fornecendo neuropeptídeos, neurotransmissores e proteínas de superfície celular, além de modular a micróglia e astrócito. Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no cérebro humano adulto, são ativados após traumas e lesões neurodegenerativas, liberando uma série de citocinas inflamatórias e quimiocinas que contribuem para a neuroinflamação. Contudo, as micróglia são os componentes celulares neuronais mais comumente relacionados a neuroinflamação (LIDDELOW *et al.*, 2017).

A micróglia é uma célula primária imunocompetente do SNC que foi descrita pela primeira vez em 1920 por Rio Hortega, o qual identificou propriedade fagocítica e sugeriu que essas células poderiam atuar de forma parecida com macrófagos periféricos (SAIJO; GLASS, 2011). Sob condições fisiológicas normais, a micróglia é ramificada com múltiplos ramos e prolongamentos, ao expandir e retrair continuamente esses prolongamentos, a micróglia interage com neurônios, astrócitos e vasos sanguíneos e monitora constantemente o SNC e sinapses para a presença de lesões teciduais e infecções por patógenos. No entanto, dependendo dos estímulos recebidos, torna-se ativada e sofre mudanças morfológicas distintas, passando de uma forma ramificada para uma forma ameboide redonda com prolongamentos encurtados e atividade fagocítica ativa (Figura 4) (LIDDELOW *et al.*, 2017).

Figura 04 – Morfologia e ativação de células microgliais.



Fonte: <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-activation-microglia-neuron-nerve-cell-infographics-vector-illustration-background-image90174529>.

As alterações morfológicas sofridas pelas micróglia resultam em um fenótipo pró-inflamatório "clássico" chamado M1 ou em um fenótipo anti-inflamatório "alternativo", conhecido como M2. O fenótipo M1 pode ser induzido por vários estímulos, tais como padrões

moleculares associados a patógenos (PAMPS, lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, ATP, DNA, agregados de proteína, como peptídeos amiloides-beta, alfa-sinucleína e citocinas (fator de necrose tumoral [TNF] e interferon-gama [IFN- γ]), levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico (NO), quimiocinas e espécies reativas de oxigênio / nitrogênio (EROS / ERNS) que são geralmente de natureza neurotóxica. No entanto, os glicocorticóides e certas citocinas, incluindo interleucinas (IL-4 e IL-10), e o fator de crescimento transformador (TGF- β) podem induzir o fenótipo M2, levando à produção de várias citocinas anti-inflamatórias. Foi relatado que o equilíbrio entre os fenótipos M1 e M2 tem impacto na neuroinflamação e nos mecanismos regenerativos e reparadores. Um desequilíbrio nas populações M1 / M2, com predominância do fenótipo M1, tem sido frequentemente observado em muitas doenças neurodegenerativas em estágios tardios (BOLÓS; PEREA; AVILA, 2017; JHA; LEE; SUK, 2016).

As evidências sugerem que a neuroinflamação crônica é uma manifestação patológica de ocorrência em grande parte das doenças neurodegenerativas. Portanto, pode-se inferir que a neuroinflamação derivada de células neurais, mais especificamente micróglia, poderia ser um alvo terapêutico atraente para o estudo de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

2. JUSTIFICATIVA.

Atualmente, a consciência relativa à biodiversidade de alimentos existentes vem ampliando o enfoque das tabelas e bancos de dados de composição química de alimentos. A obtenção de dados referentes à composição de alimentos brasileiros tem sido estimulada com o objetivo de reunir informações atualizadas, confiáveis e adequadas à realidade nacional (LAJOLO, 1995). Aliado a isso, estudos epidemiológicos vêm sugerindo que vitaminas e minerais antioxidantes assim como metabólitos secundários dos vegetais podem desempenhar papel importante na prevenção de doenças crônico-degenerativas. (CHEN, 2002).

A Universidade Federal do Ceará, particularmente os laboratórios de Farmacognosia e de Bromatologia têm se dedicado a pesquisa interdisciplinar de plantas da flora nordestina, caracterizando-as do ponto de vista químico, bromatológico e farmacológico. Nesse sentido, dentre as espécies investigadas podemos relacionar a *Amburana cearensis* (cumaru) e *L. ferrea* (LEAL *et al.*, 2000; 2003; 2006; CANUTO *et al.*, 2006; 2007; CHAGAS NETO, 2015).

L. ferrea L.P. Queiroz (Fabaceae), conhecida popularmente como jucá, é uma árvore presente na caatinga e utilizada tradicionalmente no tratamento de asma e úlceras gástricas (BRAGA, 1976; BACCHI; SERTIÉ, 1994). Estudos químicos mostraram a presença de flavonoides e ácidos fenólicos nos extratos das folhas dessa árvore (PORT'S *et al.*, 2013; SILVA *et al.* 2014). Pesquisas anteriores realizadas pelo nosso grupo de pesquisa permitiram a caracterização bromatológica preliminar do extrato hidroalcoólico das folhas, apresentando teor de nitrato, um composto antinutricional, igual a 10,89 $\mu\text{g NO}_3^-/100\text{g}$ de droga vegetal, valor dentro do aceitável (370 $\mu\text{g NO}_3^-/100\text{g}$) segundo a FAO (2003) além da determinação do potencial antioxidante/ação sequestradora do radical DPPH destes extratos (CHAGAS NETO, 2015).

Observando a atividade antioxidante das folhas de jucá e sabendo da correlação dessa com a capacidade anti-inflamatória, pode-se propor a avaliação do potencial anti-inflamatório do jucá utilizando modelo celular de células microgлияis (LIN; BEAL, 2006).

Diante do exposto, é oportuno prosseguir os estudos com *L. ferrea*, visando o aproveitamento das folhas dessa espécie no desenvolvimento de um extrato seco padronizado com propriedades nutricionais e biológicas que possam qualificá-lo no futuro como alimento funcional.

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo Geral:

Desenvolver o extrato padronizado das folhas de jucá (*Libidibia ferrea*) e avaliar seu potencial nutricional e anti-inflamatório com auxílio de modelos químicos e biológicos - cultura de micróglia.

3.2. Objetivos Específicos:

- Desenvolver um extrato de folhas de *L. ferrea* através de planejamento experimental (2³), empregando como resposta o teor de fenóis totais;
- Determinar o teor de flavonoides no extrato liofilizado de *L. ferrea*;
- Investigar o perfil cromatográfico do extrato e determinar o teor de metabólitos secundários no extrato liofilizado da planta;
- Avaliar a ação sequestradora de radicais livres;
- Investigar o potencial nutricional do extrato de *L. ferrea*;
- Avaliar a toxicidade e o potencial anti-inflamatório em cultura celular neuronal (micróglia, linhagem BV2).

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1. Materiais.

4.1.1. Material Vegetal.

As folhas de *Libidibia ferrea* L.P. Queiroz foram coletadas em março de 2017 no horto de plantas medicinais localizado na Av. do Contorno, s/n. Campus do Pici – Fortaleza (3 ° 44'45.9 "S 38 ° 34'39.1" W), no município de Fortaleza, Ceará. A exsicata da espécie (n° 58169) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará. O material vegetal foi previamente seco em estufa com circulação de ar, a umidade das folhas se mantiveram entre 8-14%. O material foi pulverizado em moinho de facas e tamisado. O pó moderadamente grosso foi escolhido para a preparação do extrato (BRASIL, 2010).

4.1.2. Material biológico.

Utilizou-se linhagem de células microgliais do tipo BV2 do cérebro de ratos, transformados por retrovírus. Obtido do banco de células do Rio de Janeiro.

4.1.3. Drogas reagentes e substâncias químicas de referência.

Sulfanilamida, ácido fosfórico (Dinâmica, Brasil); álcool etílico comercial absoluto; água Milli-q, radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), dimetilsulfóxido (DMSO), quercetina, ácido ascórbico, NEED, lipopolissacarídeo, ácido gálico (Sigma, EUA), reagente Folin-Ciocalteau (Merck, Alemanha), etanol grau CLAE, metanol grau CLAE, cloreto férrico, sulfato de sódio (Vetec, Brasil), ácido sulfúrico P.A. (Neon, Brasil), hidróxido de sódio P.A. (Synth); vermelho de metila, ácido bórico (Avantor); solvente deuterado, metanol (CD₃OD) (ACROS); carbonato de sódio, ácido clorídrico P.A., sulfato de cobre (Dinâmica, Brasil), (Sigma, EUA), meio de cultura RPMI-1640 (Life Pharma).

4.2. Desenvolvimento e preparo do extrato de *Libidibia ferrea*.

A preparação do extrato líquido visou a aquisição de concentrações satisfatórias de compostos polifenólicos. Estudo prévio realizado com plantas coletadas em abril de 2016 buscou determinar as condições ideais para a produção do extrato de folhas de *L. ferrea*. Para isso foram produzidos dez extratos utilizando combinações de metodologias extrativas (maceração 24 horas, turbólise 15 minutos e percolação) e de solventes (água, etanol e metanol) como mostrado na tabela 1. Quantificou-se o teor de fenóis totais pela metodologia descrita na

seção 4.3. Através desses resultados foi possível avaliar previamente a influência do método extrativo e do solvente no teor de fenóis totais.

Tabela 01 – Seleção da metodologia extrativa das folhas de *Libidibia ferrea*.

SOLVENTES	TURBÓLISE 15 MIN	MACERAÇÃO 24H	PERCOLAÇÃO
Água	X	X	
Metanol 30%	X	X	
Metanol 50%	X	X	
Metanol 70%			X
Metanol 80%		X	
Etanol 70%		X	

Legenda: X: extratos produzidos utilizando a técnica extrativa e o solvente indicado.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Utilizando os resultados obtidos, realizou-se a otimização do processo extrativo de fenóis totais das folhas de jucá. Por meio do programa estatístico STATISTICA[®], procedeu-se um estudo de planejamento fatorial 2³, utilizando ponto central, no qual foi investigado o efeito da proporção das variáveis independentes: folhas de *L. ferrea* em solvente (p/v), concentração de solvente em água (v/v) e tempo de homogeneização (min) em ultra-turrax[®] (T-25; IKA, Alemanha). A concentração de fenóis totais foi utilizada como variável resposta. A Tabela 2 apresenta os fatores e as proporções utilizados na produção dos extratos líquidos das folhas de jucá.

Tabela 02– Planejamento fatorial 2³, utilizando ponto central em triplicata (**negrito**), para produção de extrato de *Libidibia ferrea*.

EXTRATOS	DV: SOLV (%)	MEOH:H₂O (%)	TEMPO ROTAÇÃO (MIN)
1	24	10	4
2	36	10	4
3	24	40	4
4	36	40	4
5	24	10	16
6	36	10	16
7	24	40	16
8	36	40	16
9	20	25	10
10	40	25	10
11	30	0	10
12	30	50	10
13	30	25	0
14	30	25	20
15	30	25	10
16	30	25	10
17	30	25	10

Legenda: Dv: droga vegetal; Solv: solvente; MeOH: metanol; min: minutos.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

A velocidade de rotação no aparelho de ultra-turrax foi de 4200 rpm para todos os extratos. Em decorrência do calor produzido pelo atrito das hélices com o material vegetal, houve a cada 5 minutos de rotação uma pausa de 5 minutos com o objetivo de preservar a integridade de substâncias termossensíveis.

Para que houvesse um padrão em relação ao tempo em que a droga vegetal permanecesse em contato com o respectivo solvente extrator, estabeleceu-se que todos os extratos, mesmo os de menores tempos (4 minutos de agitação, por exemplo), permanecessem em maceração até 35 minutos. Tempo determinado com base no maior tempo de rotação (20 minutos) somado a 15 minutos dos tempos dos intervalos mencionados anteriormente.

4.2.1. Determinação de sólidos totais.

A determinação de sólidos totais foi realizada segundo metodologia descrita por Souza; Bassani e Schapoval (2007). Em cadinhos de porcelana de massa conhecida, adicionou-se 1mL de extrato. O material foi seco em estufa, utilizando temperatura de 105° C. Em seguida resfriou-se em dessecador e pesaram-se novamente os cadinhos.

A análise foi realizada em triplicata. O teor de sólidos totais foi calculado utilizando a equação:

$$\text{Sólidos totais } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = \frac{(\text{M. cadinho} + \text{amost. sec.}) - (\text{M. cadinho sec.})}{\text{volume da amostra}}$$

4.3. Fenóis totais dos extratos produzidos utilizando planejamento fatorial 2³.

A dosagem de fenóis totais foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Composto por dois ácidos, o fosfotungstístico e o fosfomolibídico, cujo tungstênio e molibdênio apresentam estado de oxidação 6⁺. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, a média do estado de oxidação desses íons encontra-se entre 5 e 6, formando os chamados tungstênio molibdênio de coloração azul, cuja intensidade é medida por espectrofotometria. Foram transferidos 100µL das soluções amostra de *L. ferrea* (diluição 1:25) e padrão ácido gálico para balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 250 µl do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N e 4 mL de água ultra-pura. Após alcalinizar o meio (3 ml de Na₂CO₃ a 10%) o volume foi completado com água ultra-pura. Decorrido 15 min, à temperatura ambiente, realizou-se a leitura espectrofotométrica (785 nm) no UV-VIS. Os compostos fenólicos totais foram expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG/g) (SOUSA *et al.*, 2007).

4.3.1. Preparo da solução padrão de ácido gálico.

A solução padrão de ácido gálico (solução estoque) foi preparada dissolvendo-se o equivalente a 10 mg do padrão, pesado analiticamente, em 2 mL de etanol PA em balão de 25 mL completando o restante do conteúdo com água ultra-pura.

4.3.2. Construção da curva de calibração.

A curva de calibração de ácido gálico foi construída com o emprego de 6 concentrações de ácido gálico, com faixa de trabalho entre 1 e 6 µg/mL, preparadas por meio de diluições de alíquotas de uma solução estoque (400 µg/mL). Para cada ponto da curva foram utilizadas três réplicas.

4.4. Escolha e preparo do extrato seco de *Libidibia ferrea*.

O extrato líquido com maior teor de fenóis totais obtido após a realização do planejamento fatorial foi empregado na produção do extrato seco liofilizado. O extrato líquido foi concentrado em rotaevaporador, com o objetivo de retirar o conteúdo de metanol presente, com base no ponto de ebulição do metanol e da água (P.E Metanol = 64,7; P.E Água = 100°C). O conteúdo aquoso resultante foi liofilizado e o pó obtido foi ressuspenso em água destilada na

concentração final de 1mg/mL. A dosagem de fenóis totais foi novamente realizada, segundo a metodologia descrita no item 4.3 (utilizando 150µL de solução amostra), com o extrato liofilizado das folhas de *L. ferrea* (ELFLF) para cálculo de perdas significativas devido ao processo de liofilização e prosseguiu-se com a realização de outras análises.

4.5. Caracterização do ELFLF.

4.5.1. Prospecção fitoquímica do extrato seco de *Libidibia ferrea*.

O estudo foi realizado segundo metodologias clássicas para detecção das principais classes de metabólitos secundários. Com uma alíquota do ELFLF, determinou-se qualitativamente a presença de flavonoides, alcaloides, heterósides saponínicos e taninos (MATOS, 1997).

4.5.2. Perfil cromatográfico do ELFLF por CLAE.

O perfil cromatográfico foi obtido utilizando sistema cromatográfico Shimadzu (Japão) acoplado a detector com arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD). Utilizou-se coluna analítica C-18 (Tedia) com 250x4,6mm e tamanho de partícula interna 5 µm. Foi utilizada como fase móvel: água ultrapura e metanol grau CLAE. As condições cromatográficas e a proporção da fase móvel são observadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 03 – Condições cromatográficas utilizadas para obtenção do perfil cromatográfico do extrato liofilizado de folhas de *Libidibia ferrea*.

PARÂMETRO	ESPECIFICAÇÃO
Coluna	C18 Kromasil
Detecção	UV-DAD (varredura 220 à 400 nm)
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	60 minutos
Fase móvel A	Água ultrapura
Fase móvel B	Metanol grau CLAE

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

As amostras do ELFLF foram diluídas em água e em seguida foram filtradas utilizando filtro para seringa PVDF com 25 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm (Millipore).

Tabela 04 – Proporção de fase móvel utilizada para obtenção do perfil cromatográfico do extrato liofilizado de folhas de *Libidibia ferrea*.

TEMPO (MINUTOS)	ÁGUA ULTRAPURA (%)	METANOL GRAU CLAE (%)
0,01	90	10
10,00	70	30
50,00	10	90
60,00	0	100

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

A identificação dos marcadores químicos do extrato foi realizada através do tempo de retenção e do espectro UV comparativo a um padrão conhecido.

O extrato obtido foi submetido a fracionamento cromatográfico em cartucho de sílica quimicamente modificada C-18 (Strata-Phenomenex). A eluição foi conduzida utilizando 50 mL de mistura de solventes H₂O e MEOH. Este procedimento resultou em 5 frações (H₂O, MEOH 25%, MEOH 50%, MEOH 75% e MEOH 100%). A fração metanólica 50%, após verificação prévia por cromatografia em camada delgada (CCD), foi coletada e analisada em sistema cromatográfico (Agilent - EUA) acoplado a detector com arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD). Utilizou-se coluna cromatográfica semipreparativa SB C-18, 250x9,4mm, 5 μ (Zorbax) e pré-coluna C-18, 5 μ m (Phenomenex). Foi utilizada como fase móvel: água ultrapura e metanol grau CLAE e metodologia de corrida isocrática (45% metanol e 55% água ultrapura). As condições cromatográficas são observadas na tabela 5.

Dois picos foram coletados. Essas amostras foram liofilizadas e tiveram suas estruturas elucidadas através de espectroscopia utilizando aparelho de ressonância magnética nuclear (RMN).

Tabela 05 – Condições cromatográficas utilizadas para purificação e coleta de dois picos da fração metanólica 50% do extrato liofilizado de folhas de *Libidibia ferrea*.

PARÂMETRO	ESPECIFICAÇÃO
Coluna	C18 Zorbax
Pré-coluna	C18 Phenomenex
Deteção	UV-DAD (325 nm)
Volume de injeção	500 μ L
Fluxo	3 mL/minuto
Tempo de corrida	12 minutos
Fase móvel A	Água ultrapura
Fase móvel B	Metanol grau CLAE

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

4.5.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹ H).

A elucidação da estrutura molecular das amostras coletadas foi realizada em parceria com o departamento de química da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da professora Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹ H) foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC).

O espectrômetro Bruker Avance DPX-300, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,046 T foi operado nas frequências de 300,13 MHz para hidrogênio. Nos experimentos realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram aplicadas frequências de 500,13 MHz (¹ H), sob um campo magnético de 11,744 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais) e sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais).

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado, metanol (CD₃OD), comercializados pelas empresas ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados, metanol (δ_H 3,31). As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN¹ H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete).

4.6. Teor de flavonoides.

Flavonoides são metabólitos secundários, pertencentes a classe dos polifenóis, que possuem propriedades antioxidantes, antiviral, antibacteriana e anti-inflamatória (WEBER *et al.*, 2003; ALVESALO *et al.*, 2006; SUBARNAS; WAGNER, 2000; WIDLANSKY *et al.*, 2005).

O teor de flavonoides foi quantificado utilizando a metodologia de Ahn *et al.* (2007) modificada. Para 2 mL de extrato foram adicionados 800 μ L de AlCl₃ 2% e completou-se o

volume com metanol 50%. Após 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo scientific genesys 10S, USA) na absorvância de 415nm no UV-VIS. O conteúdo de flavonoides foi expresso em equivalente de quercetina (mg EQ/g de extrato).

4.6.1. Preparação da solução padrão de quercetina.

A solução padrão de quercetina (solução estoque) foi preparado dissolvendo-se o equivalente a 15 mg do padrão, pesado analiticamente, em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em balão de 25 mL completando o restante do conteúdo com metanol PA.

4.6.2. Construção da curva de calibração.

A curva de calibração de quercetina foi construída com o emprego de 5 concentrações de quercetina, com faixa de trabalho entre 3 e 12 µg/mL, preparadas por meio de diluições de alíquotas de uma solução estoque (600 µg/mL). Para cada ponto da curva foram utilizadas três réplicas.

4.7. Análise nutricional do ELFLF.

4.7.1. Avaliação do teor de proteína bruta.

O teor de proteína bruta foi avaliado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2006). Foram pesadas 150 mg da amostra liofilizada e adicionado ao tubo de Kjeldahl, Em seguida a amostra passou por uma etapa de digestão ácida, utilizando 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e uma mistura catalisadora (Na₂SO₄ e CuSO₄, 10:1). A amostra permaneceu em bloco digestor na temperatura de 370° C até coloração verde claro, adicionou-se uma alíquota de água destilada para completa dissolução do material.

Após o resfriamento, a amostra seguiu para a etapa de destilação no aparelho de Kjeldahl. Adicionou-se 20 mL de NaOH na amostra. Em erlenmeyer adicionou-se 50 mL de água destilada, 30 mL de ácido bórico a 4% + 4 gotas do indicador vermelho de metila. O nitrogênio da amostra foi destilado por arraste para a solução de ácido bórico no erlenmeyer até coloração verde claro e volume final 75 mL.

Seguiu-se para a última etapa, titulação utilizando HCl 0,1N até a viragem do indicador para rosa claro. O percentual de proteínas na amostra foi calculado utilizando a seguinte equação.

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \frac{V \times N \times 14 \times 100}{A} \times 6,25$$

Onde:

V= volume de HCl 0,1N gasto na titulação

N= Normalidade da solução de HCl = 0,1

A= massa da amostra (mg).

4.7.2. *Determinação de minerais: Espectrometria de absorção óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).*

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICPOES) é uma técnica multielementar, rápida e sensível que pode ser apropriadamente aplicada para a determinação de minerais em amostras.

O equipamento Perkin Elmer, Modelo Optima 7000 DV (EUA) foi usado para a quantificação de cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), chumbo (Pb) e zinco (Zn). As seguintes linhas espectrais foram empregadas: Ca (393,366 nm), Fe (259,939), Mg (279,77 nm), Mn (259,372 nm), Pb (261,418 nm) e Zn (202,548 nm). Todas as medidas foram feitas em triplicatas e as áreas dos picos de intensidade foram integradas nos respectivos comprimentos de onda de cada elemento. A Tabela 6 mostra as condições operacionais do equipamento.

Para digestão da amostra (200 mg) foi utilizado 5 mL de HNO₃ a 65%. As amostras foram colocadas em um bloco digestor a 120° C por 3h. Em seguida as amostras foram diluídas para um volume de 20 mL do mesmo ácido. A digestão foi feita em triplicata.

Tabela 06 – Condições operacionais do ICP OES (configuração axial e radial).

PARÂMETRO	ESPECIFICAÇÃO
Câmara de Nebulização	Double-pass
Nebulizador	Cross-flow
Injetor de Alumina (mm D.I.)	2,4
Gerador de Rádio Frequência (MHz)	40
Potência de radiofrequência (W)	1100
Fluxo gás (argônio) de plasma (L/min):	15
Fluxo de nebulização de argônio (L/min)	0,8
Fluxo auxiliar de argônio (L/min)	0,5
Taxa de aspiração da amostra (L/min)	1,4

Legenda: As análises foram realizadas em triplicata. Mm D.I: milímetros de diâmetro interno, MHz: mega-hertz, W: watts, L/min: litros por minuto.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

4.8. Avaliação da atividade antioxidante do ELFLF: teste do sequestro do radical DPPH.

A atividade antioxidante foi determinada segundo metodologia de Saint-Cricq de Gaulejac *et al.* (1999) modificado. O método é baseado na redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), usando como padrão a vitamina C. Aliquotas de 50 µL de concentrações crescentes de ELFLF (12,5; 25; 50; 100µg/mL) e vitamina C (ácido ascórbico, 50 µg/mL, droga padrão) foram adicionados a 250 µL de solução de DPPH (0,05 mg/mL numa solução de metanol/tampão acetato pH 5,4 - 8:2 v/v) em placas com 96 poços. As soluções foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorridos 30 min, a leitura foi realizada em leitora de Elisa a 520 nm. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a Equação:

$$\% \text{ inibição} = [(A0 - Ac) / A0] \times 100$$

Onde:

A0= absorvância do controle.

Ac= absorvância da solução na presença da droga teste.

4.9. Avaliação pré-clínica do ELFLF.

4.9.1. Avaliação da citotoxicidade (MTT).

O ensaio do MTT consiste em uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente o número de células viáveis, baseada na conversão do sal amarelo, 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT), em formazan, composto de coloração púrpura e insolúvel em água. A ausência da redução do MTT é indicativo de diminuição da atividade metabólica celular, ou seja, da viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Foram utilizadas para a avaliação da viabilidade celular populações de micróglias BV2. Estas foram mantidas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO₂. As micróglias foram plaqueadas a uma densidade final de 1 x 10⁵ células por poço, com volume final de 200 µL.

Foram adicionados nos poços concentrações crescentes do ELFLF (1-100 µg/mL), e 24 h depois foi adicionado o MTT (concentração final 0,5 mg/mL) para redução a formazan intracelularmente. Após 1 h as células foram centrifugadas (130 G, 5 min), foram retirados 180 µL do meio e adicionados 150 µL de DMSO puro por 15 min para lise celular e solubilização do sal de formazan. Procedeu-se a leitura da absorvância a 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de controle (amostras sem o ELFLF).

4.9.2. Determinação da atividade anti-inflamatória: determinação de nitrito.

A concentração de nitrito foi determinada conforme descrito por Green *et al.* (1981). O método baseia-se na utilização do reagente de Griess que é capaz de revelar a presença de nitrito através de uma reação de diazotização, pela formação de um cromóforo de cor rosa, com pico de absorvância em 560 nm.

Uma suspensão de células da micróglio BV2 (população: 1 x 10⁶ cels/mL) foi incubada durante 24 horas em placa de 96 poços. Após esse tempo foi adicionado o ELFLF e uma hora depois o indutor da resposta inflamatória, LPS. O meio de cultura foi retirado da incubação após 24 horas e em seguida adicionou-se 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida 1% em 1% de ácido fosfórico e NED 0,1%, em ácido fosfórico 1%, 1:1). Para o branco, 100 µL do reagente de Griess foi adicionada a 100 µL de meio de cultura celular. Foi realizada a leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas (560 nm). Uma curva padrão foi utilizada para a determinação da concentração de nitrito nas amostras. O procedimento foi realizado em triplicata em três diferentes dias.

4.10. Análise estatística.

Os resultados relacionados ao planejamento de preparo dos extratos foram adquiridos por meio do software Statistica[®], utilizando planejamento Fatorial 2³ com ponto central em triplicata. A análise estatística da análise de atividade antioxidante e dos ensaios biológicos foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) e ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS.

5.1. Desenvolvimento do extrato de *Libidibia ferrea*.

5.1.1 Seleção da metodologia extrativa.

Os valores de fenóis totais das metodologias preliminares avaliadas (Tabela 7) indicaram a influência da técnica e do solvente selecionados. Os dados foram expressos em porcentagem de resíduo seco.

Tabela 07 – Estudo preliminar da produção de extrato líquido de folhas de *Libidibia ferrea*.

SOLVENTES	TURBÓLISE	MACERAÇÃO	PERCOLAÇÃO
	15 MIN	24H	
Água	29,14%	23,90%	
Metanol 30%	32,8%	34,20%	
Metanol 50%	34,50%	37,90%	
Metanol 70%			14,90%
Metanol 80%		42,10%	
Etanol 70%		26,20%	

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Observa-se que a percolação utilizando metanol a 70% foi a técnica que apresentou o pior resultado de extração de fenóis totais. A maceração destacou-se por ser a técnica extrativa com os melhores resultados de extração desses compostos secundários, apresentando-se menor proporção apenas quando comparada a turbólise de 15 minutos, utilizando água como solvente.

A utilização da maceração associada a turbólise e proporções maiores de metanol em água foram escolhidas para otimização do extrato líquido de folhas de jucá.

5.1.2 Otimização do extrato de folhas de *Libidibia ferrea*.

A otimização do processo extrativo mostrou que o extrato 3 (Tabela 8) apresentou as melhores condições para a extração de maior conteúdo de fenóis totais.

Tabela 08 – Otimização da extração de fenóis nos extratos das folhas de *Libidibia ferrea*.

EXTRATOS	DV:SOLV. (%)	MEOH: H ₂ O (%)	TEMPO DE AGITAÇÃO (MIN)	FENÓIS (mgAG/g)	SÓLIDOS TOTAIS	%
1	24	10	4	230,5	15,5	22,4
2	36	10	4	218,9	33,6	21,9
3	24	40	4	283,7	29,7	28,4
4	36	40	4	257,6	35,6	25,8
5	24	10	16	210,6	8,2	21,1
6	36	10	16	215,0	39	21,3
7	24	40	16	270,1	7,7	27,0
8	36	40	16	271,6	10,6	27,2
9	20	25	10	230,1	29,6	23,0
10	40	25	10	208,0	23,6	20,8
11	30	0	10	180,8	16,9	18,1
12	30	50	10	265,2	37,7	26,5
13	30	25	0	234,8	40,1	23,5
14	30	25	20	212,5	41,3	21,3
15	30	25	10	232,3	39,25	23,2
16	30	25	10	232,0	37,7	23,2
17	30	25	10	225,8	37,65	22,5

Legenda: As análises foram realizadas em triplicata. DV: droga vegetal; Solv: solvente; MeOH: metanol; min: minutos; mgAG/mL: miligrama equivalente de ácido gálico por mililitro.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

A avaliação da linearidade da análise de fenóis totais foi realizada utilizando uma curva de calibração com padrão ácido gálico. A Tabela 9 e a Figura 5 trazem as concentrações e os valores de absorvância, mostrando a equação da reta.

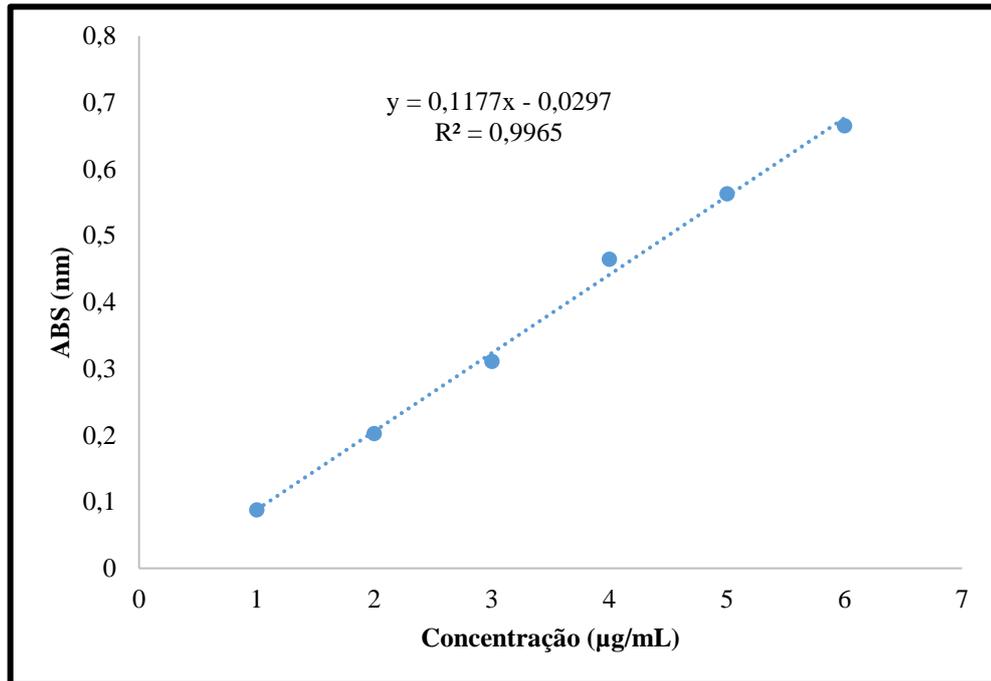
Tabela 09 – Absorvância do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria a 785 nm.

CONCENTRAÇÃO (µg EAG/mL)	ABSORVÂNCIA ± DP
1	0,088±0,001
2	0,202±0,008
3	0,311±0,001
4	0,464±0,028
5	0,563±0,010
6	0,665±0,007

Legenda: Os valores de absorvância estão expressos como média ± DP. As análises foram realizadas em triplicata. DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

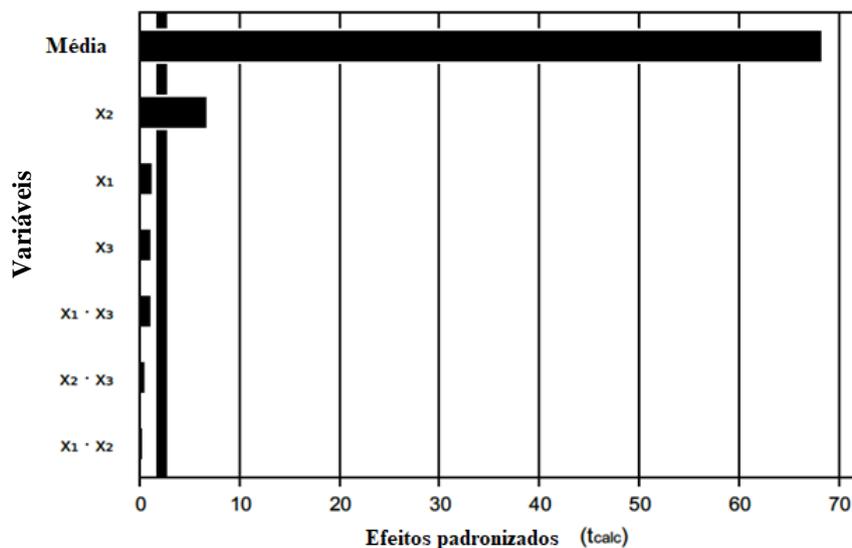
Figura 05 – Curva de calibração do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico a 785 nm.



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

A interação entre as variáveis utilizadas na produção do extrato foi avaliada através da análise obtida pelo Gráfico de Pareto (Figura 6). As variáveis analisadas foram: proporção de folhas de *L. ferrea* em solvente (p/v) (X1), concentração de solvente metanol em água (v/v) (X2) e tempo de rotação (X3). A concentração de fenóis totais foi utilizada como variável resposta. Test *t* Student ($p < 0,05$).

Figura 6 – Gráfico de Pareto das variáveis estudadas para otimização do extrato de *L. ferrea*.



Legenda: X1: proporção de folhas de *L. ferrea* em solvente (p/v), X2: concentração de solvente metanol em água (v/v) X3: tempo de rotação.

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

5.2. Material liofilizado.

5.2.1. Teor de Fenóis totais do ELFLF.

A quantificação de substâncias fenólicas do liofilizado de folhas de *L. ferrea* foi realizada utilizando extrato com concentração de 1mg/mL. A linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração (Figura 7) construída a partir dos valores de absorvância mostrada na Tabela 11. Os valores da média da absorvância, concentração e o percentual de fenóis totais são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Concentração de fenóis totais do ELFLF obtidos por espectrofotometria UV-VIS a 785 nm.

ABSORVÂNCIA ± DP	CONCENTRAÇÃO mg EAG/g	%
0,453±0,018	260	26

Legenda: O valor de absorvância está expresso como média ± DP. A análise foi realizada em triplicata. DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

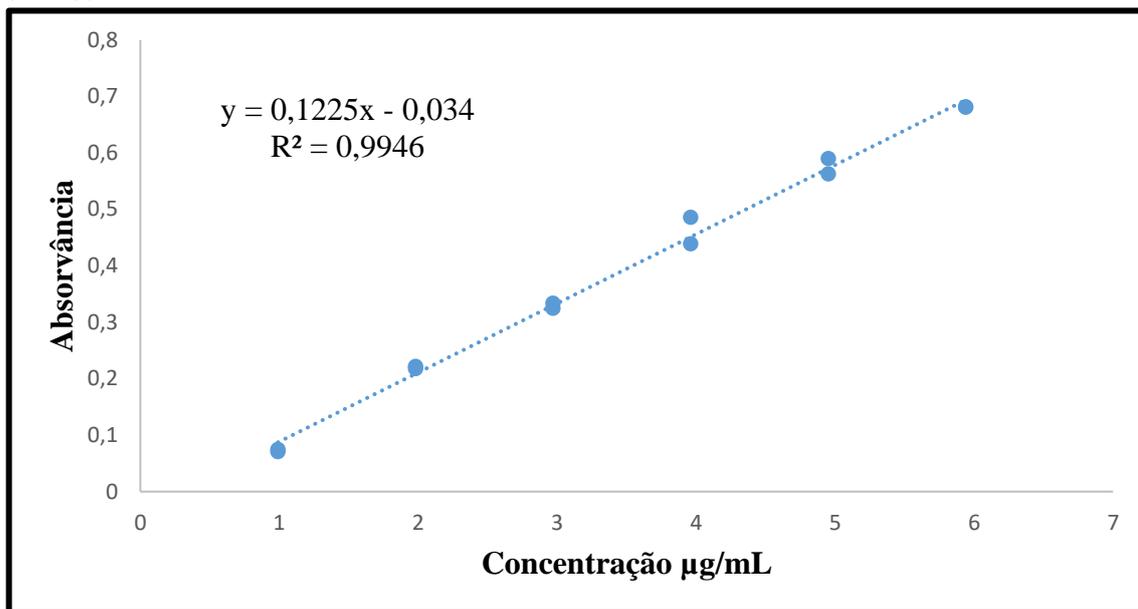
Tabela 11 – Absorvância do padrão ácido gálico obtido por espectrofotometria UV-VIS a 785 nm.

CONCENTRAÇÃO (µg EAG/mL)	ABSORVÂNCIA ± DP
1	0,073 ± 0,002
2	0,220 ± 0,002
3	0,329 ± 0,006
4	0,462 ± 0,033
5	0,576 ± 0,019
6	0,681 ± 0,001

Legenda: Os valores de absorvância estão expressos como média ± DP. As análises foram realizadas em triplicata. DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Figura 07 – Curva de calibração do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico UV-VIS a 785 nm.



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.2. Prospecção fitoquímica do ELFLF.

A triagem fitoquímica preliminar do extrato liofilizado de *L. ferrea* revelou a presença de heterósides saponínicos e taninos (Tabela 12).

Tabela 12 – Prospecção fitoquímica do ELFLF.

REAGENTE PROCEDIMENTO	INDICATIVO DE REAÇÃO POSITIVA	CLASSE QUÍMICA	RESULTADO
HCl-R e fita de Magnésio	Coloração rosa ou vermelha	Flavonoides	Não detectado
Mayer	Precipitado branco	Alcaloides	Não detectado
Bertrand	Turvação branca	Alcaloides	Não detectado
Dragendorff	Precipitado laranja	Alcaloides	Não detectado
Bouchadart	Coloração vermelha	Alcaloides	Não detectado
Agitação vigorosa	Camada de espuma estável por mais de 30 min.	Saponínicos	Detectado
FeCl3 1%	Mudança de coloração ou formação de precipitado	Taninos	Detectado

Legenda: HCl-R: ácido clorídrico concentrado; FeCl3: cloreto férrico.

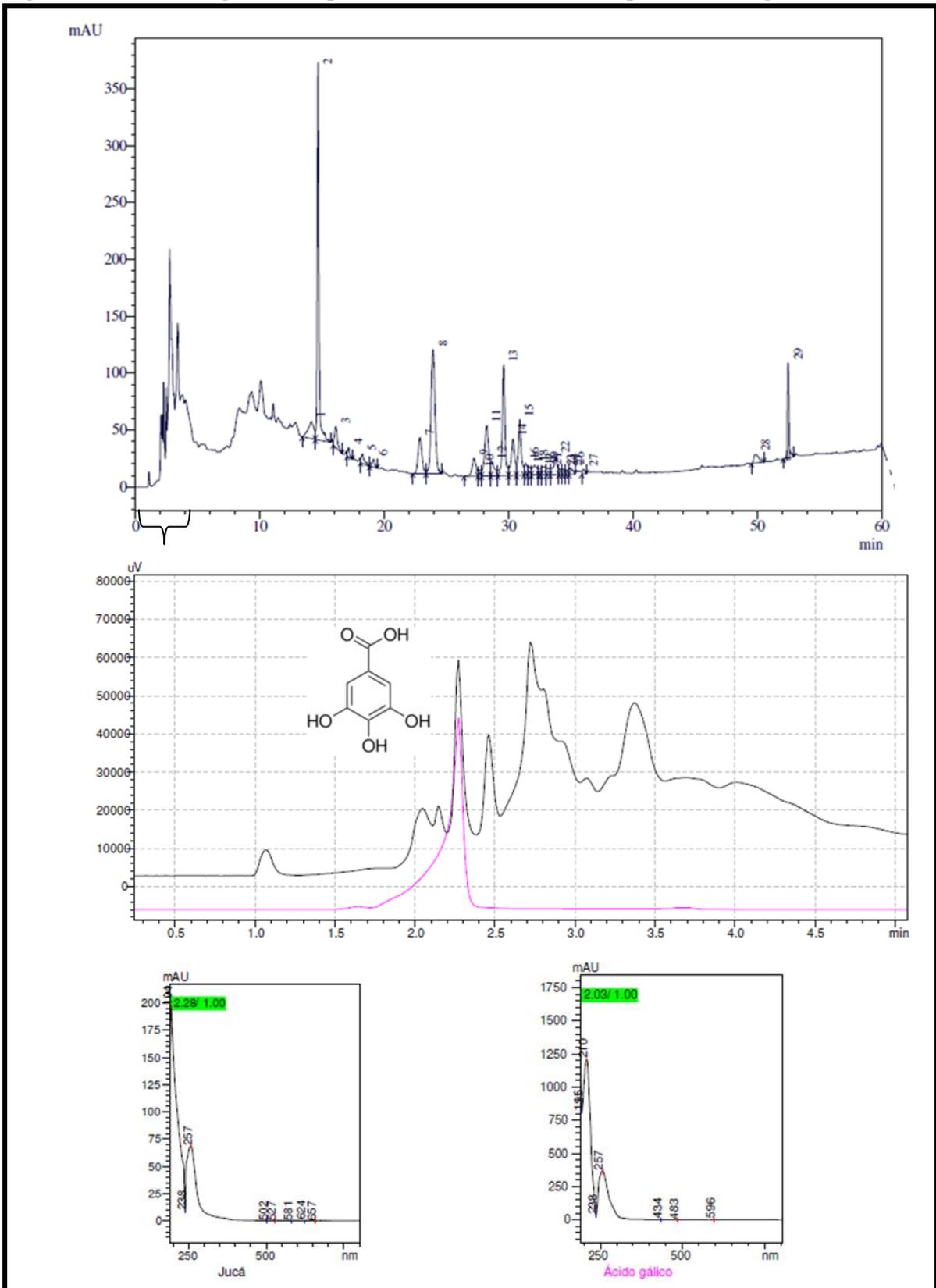
Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.3. Perfil cromatográfico do ELFLF.

Através do perfil cromatográfico do ELFLF foi possível identificar o ácido gálico (Figura 8). Para isso, o tempo de retenção e o espectro UV-VIS foi comparado com um padrão de ácido gálico.

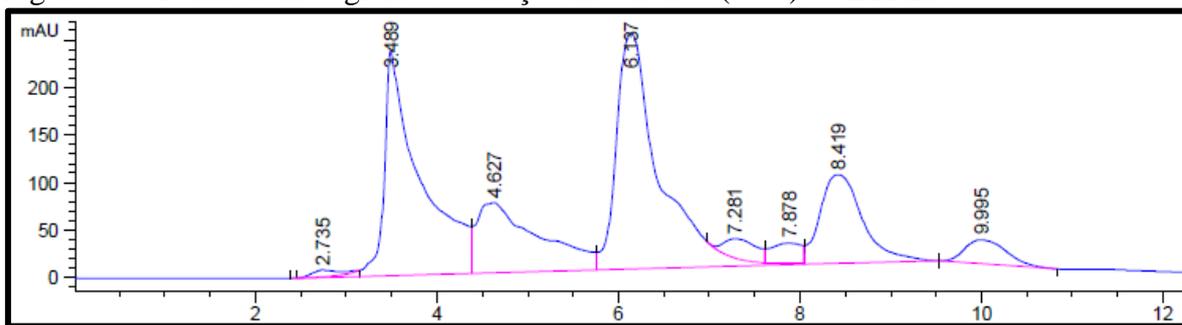
O cromatograma da fração metanólica 50% está apresentado na Figura 9. Por meio dos dados observados nesse cromatograma foi possível isolar duas substâncias puras e posteriormente identificá-las por RMN.

Figura 08 – Cromatograma e espectros UV-VIS do ELFLF e padrão ácido gálico.



Legenda: Extrato seco jucá (preto) e padrão ácido gálico (rosa).
 Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Figura 09 – Perfil cromatográfico da fração metanólica (50%) do ELFLF.



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Os constituintes da fração metanólica 50% presentes nos tempos 8,4 minutos (FM50T8) e 9,9 (FM50T10) foram isolados e purificados. O material foi evaporado para retirada do metanol e liofilizado. A elucidação estrutural dessas amostras foi realizada por RMN.

5.2.4. Ressonância magnética nuclear (RMN).

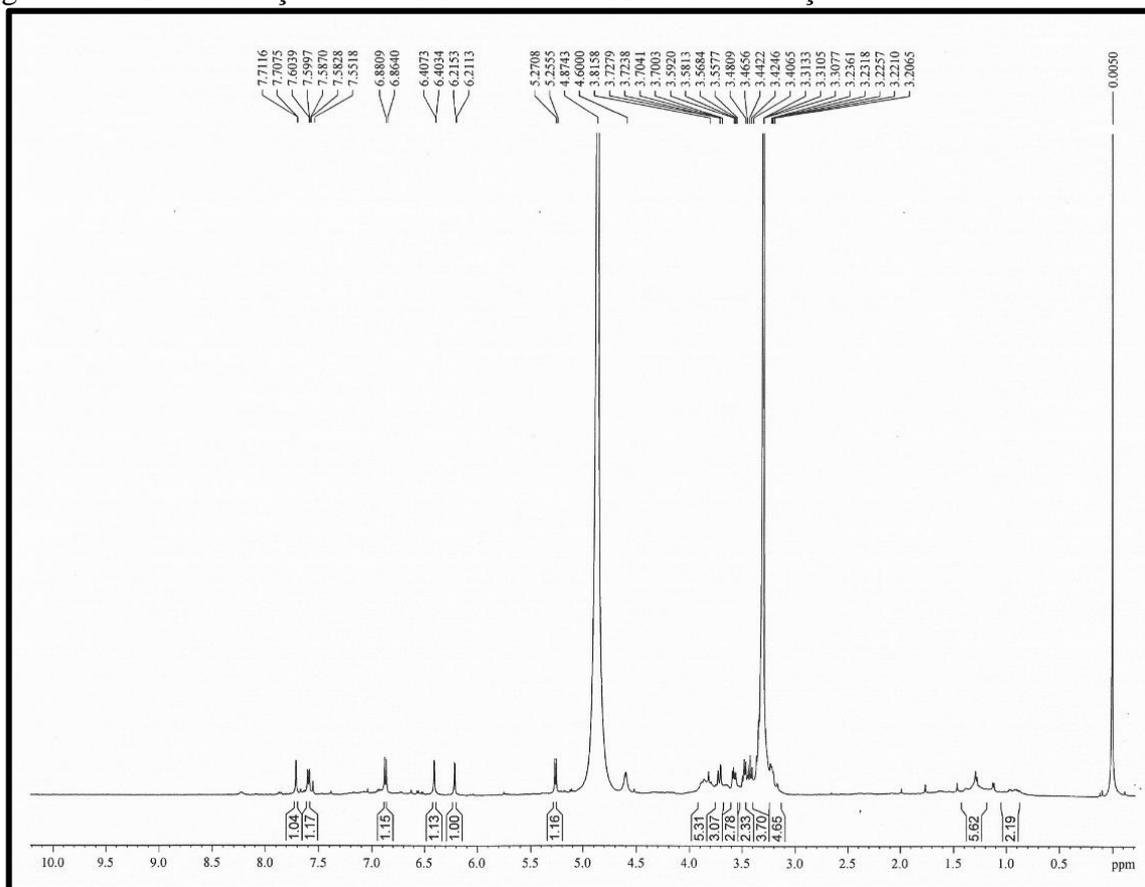
a) Determinação estrutural de (FM50T8).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 9) mostrou a presença de um grupamento glicosila, devido à presença dos sinais na região entre δ_{H} 3,20 e δ_{H} 3,81 e o dubleto em δ_{H} 5,25 (H-1'', d, $J = 7,6$ Hz), característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico e em posição axial, correspondente a forma β -piranosídica da glicose.

Os sinais em δ_{H} 7,71 (d, $J = 2,0$ Hz), δ_{H} 7,58 (dd, $J = 8,4$ e 2,1 Hz) e δ_{H} 6,87 (d, $J = 8,4$ Hz) foram associados à hidrogênios aromáticos mantendo entre si uma relação orto e meta, enquanto os deslocamentos químicos em δ_{H} 6,21 e δ_{H} 6,40, ambos apresentando $J=1,9$ Hz, foram atribuídos a hidrogênios meta posicionados.

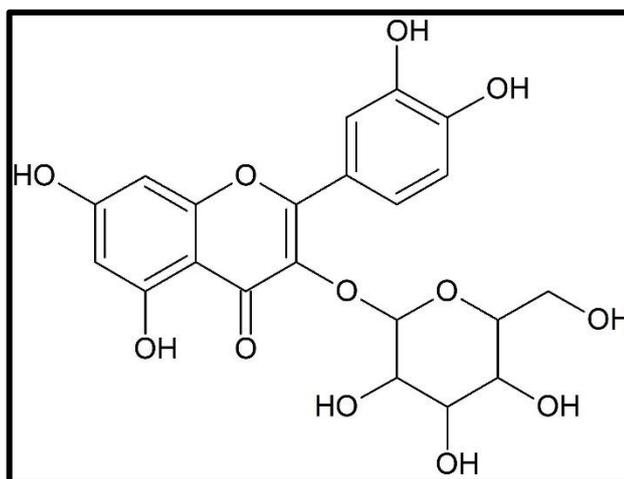
De acordo com os dados apresentados e por comparação com dados de RMN ^1H descritos na literatura (ALBUQUERQUE, 2006), pôde-se concluir de que FM50T8 tratava-se da quercetina-3-O-glicosídeo (Figura 10 e figura 11).

Figura 10 – Determinação estrutural da amostra FM50T8 da fração metanólica 50%.



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Figura 11 – Estrutura de FM50T8



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

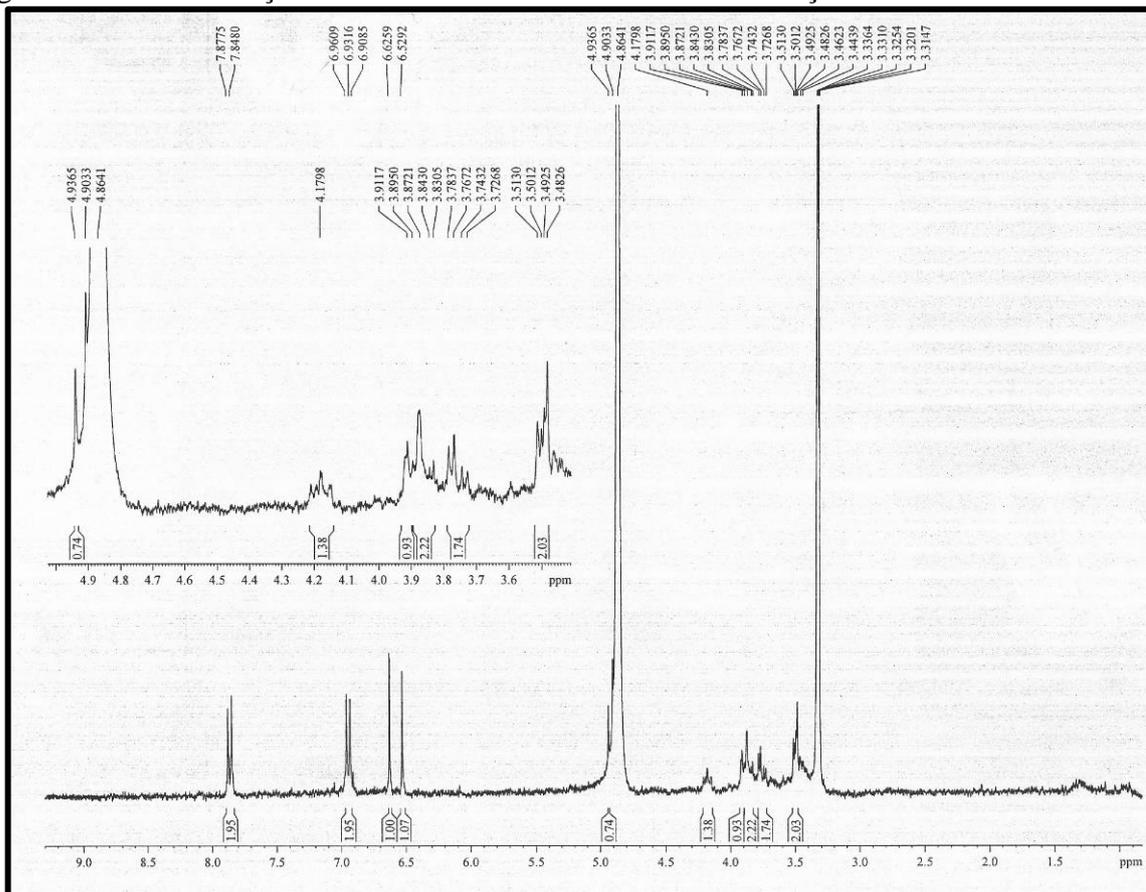
b) Determinação estrutural de (FM50T10).

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) (Figura 11) de FM50T10 também mostrou a presença de um grupamento glicosila, devido à presença dos sinais na região entre δ_{H} 3,48 e 3,91. Na região de hidrogênios aromáticos observou-se a presença de dupletos em δ_{H}

7,88 e 6,96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz) referentes a um anel aromático para-dissubstituído, dois dupletos em δ_H 6,62 e 6,53 (1H, $J = 2,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios aromáticos meta-posicionados.

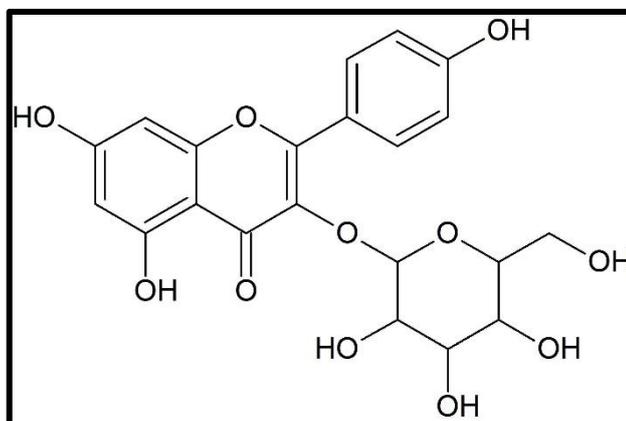
De acordo com os dados apresentados e por comparação com dados de RMN 1H descritos na literatura (CANUTO, 2007), pôde-se concluir de que FM50T10 trata-se do campferol-3-O-glicosídeo (Figura 12 e figura 13).

Figura 12 – Determinação estrutural da amostra FM50T10 da fração metanólica 50%.



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Figura 13 –Estrutura de FM50T10.



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.5. Teor de flavonoides no ELFLF.

O teor de flavonoides (Tabela 14) foi obtido utilizando uma curva de calibração com padrão quercetina, nas concentrações 3, 5, 7, 9, 12 µg /mL, como observado na Tabela 13 e Figura 14.

Tabela 13– Valores de absorvância do padrão quercetina obtido por espectrofotometria UV-VIS a 415nm.

CONCENTRAÇÃO (µg EQ/mL)	ABSORVÂNCIA ± DP
3	0,201 ± 0,007
5	0,352 ± 0,001
7	0,4765 ± 0,008
9	0,6095 ± 0,011
12	0,8065 ± 0,012

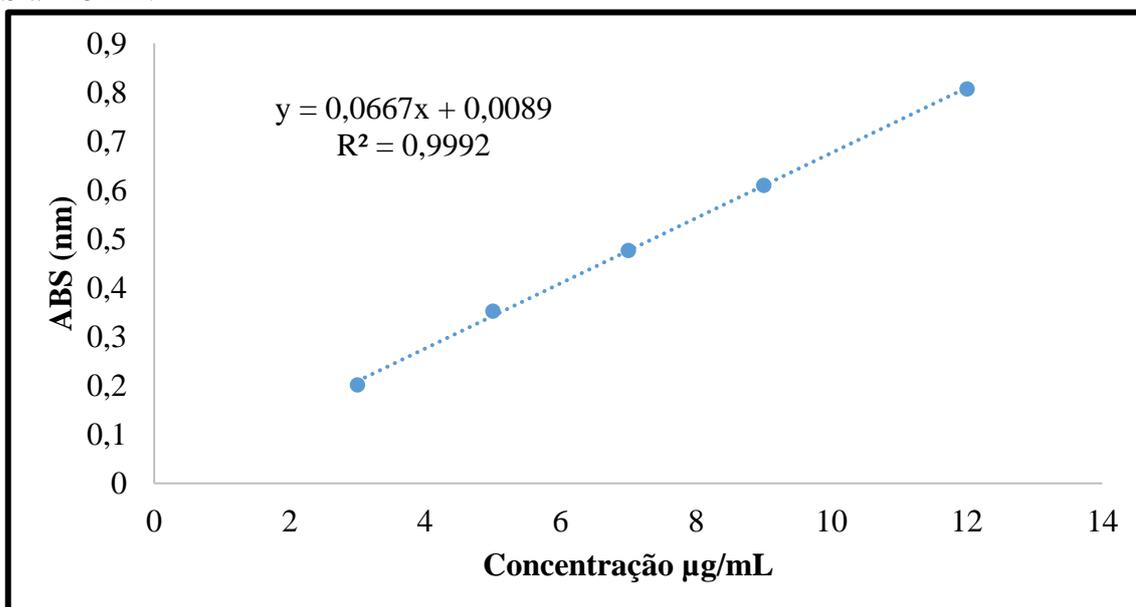
Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Tabela 14 – Valores de absorvância, concentração de flavonoides e percentual do ELFLF obtidos por espectrofotometria UV-VIS a 415nm.

ABSORVÂNCIA ± DP	CONCENTRAÇÃO mgEQ/g	%
0,29 ± 0,002	21,1	2,1

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

Figura 14 – Curva de calibração de quercetina obtida pelo método espectrofotométrico UV-VIS a 415 nm.



Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.6. Avaliação do teor de proteína bruta no ELFLF.

A quantificação de proteína bruta foi determinada indiretamente através da metodologia de Kjeldahl (Tabela 15). O extrato apresentou teor moderado (4,19%) desse nutriente.

Tabela 15 – Porcentagem de proteína bruta em amostra do ELFLF.

AMOSTRAS	PESO DA AMOSTRA (GRAMAS)	VOLUME TITULADO (mL)	% PROTEÍNA	DP	MÉDIA (%)
1	0,1509	0,7	4,19		
2	0,1514	0,7	4,18	0,02	4,19
3	0,15	0,7	4,22		

Legenda: Os valores de proteína bruta estão expressos como média \pm DP. As análises foram realizadas em triplicata. mL: mililitros; DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.7. Determinação de minerais: espectrometria de absorção óptica com plasma acoplado indutivamente.

Os resultados da determinação de minerais investigados por ICP-OES mostraram altos teores de ferro, manganês e zinco (Tabela 16).

Tabela 16 – Teor de minerais em amostra de ELFLF.

ELEMENTO	LINHA DE EMISSÃO	CONCENTRAÇÃO (mg/100g)
Ca	393,366	169,92 \pm 0,453
Fe	259,939	21,65 \pm 0,01
Mg	279,77	231,43 \pm 0,391
Mn	259,372	4,38 \pm 0,01
Pb	261,418	Abaixo do limite de detecção
Zn	202,548	31,52 \pm 0,02

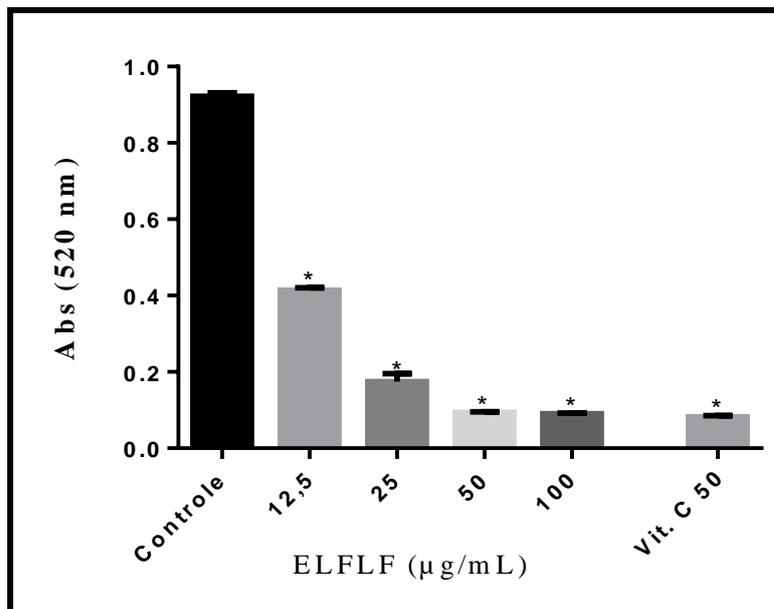
Legenda: Os valores de proteína bruta estão expressos como média \pm DP. As análises foram realizadas em triplicata.

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.8. Avaliação da capacidade antioxidante do ELFLF: teste do DPPH (Atividade sequestradora de radicais livres).

ELFLF apresentou potencial antioxidante. As concentrações 50 e 100 μ g/mL não apresentaram diferença significativa em relação ao padrão vitamina C (Figura 15). Esses extratos alcançaram inibição de 89,8 e 90,1% respectivamente, enquanto que o padrão obteve inibição de 91,2%.

Figura 15 – Avaliação do potencial antioxidante do ELFLF: ensaio do sequestro do radical DPPH.



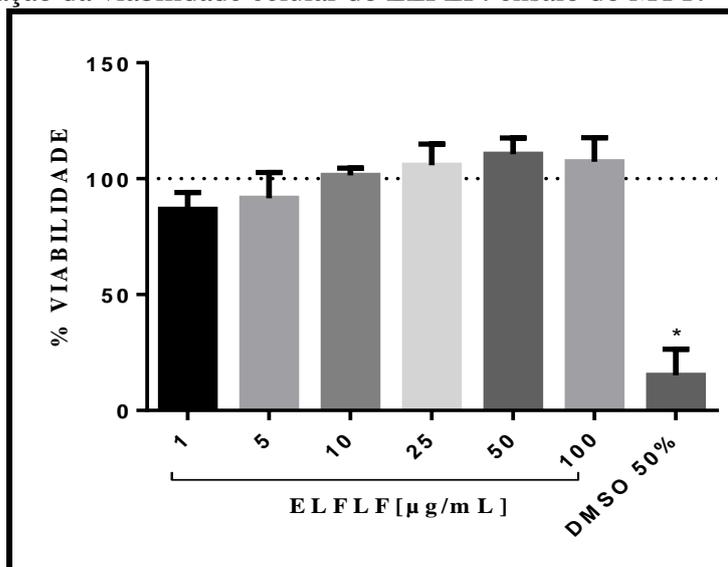
Legenda: Vit. C: vitamina C (50µg/mL); Controle: veículo (água destilada). Valores representam a média ± EPM (erro padrão da média). * Diferença significativa em relação ao controle. ($p < 0,05$ – ANOVA e pós teste de Tukey).

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.9. Avaliação da citotoxicidade do ELFLF: ensaio do MTT.

Os resultados de viabilidade celular (células microgliais BV2) mostraram que não houve citotoxicidade nas seis concentrações do extrato testadas, quando comparadas ao controle (Figura 16).

Figura 16 – Avaliação da viabilidade celular do ELFLF: ensaio do MTT.



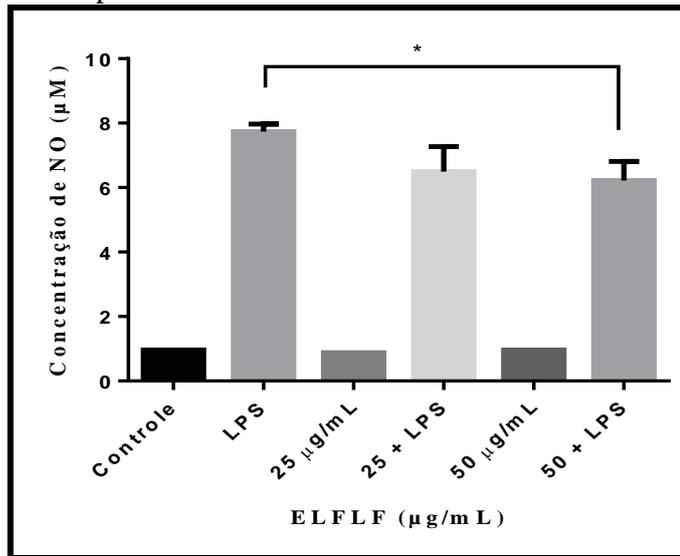
Legenda: DMSO: Dimetilsulfóxido; CTR: Controle. Valores representam a média ± EPM (erro padrão da média). * Diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$ – ANOVA e pós teste de Tukey).

Fonte: Elaboração do autor, 2017.

5.2.10. Avaliação da atividade anti-inflamatória do ELFLF: determinação de nitrito.

Os valores da redução de nitrito após indução por LPS (Figura 17) mostraram que o ELFLF na concentração 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ conseguiu reduzir significativamente a formação de nitrito em modelo celular neuronal.

Figura 17 – Determinação do potencial anti-inflamatório do ELFLF, utilizando células microgлияis BV2 induzidas por LPS.



Legenda: LPS: lipopolissacáride; Controle: Reagente de Griess + meio de cultura. Valores representam a média \pm EPM (erro padrão da média), (* $p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey).
Fonte: Elaboração do autor, 2017.

6. DISCUSSÃO.

No presente estudo foi desenvolvido, caracterizado e avaliado o potencial nutricional, antioxidante e anti-inflamatório do extrato padronizado de folhas de *L. ferrea*, utilizando modelos químicos e biológicos.

A seleção da metodologia extrativa é umas das etapas mais importantes em estudos que utilizam material vegetal. Na presente pesquisa, técnicas extrativas como: maceração e turbólise mostraram ser eficazes na extração de compostos fenólicos. Além disso, foi visto que proporções mais elevadas de metanol conseguem extrair melhor esses compostos secundários. Belwal *et al.* (2017) em ensaios de otimização da extração de polifenóis de origem nutracêutica de *Berberis jaeschkeana* observou que proporções metanólicas elevadas contribuíram de maneira mais eficaz na obtenção de maiores concentrações de fenóis do que solventes com maior proporção aquosa.

Durante o desenvolvimento de um extrato, fatores como os descritos acima e a interação apresentada por eles são importantes para o melhor aproveitamento do material utilizado. O planejamento fatorial foi uma ferramenta essencial que proporcionou a realização da interação de fatores fundamentais para a extração do conteúdo polifenólico e avaliou os efeitos que esses fatores exerceram uns sobre os outros e sobre o resultado final (ĆUJÍĆ *et al.*, 2016).

Foram produzidos 17 extratos, totalizando três fatores e cinco níveis de estudo. Não houve interações entre as variáveis independentes investigadas e apenas a concentração de solvente metanol em água (v/v) influenciou significativamente o teor de fenóis totais no extrato de *L. ferrea* ($t_{Cal} = 6,75$, $t_{Tab} = 2,12$, $p < 0,05$).

O ponto central realizado em triplicata, com desvio padrão 0,32, foi utilizado para comprovar a precisão do método. Dos 17, o extrato produzido com metanol 40%, durante 4 minutos de homogeneização, utilizando 24% de folhas secas de *L. ferrea* (p/v) apresentou o maior teor de fenóis totais (283,8 mg EAG/g).

Hassan *et al.* (2015), em estudo sobre atividade hipoglicemiante e antioxidante do extrato hidroalcolico de folhas de *L. ferrea*, afirmou que dentre os antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos se destacam nessa árvore. Melo *et al.* (2015), utilizando extrato aquoso das folhas de *L. ferrea* preparados por agitação obtiveram 482 mgEAG/g de fenóis totais, Port's *et al.* (2013) obtiveram valor mais reduzido (68,13 mgEAG/g) quando utilizado extrato aquoso preparado por infusão.

O que se pode notar a partir desses resultados é que fatores edafoclimáticos, juntamente com os métodos de preparo de extratos (proporção droga: solvente, percentual de solvente) são fatores cruciais para uma maior obtenção de teores de substâncias fenólicas (ONISZCZUK; PODGÓRSKI, 2015; KLIMCZAK *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2017).

Após a escolha do melhor extrato (extrato 3), o mesmo foi submetido a processo de liofilização, técnica de secagem que consiste em congelar o material líquido e em seguida desidratá-lo por sublimação, obtendo-se o extrato seco (RATTI, 2001). A liofilização é uma técnica muito utilizada na indústria de alimentos por não utilizar calor para desidratação do material, apresentando vantagens em relação a outras técnicas de secagem, como o *spray dryer*. Vantagens como: a garantia da integridade da estrutura molecular dos componentes do material liofilizado, a menor perda de componentes voláteis e a preservação frente a ações enzimáticas (GARCIA, 2009).

O extrato seco obtido por liofilização apresentou coloração amarelo escuro, fácil solubilização em água, não apresentou odor. O material foi preservado em frasco hermeticamente fechado, na temperatura de 8°C.

O conteúdo de fenóis totais foi doseado na amostra liofilizada para quantificação das possíveis perdas relacionadas ao método de secagem. Ao se comparar os resultados mostrados nas Tabelas 2 e 7, nota-se que houve um decréscimo de cerca de 2% de fenóis totais do liofilizado em relação ao extrato líquido. Spigno, Tramelli e Favari (2007) em estudo sobre a otimização da extração de fenóis totais em uvas, avaliaram que o método de secagem do extrato por liofilização não reduziu o conteúdo de fenóis, contudo algumas perdas puderam ser observadas devido a oxidação e processos enzimáticos. Os autores relacionam essas perdas a má conservação das amostras antes da liofilização dos extratos.

A qualidade nutricional do extrato liofilizado do jucá foi analisada através do teor de proteína bruta, quantificada por metodologia de micro-Kjeldahl e pela identificação e quantificação de minerais, através de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. A determinação de proteína bruta no ELFLF (4,19%) apresentou valor moderado desse nutriente se comparado ao teor de proteínas de alimentos como a soja (33%), por exemplo (JUNG *et al.*, 2003).

Em relação aos minerais, esses micronutrientes são fundamentais para o correto funcionamento do organismo. Minerais como zinco e magnésio são essenciais para diversas reações enzimáticas, cálcio e manganês têm papel fundamental na resistência de ossos e dentes e o ferro é componente da hemoglobina, essencial para o transporte de oxigênio (FENNEMA;

DAMODARAN; PARKIN, 2010). Em comparação com o Quadro 2, o resultado de minerais, doseado por ICP-OES, revelou alto teor de ferro (21,6 mg/100g de extrato seco) e manganês (4,38 mg/100g de extrato seco), sendo esses teores maiores do que o valor diário recomendado e abaixo da dose máxima diária desses elementos. O extrato ainda apresentou rica quantidade de zinco (31,52 mg/100g de extrato seco), componente importante de enzimas e proteínas múltiplas e envolvido na regulação da expressão gênica (BRASIL, 2003; USDA, 2010).

Em contrapartida, alguns minerais são prejudiciais para o organismo. O chumbo, por exemplo, é um metal altamente tóxico que pode se complexar com várias biomoléculas, afetando negativamente suas funções. A exposição ao chumbo pode causar efeitos adversos nos sistemas cardiovascular, nervoso, imune, reprodutivo, entre outros (ATSDR, 2007). O limite máximo permitido pela FAO/OMS de chumbo em ervas medicinais consumidas é de 10 mg/kg (WHO, 2006). O resultado mostrou que o ELFLF apresentou baixo teor de chumbo, não sendo detectado pelo equipamento.

O perfil químico também foi investigado. A triagem fitoquímica inicial revelou a presença dos polifenóis saponina e tanino, corroborando com estudos de Gonzalez *et al.* (2004). No entanto, não foi detectada a presença de flavonoides, possivelmente pela baixa concentração (2,1%). Teores reduzidos de flavonoides em folhas de *L. ferrea* também foram observados em estudo realizado por Gonzalez (2005), a qual quantificou em 0,026% o conteúdo de flavonoides no extrato das folhas da árvore. Port's (2013), utilizando extrato líquido das folhas obteve 4,56 mg equivalente catequina/g de conteúdo de flavonoides.

O extrato foi caracterizado utilizando equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), técnica de maior sensibilidade analítica, na qual a detecção da substância pode ser medida pela absorção por ultravioleta com o emprego de detector de arranjo de fotodiodos, sendo escolhidos comprimentos de onda apropriados para a detecção de moléculas de interesse. A verificação do tempo de retenção, juntamente com a injeção de padrões conhecidos foram fundamentais nesse processo (SNYDER, 1997). O ácido gálico, um ácido fenólico, foi identificado através da comparação dos tempos de retenção e do espectro UV-VIS com um padrão conhecido dessa molécula.

A identificação estrutural de outros marcadores do extrato foi possível após a separação e purificação da fração metanólica 50%. As frações puras coletadas nos tempos: 8,4 minutos e 9,9 minutos tiveram suas estruturas moleculares identificadas através de equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN). Foram identificados os compostos quercetina-3-O-glicosídeo e campferol-3-O-glicosídeo, ambos integrantes da família dos flavonoides. Port's *et*

al. (2013), relataram a presença de ácido gálico em extrato metanólico de folhas de *L. ferrea*, corroborando com estudos publicados por Silva *et al.* (2014).

As substâncias identificadas tanto por CLAE quanto por RMN apresentam características importantes na pesquisa de fontes naturais de antioxidantes para alimentos (BURSAL; KÖKSAL, 2011). De todos os metabolitos secundários de plantas, os compostos fenólicos têm sido amplamente estudados e são comumente usados como antioxidantes para uma ampla gama de aplicações (DO *et al.*, 2014). Essas substâncias atuam prevenindo e eliminando os radicais livres; estão envolvidos na prevenção de doenças crônicas e doenças degenerativas, como câncer, distúrbios autoimunes, hipertensão e aterosclerose (MANIAN *et al.*, 2008; INDRIANINGSIH *et al.*, 2015; WEN *et al.*, 2015).

A presença desses compostos explica as propriedades antioxidantes observadas no extrato padronizado de jucá. O teste do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi baseado na metodologia de Saint-Cricq de Gaulejac *et al.* (1999), utilizando o radical estável DPPH que sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora, determinada por espectrofotômetro (BLOIS, 1958).

O ELFLF apresentou atividade antioxidante nas concentrações 50 e 100 µg/mL, não apresentando diferença estatística em relação ao padrão vitamina C na concentração 50 µg/mL. A IC₅₀ determinada para o extrato foi $10,5 \pm 1,01$ µg/mL. Esses dados são reforçados por Hassan *et al.* (2015), os quais obtiveram valor próximo de IC₅₀ (IC₅₀ = $12,45 \pm 2,86$ µg/mL), utilizando extrato etanólico 70% de folhas de *L. ferrea*.

Com relação a toxicidade do extrato, o teste do MTT avaliou a viabilidade celular através da análise colorimétrica de quantificação do número de células microgлияis viáveis (MOSMANN, 1983). Em comparação ao grupo controle citotóxico (DMSO 0,1%), o ELFLF não apresentou citotoxicidade nas seis concentrações testadas (1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL), sugerindo que não há toxicidade sobre o metabolismo celular, particularmente relacionada a enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Além disso, a viabilidade nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 (101,4; 105,9; 110,5 e 107,3; respectivamente) superou os 100% do controle, sendo um indicativo de um maior número de células viáveis presente.

O potencial anti-inflamatório do ELFLF foi investigado através da quantificação da produção de NO, molécula sintetizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A produção excessiva de NO provocada pela neuroinflamação é um dos principais motivos da patogênese de vários tipos de doenças neurodegenerativas (YUSTE *et al.*, 2015).

O nitrito é um produto do metabolismo do NO e pode ser mensurado por espectrofotometria, utilizando o reagente de Griess. No presente estudo foram utilizadas populações de células microgliciais do tipo BV2 estimuladas por LPS, modelo clássico para avaliar neuroinflamação (LATTA *et al.*, 2015). Observou-se que o extrato liofilizado do jucá na concentração de 50 µg/mL conseguiu reduzir significativamente os níveis de nitrito. Esse resultado mostra o potencial anti-inflamatório desse extrato em células neuronais. Ma *et al.* (2015), utilizando células microgliciais, mostrou a capacidade anti-inflamatória do campferol-3-O-glicosídeo, flavonoide isolados do ELFLF, em inibir IL-1 β , inibindo a ativação de NF- κ B e MAPK.

Através desses dados, pode-se avaliar alternativamente a utilização de *L. ferrea* como um alimento com característica funcional frente a prevenção de distúrbios relacionadas ao estresse oxidativo e a neuroinflamação. Assim como o jucá, existem vários exemplos de plantas utilizadas como alimentos funcionais com propriedades antioxidantes atribuídas à presença de componentes polifenólicos. *Camellia sinensis* (Chá verde), por exemplo, vem sendo alvo de estudos relacionando esses constituintes ao seu potencial antioxidante e neuroprotetor (SINGH; MANDAL; KHAN, 2015). Estudos demonstram ainda a utilização de *Camellia sinensis* incorporada a alimentos como pães, carnes e biscoitos, por exemplo, com o objetivo de melhorar as características nutricionais e atribuir características funcionais a esses produtos (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

Comparativamente, pode-se relacionar os teores de substâncias fenólicas e potenciais terapêuticos de *Camellia sinensis* com os observados em folhas de *L. ferrea*. Roshanak, Rahimmalek e Goli (2015), investigaram os teores de fenóis totais e flavonoides em sete métodos de secagem de folhas de *Camellia sinensis*, entre os sete métodos, a liofilização, obtendo valores de fenóis totais de 143 mg equivalente de ácido gálico/ grama e flavonoides de 22,73 mg de equivalente de quercetina/ grama. Pasrija *et al.* (2015) avaliaram as propriedades antioxidante sequestradora de radicais livres no extrato liofilizado de folhas de *Camellia sinensis* através de metodologia de sequestro do radical DPPH, os autores quantificaram IC50 em 54,77 µg/mL.

Se relacionarmos o potencial anti-inflamatório com o teor de polifenóis e o potencial antioxidante, o que se pode notar é que o extrato liofilizado de *L. ferrea* apresenta potencial semelhante ou até superior ao do chá verde.

Diante desses resultados, O extrato liofilizado das folhas de *L. ferrea* mostrou características nutricionais interessantes e potencial anti-inflamatório, possivelmente

relacionado a atividade antioxidante proporcionadas pelas substâncias polifenólicas. Contudo estudos adicionais precisam ser realizados para elucidar melhor os benefícios nutricionais e terapêuticos de extrato da folha de *L. ferrea*. Esses resultados poderão no futuro implicar, de maneira econômica e social, na utilização de preparados de *L. ferrea* como um suplemento alimentar com propriedade funcional.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Foi desenvolvido e otimizado um processo extrativo de compostos fenólicos presentes em folhas de *L. ferrea*, resultando ao final no desenvolvimento de um extrato seco padronizado.
- Foram identificados e quantificados no extrato padronizado compostos secundários com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já descritos na literatura científica.
- A análise nutricional do ELFLF revelou a presença de proteína bruta (4,19%) e teores elevados de ferro (21,65 mg/100g) e zinco (31,52 mg/100g), por exemplo, provando que o extrato das folhas de *L. ferrea* é uma alternativa alimentar que apresenta taxas satisfatórias de nutrientes essenciais.
- O produto liofilizado mostrou elevado potencial antioxidante, fato esse relacionado a riqueza do extrato em componentes polifenólicos, como o ácido gálico identificado e os flavonoides isolados e purificados quercetina glicosilada e campferol glicosilado.
- O extrato não apresentou citotoxicidade em modelo de células microgliciais BV2.
- A concentração 50 µg/mL do extrato seco reduziu significativamente os níveis de nitrito em células microgliciais do tipo BV2, sendo um indicativo do potencial anti-inflamatório.

Sendo assim, os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram a capacidade antioxidante e anti-inflamatório das folhas de *L. ferrea* e sua potencial utilização como uma alternativa alimentar funcional. No entanto, estudos complementares são necessários para esclarecer melhor essas propriedades e possíveis efeitos tóxicos.

REFERÊNCIAS

- AHN, M *et al.* Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p.1383-1392, 2007.
- ALBARRACIN, S. L. *et al.* Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, n. 1, p.1-9, 2012.
- ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L. Estudo químico de asteráceas do Ceará: *Baccharis trinervis*, *Eupatorium ballotaefolium*, *Eupatorium betonicaeforme*, *Eupatorium pauciflorum*, *Pectis apodocephala*, *Pectis oligocephala*, *Verbesina diversifolia*, *Vernonia chalybaea* e *Vernonia scorpioides*, 2006. 436 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ALVESALO, J. *et al.* Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. **Biochem Pharmacol**, V. 71, p. 735-741. 2006.
- ARARUNA, S. M.; SILVA, A. H.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; LEAL, L. K. A. M. Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 132–137, 2013.
- ARAÚJO, A. A. *et al.* Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 156, p.88-96. 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 17th Edition, Arlington, 2006.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), Toxicological Profile for Lead (Update), Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga, USA, 2007.
- BACCHI, E.; SERTIÉ, J. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* Martius in rats. **Planta Medica**, v. 60, n. 2, p. 118-120, 1994.
- BACCHI, *et al.* Antiulcer Action and Toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 03, p.204-207, 1995.
- BADOLATO *et al.* From the hive: Honey, a novel weapon against cancer. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, p.1-37, 2017.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BELWAL, T. *et al.* An improved method for extraction of nutraceutically important polyphenolics from *Berberis jaeschkeana* C.K. Schneid. fruits. **Food Chemistry**, v. 230, p.657-666, 2017.
- BHATTACHARYYA, A. *et al.* Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p.329-354, 2014.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p.57-69, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, v.181, p. 1199-2000, 1958.

BOLÓS M; PEREA J. R.; AVILA J. Alzheimer's disease as an inflammatory disease. **Biomol Concepts**, v. 8, p. 37-43, 2017.

BRAGA R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 2ª Edição. São Paulo: **Três Press**. p. 45-46, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LebensmWiss u-Technol**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

BRASIL, LEI Nº 11.346, DE 15 DE SETEMBRO DE 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. CONSEA: Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. 2006. Disponível em: <http://www4.planalto.gov.br/consea/conferencia/documentos/lei-de-seguranca-alimentar-e-nutricional> => Acesso em 18 de setembro de 2017.

BRASIL. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395734/Guia+para+Comprova%C3%A7%C3%A3o+da+Seguran%C3%A7a+de+Alimentos+e+Ingredientes/f3429948-03db-4c02-ae9c-ee60a593ad9c>=> Acesso em 10 de setembro de 2017.

BRASIL. Pesquisa suplementar de segurança alimentar PNAD 2013. Órgão emissor: IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000020112412112014243818986695.pdf> => Acesso em 18 de setembro.

BRASIL. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. Institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, com a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegação de função em rótulos, submetidos por lei ao regime de vigilância sanitária.

BRASIL. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. 2009. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>=> Acesso em 25 de julho de 2017.

BRASIL. Resolução RDC 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, constante do anexo desta Portaria. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br => Acesso em 25 de julho de 2017.

BRASIL. Resolução RDC 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br => Acesso em 25 de julho de 2017.

BRASIL. Resolução RDC 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br => Acesso em 25 de julho de 2017.

BRASIL. Resolução RDC 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br => Acesso em 25 de julho de 2017.

BRASIL. Resolução RDC Nº 360. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. 2003. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br => Acesso em 18 de setembro de 2017.

BURSAL, E.; KÖKSAL, E. Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria L.*). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p.2217-2221, 2011.

CANUTO, K. M. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (química-agronomia-farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith. 2007. 321 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1241-1243, 2006.

CARVALHO, A. F. U. *et al.* Preliminary assessment of the nutritional composition of underexploited wild legumes from semi-arid Caatinga and moist forest environments of northeastern Brazil. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 24, n. 4-5, p.487-493, 2011.

CARVALHO, J. C. *et al.* Estudos preliminares de analgésicos e propriedades inflamatórias de *Caesalpinia ferrea* extrato bruto. **J. Ethnopharmacol.**, v. 53, p.175-178, 1996.

CHAGAS NETO, F. C. Potencial Antioxidante e Nutricional do Jucá (*Caesalpinia ferrea* Var , Huber). Monografia , Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2015.

CHEN, J. *et al.* Serum Antioxidant Vitamins and Blood Pressure in the United States Population. **Hypertension**, v. 40, n. 6, p.810-816, 2002.

CHIVA-BLANCH, G.; BADIMON, L. Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2017, p.1-18, 2017.

COHEN, M. V. Free Radicals in Ischemic and Reperfusion Myocardial Injury: Is this the Time for Clinical Trials? **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 11, p.918-931, 1989.

CORDELL, G. A. Ecopharmacognosy and the responsibilities of natural product research to sustainability. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p.332-346, 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

ĆUJIĆ, N. *et al.* Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p.135-142, 2016.

CUNHA, A. P. Caracterização e modificação química da Galactomanana de *Caesalpinia Ferrea* Mart Ex Tul. Var *Ferrea*: estudo do potencial antiviral, hipoglicemiante e cicatrizante. 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, 2015.

DI CESARE, *et al.* Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3575–3581, 2003.

DIAS, A. M. A. *et al.* Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 34–45, 2013.

DO, Q. D. *et al.* Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal Of Food And Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p.296-302, 2014.

DÖRR, A. C.; ROSSATO, M. V.; ZULIAN, A. Agronegócio: panorama, perspectivas e influência do mercado de alimentos certificados. Curitiba. **Appris**, p. 11-23, 2012.

EMBRAPA. Espécies arbóreas brasileiras: Fabaceae ou Leguminosae Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000_fu17wvyo02wyiv807nyi6s9ggg9il.html => Acesso em 25 de julho de 2017.

EUROMONITOR, Health and wellness in Brazil. Euromonitor international, London, UK. 2015.

FAO. Codex committee on food additives and contaminants. Arusha, United Republic of Tanzania. 2003.

FAO. The State of Food Security and Nutrition in the World. Building resilience for peace and food security. Rome, 2017.

FAO. World Food Summit. Rome, 1996.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de alimentos de Fennema. 4° ed. Editora Artmed. 2010.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. AL. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p.140-150, 2015.

FONSECA, F. N. Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis-*

Chambá: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FREITAS, A. C. C. *et al.* Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, p.1-7, 2012.

GARCIA, L. P. Liofilização aplicada a alimentos. 2009. 45p. Trabalho Acadêmico (Graduação Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2009.

GONZALEZ, F. G. Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius. 2005. Tese (Doutorado em Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* mart. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 78, 2004.

GREEN, L. *et al.* Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p.56-58,1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine, third edition, **Oxford University Press**, England, 1999.

HASSAN *et al.* Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**. v. 5, n. 6, p.462-471. 2015.

HELENO *et al.* Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 63, n. 2, p.799-806, 2015.

HENEKA, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p.388-405, 2015.

HUANG, D. *et al.* Evaluation of hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 163, p.256-263, 2015.

HUNG, C. W. *et al.* Ageing and neurodegenerative diseases, **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 1, p. 36-46, 2010.

INDRIANINGSIH, A. W. *et al.* Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p.748-755, 2015.

JHA, M. K.; LEE, W.; SUK, K. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 103, p.1-16, 2016.

JOSEPH, S. V.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B.M. Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 56, n. 3, p.419-444, 2015.

JUNG, S. *et al.* **Journal Of The American Oil Chemists Society**, v. 80, n. 12, p.1169-1173, 2003.

KJELDAHL, J. Z. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. **Analytical Chemistry**, v. 22. 1883.

KLIMCZAK, I. *et al.* Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 20, n. 3-4, p.313-322, 2007.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, **Toxicol. Pathol.**, V. 30, p. 620-650, 2002.

LAJOLO, F. M. Grupo de Trabalho: Composição de Alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.29, n.1, p.57-69, 1995.

LATTA, C.H. *et al.* Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid- β using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. **Journal Of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p.1-13, 2015.

LAVELLI *et al.* Formulation of a Dry Green Tea-Apple Product: Study on Antioxidant and Color Stability. **Journal Of Food Science**, v. 75, n. 2, p.184-190, 2010.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p.335-340. 2003.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J Ethnopharmacol.** V. 70, n. 2, p. 151-159, 2000.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, v. 79, p. 98-104, 2006.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Phytomedicine**, v. 18, p. 230-233, 2011.

LEE, S.-H.; SUK, K. Emerging roles of protein kinases in microglia-mediated neuroinflammation. **Biochemical Pharmacology**, 2017.

LEWIS, G. P. *Libidibia*. Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2012. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB109828>> acesso em 30 de agosto de 2017.

LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Oxidative stress, the term and the concept. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 3, p.441-444, 2015.

LIDDELOW S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, p. 481-487, 2017.

LIMA, N. R. *et al.* Evaluation of the nutritional and antioxidant potential of the flour from cultivated *Amburana cearensis* (cumaru), aiming its use as food supplement. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM), 2013, Natal - RN. th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM), 2013.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p.787-795, 2006.

LINO, C. S. *et al.* Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p.211-215. 1997.

LIU, B.; GAO, H. M.; HONG, J. S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation, **Environ. Health Perspect.**, v. 111 n. 8, p. 1065–1073, 2003.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. A guide to drug discovery: The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.

LOPES *et al.* Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 60, p.93-99, 2013.

LÓPEZ-ALARCÓNA, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, **Anal. Chim. Acta.**, v. 763, p. 1–10, 2013.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa. Instituto Plantarum, p. 162, 2002.

MA, Z. *et al.* Astragalin inhibits IL-1 β -induced inflammatory mediators production in human osteoarthritis chondrocyte by inhibiting NF- κ B and MAPK activation. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p.83-87, 2015.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Computação Gráfica, **Leitura e Arte**. p. 413. 2004.

MANIAN, R *et al.* The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p.1000-1007, 2008.

MARSH, S. E.; BLURTON-JONES, M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. **Neurochemistry International**, v. 106, p. 94–100,

2017.

MARTINS, R. B. The expanding functional food Market in Brazil. **Natural products Insider**, 2015.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

MELO, M. S. *et al.* Antioxidant and protective effects of libidibia ferrea var. Ferrea leaves extract. **44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology**. Foz do Iguaçu, PR, Brazil, 2015.

MINGHETTI, L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 18 n. 3, p. 315–321, 2005.

MITSUMOTO, M.; O'GRADY, M.N.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D.J. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, v. 69, p. 773–779, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

NAKAMURA *et al.* Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p.119-124. 2002.

NETO, F. C. C. Potencial Antioxidante e Nutricional do Jucá (*Caesalpinia ferrea* Var , Huber). Monografia , Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2015.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* e *in vivo*. **Free radical biology and medicine.**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NOZAKI, H. *et al.* Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Lett.**, v. 48, p. 8290-8292. 2007.

OHIRA, S. *et al.* ChemInform Abstract: New Chalcone Dimers (I) from *Caesalpinia ferrea* Mart Act as Potent Inhibitors of DNA Topoisomerase II. **Cheminform**, v. 45, n. 2, p.5052-5055, 2013.

ONISZCZUK, A.; PODGÓRSKI, R. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. **Industrial Crops And Products**, v. 76, p.509-514, 2015.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International.**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OSÉS, *et al.* Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**. v. 196, p.1215-1223, 2016.

PASRIJA, D. *et al.* Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 64, n. 1, p.289-296, 2015.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, N. S. Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**. v. 44, p. 827-839, 2011.

PETERS, V. M. *et al.* Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.*, v. 7 p. 268-72. 2008.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PINTO, N. B. *et al.* Neuroprotective Properties of the Standardized Extract from *Camellia sinensis* (Green Tea) and Its Main Bioactive Components, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2015, p.1-12, 2015.

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, 2015.

POLJSAK, B.; IUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2013, p.1-11, 2013.

PORT'S, P. S.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Res Int.**, v. 53, p.875-81. 2013.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal Of Food Engineering**, v. 49, n. 4, p.311-319, 2001.

ROSHANAK, S.; RAHIMMALEK, M.; GOLI, S. A. H. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. **Journal Of Food Science And Technology**, v. 53, n. 1, p.721-729, 2015.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p.775-787, 2011.

SAINT-CRICQ GAULEJAC, N.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods, **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 425-431, 1999.

SAWADA, L. A. *et al.* *Libidibia ferrea* Mature Seeds Promote Antinociceptive Effect by Peripheral and Central Pathway: Possible Involvement of Opioid and Cholinergic Receptors. **Biomed Research International**. v. 2014, p.1-10, 2014.

SHEIKH, S. *et al.* Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. **Journal of neurodegenerative diseases**, v. 2013, p. 563481, 2013.

SHIMIZU, M. History and Current Status of Functional Food Regulations in Japan. **Nutraceutical And Functional Food Regulations In The United States And Around The World**, p.257-263, 2014.

SILVA *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of field grown *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz. **Journal of Medicinal Plants Research.**, v. 8, n. 36, p.1110-1115. 2014.

SILVA *et al.* Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 751-754, 2010.

SILVA *et al.*, Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research.**, v. 7, n. 32. p. 2358-2364, 2013.

SINGH, N. A.; MANDAL, A. K.A.; KHAN, Z. A. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p.1-17, 2015.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development, 2. ed. New York: **John Wiley Professio**, 1997. 800 p.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355. 2007.

SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERAKOWSKI, M. R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydr. Pol.**, v.82, p. 641-647, 2010.

SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102-108, 2007.

SOUZA, S. M. *et al.* Anti-inflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (*Anacardiaceae*) in rodents. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 3, p. 220-225, 2007.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal Of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p.200-208, 2007.

SUBARNAS, A.; WAGNER, H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelleagueain A from *Polypodium feei* METT. **Phytomedicine**, v. 7, n. 5, p.401-405, 2000.

SUITOR, C. W.; MURPHY, S. P. Nutrition Guidelines to Maintain Health. **Nutrition In The Prevention And Treatment Of Disease**, p.231-247, 2013.

SWINBANKS, D.; O'BRIEN, J. Japan explores the boundary between food and medicine. **Nature**, v. 364, n. 6434, p.180-180, 1993.

SZAKÁLY, Z. *et al.* The influence of lifestyle on health behavior and preference for functional foods. **Appetite**, v. 58, n. 1, p. 406-413, 2012.

TANEMURA, N.; HAMADATE, N.; URUSHIHARA, H. The need for consumer science and regulatory science research on functional foods with health claims - What should we do to harmonize science and technology with society? **Trends In Food Science & Technology**, v. 67, p.280-283, 2017.

TANG, S.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A.; KERRY, J.P. Anti-oxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 685–692, 2001.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; SOUZA, O. S. Avaliação das atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. *Tenth Brazilian*. Symposium in Medicinal Plants. São Paulo, Brasil. 1988.

TODA, S. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas, **Chin. Med.**, v. 2, p. 29-31, 2011.

TRENTIN, D. D. S. *et al.* Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

UEDA H. *et al.* Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v.8, n. 5, p. 377-381. 2002.

UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of Ellagic Acid and 2- (2,3,6-Trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic Acid on Sorbitol Accumulation in Vitro and in Vivo. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 10, p. 1584-1587, 2004.

UNEP/WCMC. Using Models To Inform Policies That Meet Multiple Objectives - Assessing the Contribution of Brazil'S Forest Code To Biodiversity Conservation. , p. 8, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Dietary Reference Intakes (DRIs): Elements. 2010.

VASCONCELOS, C. F. B. *et al.* Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, p. 1533-1541, 2011.

VIANA, G. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p.189-195, 2003.

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. **Translational Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p.1-9. 2015.

WANG, R.; ZHOU, W.; ISABELLE, M. Comparison study of the effect of green tea extract (GTE) on the quality of bread by instrumental analysis and sensory evaluation. **Food Research International**, v. 40, n. 4, p.470-479, 2007.

WEBER, J. M. *et al.* Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. **Antiviral Research**, v. 58, n. 2, p.167-173, 2003.

WEN, L. *et al.* Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn “*Crataegus pinnatifida*”. **Food Chemistry**, v. 186, p.54-62, 2015.

World Health Organization, WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2006.

WIDLANSKY, M. E. *et al.* Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 38, n. 4, p.499-506, 2005.

YALAVARTHI, C.; THIRUVENGADARAJAN, V. S. A review on identification strategy of phyto constituents present in herbal plants. *Int. J. Res Pharm. Sci*, v. 4, n. 2, p. 123-140, 2013.

YUSTE, J. E. *et al.* Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, v. 9, p.1-13, 2015.

ZHANG, W.*et al.* Effect of storage temperature and time on the nutritional quality of walnut male inflorescences. **Journal Of Food And Drug Analysis**, v. 25, n. 2, p.374-384, 2017.