



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
SEGURANÇA DE USO DE FRUTOS DE OITI [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]**

JACKELINE LIMA DE MEDEIROS

FORTALEZA

2018

JACKELINE LIMA DE MEDEIROS

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E SEGURANÇA
DE USO DE FRUTOS DE OITI [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.

Coorientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias.

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)

- M439c Medeiros, Jackeline Lima de.
Caracterização nutricional, atividade antioxidante e segurança de uso de frutos do oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch] / Jackeline Lima de Medeiros. – 2018.
105 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Ana de Fátima Fontenele Uramo Carvalho.
Coorientação: Prof. Dr. Davi Felipe Farias.
1. Chrysobalanaceae. 2. Compostos fenólicos. 3. Toxicidade. 4. Composição proximal. 5. UPLC. I.
Título.

CDD 572

JACKELINE LIMA DE MEDEIROS

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E SEGURANÇA
DE USO DE FRUTOS DE OITI [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Selene Maria de Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

Dedico primeiramente à minha filha Luisa, meu grande amor e alegria e a toda minha família pelo incentivo e ajuda constante em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, por ter permitido que eu realizasse o doutorado em bioquímica, sem seu apoio e compreensão, não teria conseguido. Obrigada por ser um exemplo de profissional, no qual me espelho em diversos momentos da docência. Muito obrigada!!!!

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Davi Felipe Farias, por ter sido um grande incentivador do meu doutorado, por ser um verdadeiro líder e conselheiro, e por sempre encontrar uma solução nos momentos de dificuldade, meu muito obrigada.

Ao Dr. Edy Sousa de Brito por aceitar participar da minha banca, pelo apoio, presteza e por ceder à infraestrutura e o pessoal do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais – EMBRAPA Agroindústria Tropical, indispensáveis para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro – EMBRAPA Agroindústria Tropical, pelo tempo, tranquilidade e ajuda na realização desse trabalho.

A profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, profa. Dra. Selene de Maia de Moraes e a profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa por terem aceitado participar da minha defesa de tese.

A todos os professores que ministraram disciplinas para o Curso de Doutorado em Bioquímica Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Prof. Dr. Bruno Anderson (Coordenador) e Prof. Dr. José Hélio Costa (Vice-Coodenador), pelo apoio institucional no decorrer de meu curso de Doutorado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), onde este trabalho foi realizado, Luiz Filho, Pedro Matheus, Joaquim Lopes, Chayenne Sá, Emanuel Francelino, Thiago Almeida e Leonardo Vieira pela amizade, companheirismo e momentos de descontração. Obrigada a todos!!!!

Aos amigos nutricionistas Isabel Ribeiro, Cristiane Martins, Paulo Carvalho e Isabelle Limaverde pela sincera amizade, ajuda, paciência, compreensão, e companheirismo sempre presentes em minha vida. Em especial a minha amiga e coordenadora Eva Linhares, por ter ajudado a conciliar a minha vida profissional e acadêmica, pela tranquilidade e positividade em momentos de dificuldade. Obrigada.

As amigas Valéria Melo e Larissa Aguiar, pela amizade, pelos momentos de desabafo, descontração e ajudada constante. Sei que posso contar com vocês.

Em especial, aos meus pais Francisco Heleno Genu de Medeiros (*in memoriam*) e Rocilda Lima de Medeiros, por serem meu porto seguro, pelo constante incentivo dado aos meus estudos, pelo apoio e confiança incondicionais. Obrigada, pelo amor, infinito amor que me guia e me faz lutar a cada dia.

Às minhas irmãs Ana Karine Lima de Medeiros, Katarine Lima de Medeiros e Karoline Lima de Medeiros, pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos meus sobrinhos Davi Lima de Medeiros e Gabriela Medeiros Moreira pela alegria e carinho que me proporcionam a cada dia.

Ao meu marido e grande companheiro Wilton Akira Bastos Shimabukuro, pelo inestimável apoio, amor, amizade e serenidade que me proporcionou durante a execução deste trabalho. Obrigada pela compreensão e por me tornar um ser humano melhor.

Ao meu grande amor, minha filha Luisa Ayumi Medeiros Shimabukuro, por me mostrar o mais puro e verdadeiro amor, por tornar minha vida mais alegre e mais leve, por me fazer conhecer as Moanas, Ladybugs, Corujitas e tantos outros personagens infantis. E por fim, por me tornar mais forte e sempre procurar fazer o meu melhor por você, minha filhinha.

As Instituições e Unidades que contribuíram na execução desse trabalho: Universidade Federal do Ceará (UFC), Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Laboratório Multiusuário de Química e Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical.

A Deus, que ilumina e guia todos os caminhos da minha vida.

“Quando tudo for escuro e nada iluminar,
quando tudo for incerto e você só duvidar. É
hora do recomeço. Recomece a caminhar.”

...

“ Recomece! Se refaça! Relembre o que foi
bom. Reconstrua cada sonho. Redescubra
algum dom. Reaprenda quando errar. Rebole
quando dançar”

...

“ E se um dia lá na frente, a vida der uma ré,
recupere sua fé, e recomece novamente”.

(Braúlio Bessa)

RESUMO

O Brasil possui uma grande diversidade biológica a ser explorada tanto com finalidade nutricional como terapêutica. Os frutos nativos brasileiros estão entre os mais saborosos e nutritivos do mundo, entretanto muitos deles são conhecidos apenas pela população local. A *Licania tomentosa*, conhecida popularmente como oiti ou oitizeiro, nativa da Mata Atlântica, é uma espécie arbórea, frutífera, perene, pouco estudada nutricionalmente. Entretanto, estudos preliminares indicaram sua ação antioxidante. Além disso, há relatos na literatura que espécies do gênero *Licania* apresentam vários usos medicinais, como no tratamento do diabetes, malária e contra o vírus da Herpes. Com o intuito de agregar valor às espécies subexploradas no Brasil, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização nutricional das farinhas das polpas (LTP1 e LTP2) e das sementes (LTS1 e LTS2) da *L. Tomentosa*, coletadas em 2015 e 2016, bem como identificar os compostos químicos, determinar a capacidade antioxidante e a segurança de uso dos extratos etanólicos das respectivas farinhas (EELTP1, EELTP2, EELTS1, EELTS2). Tanto as polpas como as sementes se mostraram boas fontes de fibra alimentar, moderados teores de minerais e ausência de fatores antinutricionais. Foram identificados onze compostos em EELTS1 e EELTS2 com predominância de flavonoides. EELTS1 e EELTS2 apresentaram notável atividade antioxidante no ensaio DPPH (SC_{50} de 15.87 ± 0.88 e 10.30 ± 0.15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), sendo também capazes de impedir a peroxidação lipídica ($CI_{50} \sim 20$ $\mu\text{g/mL}$) e reduzir o ferro (CR_{50} 0.203 ± 0.00 e 0.309 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Em relação à segurança de uso, observou-se hemólise apenas no EELTS, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ no sangue humano (A, B, O) e a 2.000 $\mu\text{g/mL}$ no sangue de coelho, sendo inferior a 30% nos tipos sanguíneos testados. Os resultados da avaliação de toxicidade oral aguda, com uma única dose, não mostraram quaisquer indício de toxicidade, enquanto aqueles da toxicidade aguda com doses repetidas (28 dias) mostraram que apenas os níveis séricos de potássio (polpa 7.37 ± 0.07 ; semente 7.57 ± 0.39) nos ratos machos, e os de fosfatase alcalina (polpa 109.30 ± 4.84 ; semente 118.30 ± 3.84) nas fêmeas tiveram alterações quando comparados com o grupo controle. *L. tomentosa* mostrou-se promissora, seja do ponto de vista nutricional ou como fonte de moléculas bioativas, além de serem consideradas seguras nos níveis testados.

Palavras-chave: Chrysobalanaceae. Compostos fenólicos. UPLC. Toxicidade. Composição Proximal.

ABSTRACT

Brazil has a great biological diversity to be explored for both nutritional and therapeutic purposes. The Brazilian native fruits are among the most tasty and nutritious in the world, however many of them are known only by the local population. *Licania tomentosa*, popularly known in Brazil as 'oiti' or 'oitizeiro', is native to the Atlantic Forest, a tree species, fruitful, perennial, little studied nutritionally. However, preliminary studies have indicated its antioxidant action. In addition, there are reports in the literature that species of the genus *Licania* have several medicinal uses, such as in the treatment of diabetes, malaria and against herpes virus. In order to add value to underexploited species in Brazil, the objective of this work was to perform the nutritional characterization of *L. Tomentosa* pulp (LTP1 and LTP2) and *L. Tomentosa* seeds (LTS1 and LTS2) collected in 2015 and 2016 as well as to identify the chemical compounds, to evaluate the antioxidant capacity and the safe use of the ethanolic extracts of the respective flours (EELTP1, EELTP2, EELTS1, EELTS2). Both pulps and seeds proved to be good sources of dietary fiber, have moderate mineral contents and lack of antinutritional factors. Eleven compounds were identified in EELTS1 and EELTS2 with predominance of flavonoids. EELTS1 and EELTS2 showed remarkable antioxidant activity in the DPPH assay (SC_{50} of 15.87 ± 0.88 and 10.30 ± 0.15 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively), and were able to prevent lipid peroxidation ($IC_{50} \sim 20$ $\mu\text{g} / \text{mL}$) and to reduce iron (CR_{50} 0.203 ± 0.00 and 0.309 ± 0.01 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively). Regarding the safety of use, hemolysis was observed only in EELTS, at a concentration of 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in human blood (A, B, O) and at $2,000$ $\mu\text{g} / \text{mL}$ in rabbit blood, being less than 30% in the blood types tested. The results of the single dose acute oral toxicity test did not show any evidence of toxicity, whereas those of acute repeated doses (28 days) toxicity showed that only serum potassium levels (pulp 7.37 ± 0.07 , 7.57 ± 0.39) in the male rats, and those of alkaline phosphatase (pulp 109.30 ± 4.84 , seed 118.30 ± 3.84) in females had changes when compared to the control group. *L. tomentosa* showed promising, either from the nutritional point of view or as a source of bioactive molecules, besides being considered safe at the levels tested.

Keywords: Chrysobalanaceae. Phenolic Compounds. UPLC. Toxicity. Proximal Composition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Semiárido nordestino. Detalhe mostra a localização no mapa do Brasil.....	19
Figura 2	– Planta <i>Licania tomentosa</i> . (A) Porte Arbóreo; (B) Caule espesso; (C) Fruto; (D) Flores.....	37
Figura 3	– UPLC chromatogram of <i>Licania tomentosa</i> seeds ethanolic extract collection 1 (EELTS1).....	81
Figura 4	– UPLC chromatogram of <i>Licania tomentosa</i> seeds ethanolic extract collection 2 (EELTS2).....	82
Figura 4	– Hemolytic activity in human, mouse and rabbit erythrocytes treated with <i>Licania tomentosa</i> pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts at different concentrations (8 to 2,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$).....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Moisture and proximate composition on a dry basis (%) of <i>Licania tomentosa</i> pulp and seeds flours Distribuição dos alunos de Horizonte nas redes estadual, municipal e privada	74
Tabela 2	– Vitamins of <i>Licania tomentosa</i> pulp and seed flours.....	75
Tabela 3	– Minerals Elements of <i>Licania tomentosa</i> pulp and seed flours.....	76
Tabela 4	– Phenolic compound and flavonoid contents of <i>Licania tomentosa</i> pulp and seed ethanolic extract.....	77
Tabela 5	– Phytochemical compounds detected in <i>Licania tomentosa</i> seed ethanolic extract collection 1 (EELTS1) by using UPLC-QTOF in negative ionization modes.....	78
Tabela 6	– Phytochemical compounds detected in <i>Licania tomentosa</i> seed ethanolic extract collection 2 (EELTS2) by using UPLC-QTOF in negative ionization modes.....	79
Tabela 7	– Antioxidant activity of <i>Licania tomentosa</i> seeds ethanolic extract.....	80
Tabela 8	– Effects of the repeated dose 28-day oral administration of <i>Licania tomentosa</i> pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts on food intake and body weight of male and female rats.....	101
Tabela 9	– Relative organs wet weight of rats after repeated dose 28-day oral treatment with <i>Licania tomentosa</i> pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts.....	102
Tabela 10	– Hematological values of rats after repeated dose 28-day oral treatment with <i>Licania tomentosa</i> pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts.....	103
Tabela 11	– Serum biochemistry values of rats after repeated dose 28-day oral treatment with <i>Licania tomentosa</i> pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
Anova	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Bovine sérum albumin
CEUA	Comitê de Ética para uso animal
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPPH	1,1 difenil-2 picril-hidrazil
EC ₅₀	median effective concentration
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EELTP	Ethanolic extract from <i>L. tomentosa</i> pulp
EELTP1	Ethanolic extract from <i>L. tomentosa</i> pulp collection 1 (2015)
EELTP2	Ethanolic extract from <i>L. tomentosa</i> pulp collection 2 (2016)
EELTS	Ethanolic extract from <i>L. tomentosa</i> seed
EELTS1	Ethanolic extract from <i>L. tomentosa</i> seed collection 1 (2015)
EELTS2	Ethanolic extract from <i>L. tomentosa</i> seed collection 1 (2016)
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Ferro Ferroso
Fe ³⁺	Ferro Férrico
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona redutase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LTP1	<i>L. tomentosa</i> pulp flour collection 1(2015)

LTP2	<i>L. tomentosa</i> pulp flour collection 2(2016)
LTS1	<i>L. tomentosa</i> seed flour collection 1 (2015)
LTS2	<i>L. tomentosa</i> seed flour collection 2 (2016)
MDA	Malonaldeído
NAC	N-acetil –cisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ROS	Reactive oxygen species
SDG	secoisolariciresinol diglicosídeo
SECO	Secoisolariciresinol
SOD	superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHP	Hidroperóxido terc-butílico
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UI	Unidade inibitória
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
1.1	Bioma Caatinga.....	15
1.2	Valorização do Bioma Caatinga.....	17
1.3	Importância Nutricional.....	18
1.4	Fitoquímicos.....	21
1.5	Antioxidantes.....	23
1.6	Radicais Livres e Doenças Crônicas.....	26
1.7	Segurança de Uso.....	30
1.8	<i>Chrysobalanaceae</i>.....	31
1.9	<i>L. tomentosa</i>.....	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivos Gerais	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
	REFERÊNCIAS.....	38
	APÊNDICE A – ARTIGO DA TESE 1.....	44
	APÊNDICE B- ARTIGO TESE 2.....	80

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Bioma Caatinga

A Caatinga é um dos maiores biomas brasileiros, com aproximadamente 970 mil km², sendo considerado o mais importante tipo de vegetação do semiárido nordestino. Abrange áreas dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Sudoeste do Piauí e interior da Bahia e do norte de Minas Gerais (Figura 1). Dominado por espécies herbáceas e lenhosas arbustivas, possui um patrimônio biológico bastante diversificado, com ocorrência de espécies endêmicas, sendo o único bioma exclusivamente brasileiro (BRASIL, 2010; MARANGON et al., 2013).

Este bioma apresenta peculiaridades em sua fisiologia, devido à condição ambiental a qual pertence. A vegetação está condicionada ao déficit hídrico relacionado a períodos de seca e de chuvas irregulares, as quais se concentram em poucos meses do ano. Além disso, as elevadas temperaturas associadas à intensidade luminosa, provocam uma demanda evaporativa alta e, conseqüentemente, a dessecação do solo (TROVÃO et al., 2007).

Os solos dessa região são rasos, ricos em minerais, mas pobres em matéria orgânica, visto que a decomposição desta matéria é prejudicada pelo calor e luminosidade intensos durante todo o ano. Fragmentos de rochas são frequentes na superfície, o que dá ao solo um aspecto pedregoso que dificulta o armazenamento de água nos períodos chuvosos (EMBRAPA, 2006).

A sobrevivência das espécies vegetais nesse ambiente inóspito contribui para dotá-las de um arsenal diversificado e potente de fitoquímicos (metabólitos secundários). De fato, as condições ambientais influenciam significativamente na produção e acumulação de metabólitos primários e secundários, podendo ser distintos em espécies da mesma planta que se desenvolveram em locais diferentes (SAMPAIO et al., 2016). Apesar da Caatinga apresentar uma grande biodiversidade vegetal e ser um repositório de moléculas bioativas, é um bioma pouco valorizado e subexplorado cientificamente.

Figura 1: Semiárido nordestino. Detalhe mostra a localização no mapa do Brasil



Fonte: Ministério da integração (MI)

1.2 Valorização do Bioma Caatinga

O Bioma Caatinga é o menos conhecido do país e talvez por isso, pouco valorizado, apesar de muito rico em espécies animais e vegetais, sítios arqueológicos e manifestações culturais. No entanto, conhecê-lo é fundamental para o desenvolvimento do semiárido brasileiro. Mesmo com toda a importância no cenário social e ambiental, apenas 8,4% da Caatinga está protegida por unidades de conservação federal, o que tem gerado um aumento do desmatamento pelo uso predatório de seus recursos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

As florestas do semiárido são de grande importância para a economia do nordeste brasileiro, pois são utilizadas tanto na geração de energia para indústrias e domicílios, como para a obtenção de produtos florestais não madeireiros, dentre os quais, o mel, frutos, fibras e outros que se tornaram uma alternativa de renda para muitas famílias. O conhecimento da potencialidade destes recursos pode ser utilizado como uma ferramenta para a conservação do semiárido brasileiro. Os recursos existentes possuem grande potencial para serem explorados, ampliando a sua contribuição para o desenvolvimento econômico e social da região Nordeste. Pode existir uma melhoria da qualidade de vida da população, sem prejuízo para a sustentabilidade ambiental (GARIGLIO et al., 2010).

De fato, estudos que possam agregar valor a esse bioma de forma racional é de extrema relevância. Nesse sentido, pesquisas já foram realizadas destacando a importância das plantas da Caatinga tanto na prevenção ou terapêutica de algumas enfermidades, bem como sua utilização como fonte alimentar ou ingrediente alimentício. Almeida e colaboradores (2017) destacaram a ação da espécie *Triplaris gardneriana* na prevenção e restauração de desequilíbrio oxidativo que pode ocorrer nas células animais. Já Silva e colaboradores (2008), ao estudarem nutricionalmente o fruto da espécie *Ximenia americana* destacaram a importância de se conhecer as potencialidades das diversas espécies do bioma Caatinga como uma importante fonte de nutriente para a alimentação humana. Em função do desconhecimento dos benefícios à saúde que essas espécies podem trazer, ainda são pouco aproveitadas pelo homem. Assim, um estudo científico detalhado que destaque tanto o potencial nutricional como fitoquímico das espécies do bioma Caatinga seria uma estratégia para fornecer subsídios à conservação dessas plantas.

1.3 Importância Nutricional

Os frutos nativos brasileiros estão entre os mais saborosos e nutritivos do mundo, entretanto muitos deles são conhecidos apenas pela população local, sendo escassos os estudos científicos. Os mais comumente comercializados são: o umbu, a pitomba, o murici e a mangaba (SANTOS et al., 2012). De fato, pesquisa realizada por Nascimento e colaboradores (2009), com plantas frutíferas da Caatinga, comprova a subutilização de diversas espécies pela falta de conhecimento de suas características nutricionais, negligenciando seu papel na melhoria da segurança alimentar da população.

O incentivo ao consumo de frutas ocorre por suas concentrações de fibras alimentares; vitaminas (especialmente tiamina, riboflavina, niacina, folato e vitaminas A, C e E), minerais (e.g., cálcio, fósforo, ferro, potássio), compostos bioativos (e.g., polifenóis e carotenoides), além do fato de apresentar baixa densidade calórica. O valor nutricional das frutas e o teor de fitoquímicos variam amplamente, e esse último não está contido nas tabelas nutricionais de alimentos (SLAVIN; LLOYD, 2012).

Estudos têm demonstrado que o consumo de frutas e verduras trazem diversos benefícios à saúde humana. Assim, os indivíduos que consomem mais de cinco porções diárias de frutas ou verduras reduzem o risco de desenvolver algumas patologias, como: câncer, principalmente os do trato gastrointestinal; diabetes, obesidade, síndrome metabólica e mal de Alzheimer. Esta associação ocorre em função das fibras, vitaminas, minerais e compostos bioativos presentes nesses alimentos (BAREA-ALVAREZ et al., 2016; CHANG et al., 2016).

A fibra alimentar é definida como partes de alimentos vegetais que o corpo não pode digerir ou absorver. A fibra pode ser classificada em dois grupos: solúvel e insolúvel. A primeira forma um gel quando exposta a água, já a segunda não se dissolve na água e permanece intacta no trato gastrointestinal. A maioria dos alimentos à base de plantas contém alguma quantidade de fibra alimentar, no entanto, para garantir a quantidade adequada de fibra solúvel e insolúvel é recomendado consumir uma ampla variedade dos alimentos fontes deste nutriente. A recomendação de fibra alimentar pode variar em função da idade, gênero e consumo de energia. Estudos sugerem que tanto a fibra solúvel como a fibra insolúvel têm impacto positivo na saúde dos indivíduos (STEWART, 2014).

Quanto às vitaminas, são substâncias orgânicas necessárias em pequena quantidade para a manutenção e crescimento de organismos vivos. Sua deficiência pode levar a certas

doenças específicas ou sintomas que podem ser curadas pela administração da vitamina específica. A maioria das vitaminas está disponível, nas quantidades requeridas, nos alimentos frescos e naturais, tanto em plantas como em fontes animais. As vitaminas desempenham diferentes funções no organismo, tais como papel catalítico em muitas reações das células, coenzima ou parte de coenzimas e sistemas enzimáticos, além de atuarem como hormônios. As vitaminas podem ser classificadas de acordo com a solubilidade em água e óleo. A vitamina C e o complexo B, são hidrossolúveis, e as vitaminas A, D, E e K são lipossolúveis (RAVISANKAR et al., 2015).

A vitamina A é denominada de retinal ou ácido retinoico e seu precursor ou provitamina, de β -caroteno. O β -caroteno é encontrado em vegetais com folha verde escura e frutas laranja escuro, como: espinafre, brócolis, cenouras, abóboras, batata doce, damasco e manga; o retinol é encontrado em leite, manteiga, queijo, creme, ovos etc.; a vitamina A pré-formada é encontrada, quase exclusivamente, em fontes animais, tais como fígado, óleos de fígado e gema de ovo. As principais funções desta vitamina são: diferenciação celular, manutenção da visão, estrutura e função das células epiteliais, síntese de glicoproteínas, ação antioxidante, dentre outras. A sua deficiência está associada à diminuição da imunidade, a xerofthalmia e retardo de crescimento (RAVISANKAR et al., 2015).

A Vitamina E é um termo coletivo dado a um grupo de compostos solúveis em triacilglicerol. Existem oito formas naturais de vitamina E, nomeadas como alfa, beta, gama e delta tocoferol e tocotrienol que são sintetizadas por plantas a partir do ácido homogentísico. Os alfa- e os gama-tocoferóis são as duas principais formas da vitamina. São encontradas em nozes, sementes e óleos vegetais; e, em menor quantidade, em brócolis, kiwi, manga, tomate e espinafre. Dentre as funções desta vitamina, destaca-se a antioxidante e proteção da membrana celular (RIZVI et al., 2014).

Além de serem boas fontes de vitaminas, as frutas também contribuem para atender os requerimentos diários de minerais. O consumo de minerais é importante, uma vez que estes nutrientes participam de diferentes processos biológicos em nosso organismo, além de estarem relacionados na prevenção de algumas patologias, quando consumidos de forma equilibrada e adequada. Os minerais podem ser classificados como macrominerais e microminerais (SOETAN et al., 2010).

O cálcio é um exemplo de macromineral, é o principal constituinte de ossos e dentes, além de participar da regulação da função nervosa e muscular. É encontrado, principalmente, em leite, iogurte, queijo, peixe, soja, brócolis, couve-flor, repolho, batata, laranja, mamão e

melancia (BUENO; CZEPIELEWSKI, 2008). Da mesma forma, o fósforo, outro macromineral que relaciona-se com a mineralização óssea e dos dentes. Participa do metabolismo energético e, sendo constituinte do ATP (adenosina trifosfato), também é importante na absorção e transporte de nutrientes, na regulação da atividade proteica e no balanço ácido-base. É amplamente distribuído, tanto nas fontes animais como vegetais, como carnes, ovos, leite, queijo, castanhas, amêndoas e cereais. O sódio, principal cátion do fluido extracelular, é importante para a manutenção do potencial de membrana e regular a pressão arterial. As principais fontes de sódio são: salsicha, batata ‘chips’, presunto, extrato de tomate e cenoura. O potássio principal cátion do fluido intracelular, está envolvido na manutenção da pressão osmótica, contribui para o metabolismo e para a síntese de proteínas e glicogênio, também desempenha importante papel na excitabilidade neuromuscular e na regulação do teor de água no organismo. É encontrado em banana, tomate, laranja, espinafre e ameixa. Quanto ao macromineral magnésio, este é armazenado principalmente no osso e, dentre as funções, destaca-se a regulação do relaxamento e contração muscular, participação na produção de proteínas e produção e transporte de energia para todo o corpo. Principais fontes: produtos lácteos, carnes, frutos do mar e bananas (GUPTA; GUPTA, 2014; SOETAN et al., 2010).

Os microminerais são necessários em pequenas quantidades diárias para a normalidade metabólica. O ferro é o constituinte da hemoglobina, que tem como principal função o transporte de oxigênio e da mioglobina. É encontrado em carnes vermelhas, atum, cereais integrais, espinafre, aspargo, alho poró, salsa, batata, cenoura e cerejas. O manganês ativa enzimas que participam do metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e colesterol, também tem função antioxidante. É encontrado em abacates, nozes, sementes, algas, farelo de aveia e farinha de trigo. O zinco é essencial às células, pois exerce funções estruturais, é necessário em uma diversidade de enzimas para que exerçam suas funções, atua na síntese de hormônios e na transmissão dos impulsos nervosos. É encontrado em levedura de cerveja, gemas de ovo, algas marinhas, nozes, ostras, aves e feijões. O selênio é importante para a produção de enzimas fundamentais na neutralização de radicais livres e na proteção contra a peroxidação lipídica. As principais fontes de selênio são nozes, atum, frango, brócolis e grãos integrais. O cobre é antioxidante, componente de diversas enzimas envolvidas na produção de energia celular, na formação de tecidos conectivos e na produção de melanina. O cobre é encontrado em sementes de girassol, amêndoas, abacates, cogumelos, lentilha, ostra e lagosta (GUPTA; GUPTA, 2014; SOETAN et al., 2010).

Além do consumo de frutas para atender às necessidades nutricionais, tem crescido nos últimos anos, em função de fatores econômicos e ambientais, a utilização de partes não comestíveis da planta, para atender ao desenvolvimento de alimentos novos, seguros e saudáveis. Dessa forma, a utilização de ingredientes alimentares para melhorar o valor nutricional, tecnológico e tornar os alimentos mais saudáveis está emergindo na sociedade moderna e mais exigente, especialmente nos países mais ricos. Nesse sentido, surge o interesse no estudo dos componentes das sementes, incluindo proteínas, amido, fibras, vitaminas e minerais (DURANTI et al., 2008).

Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados com partes de plantas frutíferas com o objetivo de agregar valor nutricional aos alimentos ou incentivar o consumo de frutos selvagens. Nascimento e colaboradores (2011), ao realizarem a caracterização química de partes de plantas (polpa, semente e pele) nativas do semiárido nordestino: mandacaru, batinga, xique-xique, facheiro, pirim, quixaba, coco-católé e juá, destacaram o potencial dessas plantas alimentícias quando comparadas a outras espécies tradicionalmente consumidas. Por outro lado, Santos e colaboradores (2017), ao estudarem a composição química das sementes de favela, planta nativa do semiárido nordestino, destacaram elevados valores de proteínas (31,38%) e lipídeos (35,20%).

As plantas frutíferas além de serem boas fontes de fibras, vitaminas e minerais, também se destacam por apresentar compostos bioativos, sendo bastante investigadas pela comunidade científica devido a possíveis aplicações farmacológicas, alimentares e industriais.

1.4 Fitoquímicos

O uso de plantas medicinais pela população tem sido uma alternativa terapêutica para tratar muitas patologias há milhares de anos, como por exemplo, a papoula (*Papaver somniferum*) e a maconha (*Cannabis sativa*). O interesse por esses produtos tem aumentado significativamente em todo o mundo, principalmente em países desenvolvidos, tanto na Europa como nos Estados Unidos da América. A estimativa no mercado mundial, é que se gaste mais de 20 bilhões de dólares, anualmente, com drogas a base em plantas, visto que aproximadamente 30% da terapêutica medicamentosa é derivada de fontes naturais, como microorganismos e plantas. Em algumas áreas específicas, como a oncológica, a terapêutica baseada em plantas pode corresponder até 60% (DUTRA et al., 2016).

Os bioativos derivados de plantas que são usados em medicamentos, em sua maioria, fazem parte do metabolismo secundário vegetal, sendo conhecidos como metabólitos

secundários ou ainda fitoquímicos para diferenciar-se do metabolismo primário. Os fitoquímicos são necessários para que as plantas sobrevivam e se reproduzam em um ecossistema competitivo. Podem ser toxinas, usadas para evitar a predação, alguns são feromônios, que atraem insetos para a polinização, outros são fitoalexinas, que protegem contra infecção microbiana e outros são ainda, aleloquímicos que inibem plantas rivais concorrentes para o solo e a luz (AMEH, 2010).

Os metabólitos secundários podem ser divididos, conforme a estrutura química, em três principais classes, terpenoides, compostos fenólicos e os alcaloides. Dentre esses fitoquímicos, os compostos fenólicos apresentam maior destaque por sua ação antioxidante, antimutagênica, antialérgica, anti-inflamatória, antiviral e antiproliferativa. Em alimentos, contribuem para a estabilidade oxidativa, cor, odor, sabor e adstringência (COSTA et al., 2015).

Os compostos fenólicos compreendem uma variada classe de compostos como os ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, isoflavonoides, estilbenos, lignanas e taninos (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Os ácidos fenólicos compreendem dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzoicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzoicos incluem o ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatequínico, ácido vanílico e ácido siríngico, os quais têm em comum a fórmula C₆-C₁. Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com cadeia lateral de três carbonos (C₆-C₃). São exemplos, o ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico e o ácido sinapínico. Os ácidos fenólicos são amplamente distribuídos na alimentação humana, sendo encontrados em frutas, vegetais e bebidas, como café, cerveja e sucos de fruta. Esses compostos apresentam alta atividade antioxidante e estão associados à cor e ao sabor dos alimentos (PIAZZON et al., 2012).

As lignanas são fitoquímicos presentes em uma grande variedade de alimentos vegetais e são formados pela combinação de duas unidades de fenilpropanóis (C₆-C₃). A semente de linhaça é uma das principais fontes de lignana, apresentando 800 vezes mais lignana que qualquer outra planta (ALU'DATT et al., 2017). Os principais representantes desses compostos são: secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG), matairesinol, pinioresinol, lariciresinol, isolariciresinol e secoisolariciresinol (SECO). Estudos indicam atividade antiestrogênica, anticancerígena, antioxidante, antivirais, antifúngica e bactericida das lignanas (SCHWARTZ; SONTAG, 2006).

Os flavonoides são os principais representantes dos compostos fenólicos, com estrutura C₆-C₃-C₆. Quimicamente são constituídos de dois anéis benzênicos, ligados através

de um anel de pirano heterocíclico. Estão divididos em flavonóis (e.g., quercetina, canferol, miricetina e fisetina), flavonas (e.g., apigenina e luteolina), isoflavonas (e.g., genistina, daidzina) e flavanonas (e.g., hesperetina e naringenina). A atividade antioxidante dos flavonoides depende da posição e do grau de hidroxilação da molécula. São encontrados em chás, vinhos, maçã, tomate, cereja, dentre outros (KUMAR; PANDEY, 2013; SAXENA et al., 2012).

A atenção farmacológica dada aos flavonoides correlaciona-se com suas múltiplas propriedades biológicas, como, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral, entretanto, a melhor propriedade relatada na literatura para quase todos os grupos de flavonoides é a sua capacidade de atuar como potente antioxidante, podendo proteger o corpo humano dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (SAXENA et al., 2012).

Os flavonoides podem interferir em diferentes sistemas de produção de radicais livres, além de aumentar a ação de antioxidantes endógenos. Os flavonoides podem estabilizar as espécies reativas de oxigênio ao reagirem com o composto reativo do radical, tornando-o inativo. Também é conhecida a ação desses antioxidantes na redução do peroxinitrito gerado a partir da reação do óxido nítrico com radicais livres. Além de agirem como quelantes de ferro, os quais induzem a formação de radicais livres (NIJVELDT et al., 2001).

Assim, os compostos fenólicos formam o grupo de antioxidantes de maior destaque e são os mais conhecidos na literatura científica. A relevância dada a esses compostos ocorre por estarem relacionados à prevenção e ao alívio de algumas doenças degenerativas (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

1.5 Antioxidantes

Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações em comparação com um substrato oxidável, evita ou atrasa significativamente a oxidação do substrato. Os substratos “oxidáveis” são quase todos os compostos que encontramos na célula, como proteína, lipídio, DNA e hidratos de carbono (AL-JABER; AWAAD, MOSES; 2011).

De acordo com o seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados como primários ou secundários. Os primeiros atuam interrompendo a cadeia de reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de

iniciação da autoxidação, através de complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécies não radicais, absorção da radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio singlete (ADEGOKE et al., 1998).

Os antioxidantes endógenos são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente prejudiciais de processos ou reações que podem causar excessiva oxidação. Essa proteção endógena é exercida pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais, envolvidas com a iniciação das reações em cadeia que culminam com a propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (AL-JABER; AWAAD; MOSES, 2011; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

A SOD é uma metaloproteína que possui três isoformas em humanos que diferem tanto na composição quanto na localização celular. As isoformas contêm manganês, Mn-SOD (SOD-1), cobre e zinco, Cu-Zn-SOD (SOD-2) e extracelular EC-SOD (SOD-3). Mn-SOD é encontrada na mitocôndria, Cu-Zn-SOD no núcleo e citoplasma e EC-SOD é mais abundante na matriz extracelular e fluidos. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O ânion $O_2^{\cdot-}$ formado na mitocôndria é dismutado a H_2O_2 pela Cu-Zn-SOD presente no espaço intramembranoso e Mn-SOD presente na matriz mitocondrial. O H_2O_2 não carregado atravessa as membranas mitocondriais e, no citosol, pode ser eliminado pela Cu-Zn-SOD ou pela catalase citosólica (BHATTACHARYA et al., 2014).

A glutathione peroxidase (GPX) converte a glutathione (GSH) em glutathione oxidada (GSSH) e durante esse processo, reduz H_2O_2 a H_2O . Para a manutenção da GSH no organismo, a conversão da glutathione oxidada (GSSH) a GSH é catalisada pela enzima glutathione redutase. Os seres humanos possuem oito isotipos de GPX, a maioria dos quais contém resíduos de selenocisteína em seu sítio ativo. Esses isotipos são encontrados em compartimentos citoplasmáticos, mitocondriais e extracelulares. Além do H_2O_2 , essa enzima também reduz peróxidos lipídicos, tais como hidroperóxido lipídico, radical peroxila, radical alcóxila e radical alquila (BIRBEN et al., 2012; BHATTACHARYA et al., 2014).

A catalase é encontrada em peroxissomos, dismutando H_2O_2 em H_2O e O_2 . Trata-se de enzima heme, mas o manganês é encontrado nos procariontes. Em seres humanos, é

encontrada em grande parte no fígado, nos rins e nos eritrócitos, embora todos os órgãos apresentem esta enzima (BIRBEN et al., 2012; BHATTACHARYA et al., 2014).

Os antioxidantes também podem ser adquiridos de forma exógena, seja através do consumo de alimentos, como as vitaminas A, C, E, betacaroteno, os minerais zinco e selênio, bem como através do consumo de substâncias fitoquímicas, encontradas geralmente em plantas, constituindo o sistema exógeno de defesa (SEN et al., 2010).

A vitamina E é capaz de proteger a membrana celular contra lesões induzidas pelos oxidantes. A vitamina E doa o elétron ao radical peroxila, que é produzido durante a peroxidação lipídica. O α -tocoferol é a forma mais ativa de vitamina E e o principal antioxidante da membrana celular. A vitamina C ou ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERO (BIRBEN et al., 2012).

Os carotenoides estão dentre os pigmentos encontrados em plantas. O β -caroteno age principalmente nos radicais hidroxila, peroxila e superóxido. O selênio é um mineral essencial que forma o centro ativo de várias enzimas antioxidantes, incluindo a glutathiona peroxidase (BIRBEN et al., 2012).

Ao lado dos antioxidantes vitamínicos disponíveis em medicamentos, destacam-se também os derivados tióis, entre os quais a N-acetilcisteína, mercaptopropionilglicina e diversos outros de origem exógena que podem agir em organismos que apresentem desequilíbrio entre agentes pró- e antioxidantes (SHAH et al., 2014).

Os compostos fenólicos presentes em plantas constituídos pelos ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), estibenos, cumarinas e taninos apresentam notável atividade antioxidante relatada na literatura, dentre os quais se destacam: aumento da resistência dos eritrócitos ao estresse oxidativo, bloqueio do radical superóxido, inibição de oxidação em lipoproteínas de baixa densidade, aumento da concentração sérica da lipoproteína de alta densidade e redução das concentrações séricas de colesterol (FERREIRA; ABREU, 2007).

A importância da utilização desses agentes antioxidantes decorre da inibição dos danos provocados pelo excesso de radicais livres e, conseqüentemente, pela sua ação na prevenção e tratamento de algumas patologias (VASCONCELOS et al., 2014).

1.6 Radicais Livres e Doenças Crônicas

Os radicais livres podem ser definidos como um átomo ou molécula altamente reativa que contém número ímpar de elétrons, ou seja, apresenta elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, conferindo-lhes alta reatividade (VALKO et al., 2007). Agentes reativos que não apresentam elétrons desemparelhados, mas que são altamente instáveis e participam das reações de produção de outras espécies reativas, geralmente derivados do metabolismo do oxigênio, também são considerados radicais livres (BARREIROS et al., 2006).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são os principais radicais livres sintetizados no corpo humano pelo sistema endógeno e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes. Também podem acumular-se devido à exposição dos vários processos físico-químicos (SHAIKH et al., 2015). ERO incluem os radicais livres como: ânion superóxido (O_2^-), radical hidroperoxila (HO_2^-), radical hidroxila (HO^\bullet), óxido nítrico (NO), oxigênio singlete (1O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl^-$). Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é exemplo de ERO, uma vez que é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o HO^\bullet . As ERN derivam da reação do NO com o O_2 e formando peroxinitritos ($ONOO^-$) (SEN et al., 2010; CAROCHO ; FERREIRA, 2013).

Dentre as ERO, o radical hidroxila por ter alta reatividade e combinar-se rapidamente com outros radicais e/ou metais dispersos é considerado um dos radicais livres mais perigosos (HALLIWEL, 2014). Quando produzido *in vivo*, reage próximo a seu local de formação, assim, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e este estiver próximo a um metal, poderão ocorrer modificações em suas bases nitrogenadas e, conseqüentemente, inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode ocasionar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares e inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrila e pontes dissulfeto (BARREIROS et al., 2006).

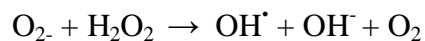
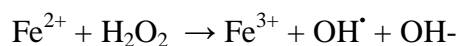
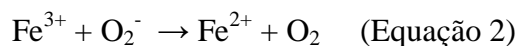
O radical ânion superóxido é formado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular. É considerado uma ERO primária e pode ainda interagir com outras moléculas e gerar ERO secundárias. Auxilia na produção de radical hidroxila (OH^-), através da redução de quelatos de ferro; reage com o radical hidroxila produzindo oxigênio singleto e com o óxido nítrico produzindo peroxinitrito. Apesar dos efeitos danosos, os superóxidos são essenciais para as células de defesa, os mesmos são gerados *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e durante

o processo inflamatório para combater os corpos estranhos (BARREIROS et al., 2006; VALKO et al., 2007).

O H_2O_2 é produzido através do consumo de oxigênio molecular pelos peroxissomos. Essa organela contém a enzima catalase, a qual decompõe o H_2O_2 e previne a acumulação desse componente tóxico. Assim, os peroxissomos mantêm um balanço entre as concentrações ou atividades dessas enzimas evitando o aumento na produção de ERO. Quando ocorre dano no peroxissomo, há uma desregulação das enzimas e, conseqüentemente, uma maior geração de H_2O_2 (VALKO et al., 2007). O H_2O_2 também pode ser encontrado em bebidas, como chás e cafés instantâneos, e se difunde rapidamente pelas células da cavidade oral e do trato gastrointestinal (BARREIROS et al., 2006).

O H_2O_2 é pouco reativo na ausência de metais de transição, entretanto, consegue atravessar facilmente as membranas celulares. Como as células possuem metais de transição, o H_2O_2 pode reagir com esses metais, gerando o radical $\text{HO}\cdot$. Os metais mais importantes para a ocorrência dessas reações são o cobre e o ferro. Mas, como o ferro tem maior biodisponibilidade em nosso organismo, apresenta maior destaque nessas reações. A exemplo dessas reações tem-se a de Fenton e a de Haber-Weiss, as quais geram como produtos finais diversos tipos de ERO (BARREIROS et al., 2006).

A reação do Fe^{2+} com H_2O_2 (reação de Fenton) pode ser representada na equação (1) e a reação do Fe^{3+} com espécie reativa de oxigênio (reação de Haber-Weiss), equação (2):



Essas espécies reativas podem desempenhar função benéfica em níveis baixos ou moderados, seja na resposta celular como na função imune. De fato, os fagócitos (neutrófilos, macrófagos e monócitos) liberam radicais livres para destruir os patógenos invasores, constituindo parte do mecanismo de defesa do corpo contra a doença. A importância da produção de ERO pelo sistema imunológico é claramente mostrada em pacientes com doença

granulomatosa que possuem um defeito no complexo da NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase que impede a formação do radical, como resultado, esses pacientes são acometidos por infecções múltiplas e resistentes (PHAM-HAY; HUA HE; PHAM- HUY, 2008).

Outro efeito benéfico das ERO e ERN envolve seus papéis fisiológicos na função de uma série de sistemas de sinalização celular. A produção dos radicais livres pela NADPH oxidase desempenha um importante papel na sinalização de vários tipos de células não fagocitárias, como: fibroblastos, células endoteliais, miócitos cardíacos e tecido tireoidiano. Por exemplo, o óxido nítrico é um mensageiro intracelular para a modulação do fluxo sanguíneo, trombose e atividade neural (GENESTRA, 2007; HALLIWELL, 2007).

Em oposição aos benefícios causados pelas ERO e ERN, tem-se, em níveis elevados, o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre o sistema de defesa e a geração de radicais livres. Quando o estresse oxidativo ocorre, as células tentam neutralizar os efeitos oxidantes e restaurar o equilíbrio redox por ativação ou silenciamento de genes que codificam enzimas defensivas, fatores de transcrição e proteínas estruturais. A maior produção de ERO no corpo pode mudar a estrutura do DNA, resultando na modificação de proteínas e lipídios, ativação de vários fatores de transcrição induzidos pelo estresse e produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Estas alterações estão associadas a diversas patologias, como: diabetes, aterosclerose, artrite e câncer (BIRBEN et al., 2012; IANNITTI; PALMIERI, 2009).

Vários fatores estão associados ao aumento do estresse oxidativo, por exemplo: consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico extremo, envelhecimento, estresse emocional, patologias crônicas (diabetes, hipertensão arterial, câncer, dentre outros), poluição ambiental, pesticidas, aditivos químicos, raio-X, radiação ultravioleta e radiação gama (VASCONCELOS et al., 2014)

Os danos causados pelas ERO ao DNA podem promover degradação de bases nitrogenadas, quebras do DNA e mutações. A maioria das modificações no DNA é altamente relevante para as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, carcinogênese e envelhecimento (BIRBEN et al., 2012).

As doenças cardiovasculares são as que mais matam, sendo responsáveis por metade de todas as mortes. A oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) desempenha um papel vital na aterosclerose. Acredita-se que com a lesão ao endotélio, há o afluxo de macrófagos que liberam radicais livres e levam à peroxidação lipídica. Com o alto nível de

lipídeos oxidados, estimula a internalização do colesterol pelos macrófagos que se converte em células espumosas, contribuindo para a formação da placa de ateroma (BIRBEN et al., 2012).

Já está bem estabelecido que o dano oxidativo do DNA é responsável pelo desenvolvimento de câncer. A iniciação e promoção do câncer estão associadas a defeitos cromossômicos e ativação de oncogênese induzida por radicais livres. Uma forma comum de dano é a formação de bases hidroxiladas de DNA que são consideradas um evento importante na carcinogênese química. O dano oxidativo ao DNA produz uma multiplicidade de modificações na estrutura do DNA, incluindo lesões na base e no açúcar, quebras na cadeia e ligações cruzadas de DNA-proteína. O tabagismo e inflamações crônicas podem proporcionar dano ao DNA contribuindo para o câncer de pulmão e outros tumores. O consumo excessivo de triacilglicerol pode estar associado ao desenvolvimento de câncer de mama, ovário e leucemia, possivelmente em função da peroxidação lipídica (LOBO et al., 2010).

Há evidências que as doenças pulmonares inflamatórias como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) estão associadas à inflamação crônica e local e ao estresse oxidativo. Doenças neurológicas, como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, perda de memória e depressão também estão associadas ao estresse oxidativo. Numerosos estudos experimentais e clínicos demonstraram que o dano oxidativo desempenha papel fundamental na perda de neurônios e na progressão para a demência. A produção de β -amiloide, um peptídeo tóxico frequentemente encontrado no cérebro dos pacientes com Alzheimer, é devido ao estresse oxidativo e desempenha um papel importante nos processos neurodegenerativos (PHAM-HAY; HUA HE; PHAM-HUY, 2008).

Assim, nota-se uma forte correlação da gênese de algumas patologias com o estresse oxidativo, sendo relevante a busca de alternativas para minimizar esses efeitos e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento das doenças resultantes do desequilíbrio do sistema de oxidorredução. Nesse sentido, o uso de fitoquímicos tem sido bastante investigado pela comunidade científica e várias aplicações têm sido propostas. No entanto, é importante ressaltar que, quer seja na forma de fármaco ou de ingrediente alimentício, a indicação de uso de qualquer produto sem histórico de uso seguro deve ser precedida por uma rigorosa avaliação de segurança para seres humanos e animais.

1.7 Segurança de Uso

O uso de plantas com o objetivo de cura de enfermidades ou amenização de seus sintomas é prática comum, na maioria das vezes sem acompanhar orientação médica. Muitas vezes as plantas são utilizadas de forma indiscriminada, tendo como argumento de que o “natural” não faz mal. Entretanto, é sabido que muitos componentes com atividades medicinais extraídos de plantas demonstram ação tóxica (SILVA et al., 2015).

A toxicidade de um alimento decorre da presença de um ou mais compostos presentes no mesmo, que pode causar danos à saúde dos seres vivos, estando diretamente relacionada com diversas condições, como exposição à substância, sua natureza química, concentração no alimento, frequência de ingestão, tempo com que o alimento vem sendo ingerido, via de introdução no organismo e suscetibilidade individual (MOURA et al., 2012).

Alguns estudos apontam que plantas utilizadas rotineiramente no tratamento de doenças apresentaram algum tipo de toxicidade. Um estudo realizado por Florence e colaboradores (2015) com a planta *Spilantes africana*, utilizada na Índia, América Central, Austrália e África para dor de dente, fratura, disenteria e malária, mostrou importantes danos em ratos, como alterações bioquímicas e nos parâmetros hematológicos.

Outra pesquisa foi realizada com a espécie vegetal *Scutia buxifolia* Reissek, conhecida popularmente como Coronilha, nativa do Sul do Brasil, Uruguai, e norte da Argentina. O chá da raiz e casca desta planta é popularmente usado no tratamento de doenças cardíacas, hipertensão e como diurético. O extrato acetato de etila da raiz desta planta apresentou alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos após a administração de diferentes doses por 28 dias, indicando não haver segurança quando utilizada por sucessivos dias (SILVA et al., 2014).

Considerável número de plantas utilizadas na medicina popular pode causar algum efeito tóxico aos seres humanos. Entretanto, boa parte destas nunca foi testada no que se refere à toxicidade, conseqüentemente, não há um retorno à população acerca da segurança de uso de todas estas plantas (TARIQ; MUSSARAT; ADNAN, 2015).

Nesse sentido, na introdução de uma nova fonte alimentar deve-se levar em consideração o mesmo princípio da introdução de um novo medicamento, tendo o máximo de precaução e estudando seus efeitos a curto e longo prazo. Os ensaios toxicológicos são realizados para determinar os níveis de ingestão de substâncias que não causam dano ao ser humano (MOURA et al., 2012). Assim, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância

Sanitária) estabelece que dos produtos enquadrados como novos alimentos ou novos ingredientes, é exigida, legalmente, a comprovação pré-mercado da segurança de uso. De acordo com o referido órgão, os novos alimentos ou novos ingredientes constituem alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no país, ou alimentos com substâncias já consumidas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na alimentação regular (ANVISA, 2013).

Nesse sentido, o fruto da *L. tomentosa* apresenta uma polpa já consumida pela população, entretanto, o extrato etanólico tanto da polpa como da semente não apresentam qualquer histórico de segurança de uso, e a utilização desses extratos, seja na forma de um fármaco ou de um ingrediente alimentício, deve ser precedida por uma rigorosa avaliação de segurança para seres humanos e animais.

1.8 Chrysobalanaceae

A família Chrysobalanaceae é composta por 17 gêneros e mais de 500 espécies, representadas por árvores e arbustos que crescem em planícies tropicais e subtropicais (YAKANDAWALA; MORTON; PRANCE, 2010). No Brasil, esta família é representada por 7 gêneros e aproximadamente 250 espécies, a maioria ocorrendo na Amazônia. O gênero *Licania* é bem representado nessa família, sendo reconhecidas 214 espécies, das quais 210 são de ocorrência neotropical, uma é africana e três malaias (MONTEIRO et al., 2012).

As espécies da família Chrysobalanaceae apresentam vários usos terapêuticos. Na África, várias espécies são empregadas no tratamento de malária, enquanto no Brasil, a espécie *L. rigida* é usada para o tratamento de diabetes. Os diterpenos encontrados nessa família apresentam efeito citotóxico, potencialidade no tratamento da Síndrome da imunodeficiência adquirida e ação antifúngica, enquanto para os flavonoides a literatura relata, principalmente, a presença de atividade antioxidante (CASTILHO; KAPLAN, 2008). Dentre as moléculas encontradas nas espécies da referida família, tem-se: canferol, miricetina, quercetina, rutina, catequina, ácido betulínico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido palmitoico, ácido maslínico e lupeol (FEITOSA et al., 2012; PESSOA et al. 2016).

Estudos também destacam a importância nutricional das espécies da família Chrysobalanaceae. Amza e colaboradores (2011) determinaram a composição proximal e os

teores de minerais das sementes de *Parinarium macrophyllum*, e verificaram que a referida espécie é uma boa fonte de proteína ($\geq 50\%$), de sódio (1306 ± 0.58 mg/100g), de cálcio (166.69 ± 0.55) e de fósforo (623.99 ± 0.14 mg/100g), além de apresentarem baixo teor de lipídio ($<5\%$). Já Aguiar e colaboradores (2011), ao determinarem a composição proximal da polpa do fruto de *Chrysobalanus icaco* L, encontraram elevados teores de carboidratos, baixo teores de lipídio e proteína.

Assim, nota-se que as espécies da família Chrysobalanaceae apresentam destaque em diferentes atividades biológicas devido aos componentes químicos que apresentam. Além disso, as espécies frutíferas também podem ser utilizadas na alimentação e/ou como possível ingrediente alimentício. Dentre as espécies, a *L. tomentosa* foi pouco referenciada pela literatura, mas estudos preliminares de nosso grupo dão um indicativo de sua atividade antioxidante (FARIAS et al., 2013; PESSOA et al., 2016).

1.9 *L. tomentosa*

Licania tomentosa (Benth.) Frist, conhecida popularmente como oiti ou oitizeiro, nativa da Mata Atlântica, é uma espécie arbórea, frutífera e perene; com 8 a 15 metros de altura e 30 a 50 cm de diâmetro. A madeira é pesada, resistente, com textura de média para grossa e longa durabilidade. Por proporcionar sombra, existem vários artigos que destacam a sua utilização com objetivo de arborização, sendo utilizadas em praças, jardins, ruas e avenidas, principalmente nas cidades do Norte e litorâneas do Brasil (MONTEIRO et al., 2012).

Na medicina popular, a *L. tomentosa* é utilizada para o tratamento empírico de diabetes (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Estudos também indicam a ação farmacológica de partes dessa planta: as sementes apresentaram inibição do vírus do herpes (MIRANDA et al., 2002), compostos isolados das folhas e frutos indicaram ação anticarcinogênica (FERNANDES et al., 2003) e leishmanicida (RIBEIRO et al., 2014).

A ação terapêutica pode relacionar-se, em parte, aos constituintes químicos e ação antioxidante presentes nesta espécie. De fato, estudo realizado por Pessoa e colaboradores (2016), destacou a presença de ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, epicatequina, ácido elágico, rutina, quercetina, quercitrina e canferol em extratos etanólicos da *L. tomentosa* e suas frações (metanólica, acetato, clorofórmio e aquosa). Esses autores também ressaltaram a correlação direta dos flavonoides com as atividades determinadas nos

ensaios de DPPH e TBARS sem o estresse do ferro. Já é bem relatado na literatura, a notoriedade da atividade antioxidante dos flavonoides, sendo a quercetina utilizada, frequentemente, como controle positivo dos ensaios (LU et al., 2014).

Estudos que relatem o valor nutricional da polpa e semente da *L. tomentosa* são escassos e incompletos. Estudo realizado por Teixeira (2012) com polpa, semente e casca da *L. tomentosa* mostrou que tanto a polpa como a semente não são boas fontes de lipídios (< 2%) e proteínas (< 10%). Entretanto, ambos se destacaram nos teores de fibra (> 20%).

Tendo em vista que a espécie *L. tomentosa* demonstrou atividade antioxidante, em estudo preliminar do nosso grupo, aliando-se ao fato de ser espécie frutífera, ainda pouco estudada na literatura, e sem qualquer histórico de uso seguro, torna-se relevante uma pesquisa que agregue valor nutricional, atividade antioxidante e segurança de uso de *L. tomentosa*.

Figura 2: Planta *Licania tomentosa*. (A) Porte Arbóreo; (B) Caule espesso; (C) Flores; (D) Fruto.



Fonte: Instituto Brasileiro de Florestas (A,B), coleccionandofrutas.org (C), frutiferas.com.br (C).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Realizar caracterização nutricional, determinar o potencial antioxidante e avaliar a segurança de uso de frutos de *Licania tomentosa* (Benth) Fritsch.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o valor nutricional por meio da determinação da composição proximal, de vitaminas, de minerais e presença de fatores antinutricionais de natureza proteica das polpas e sementes da *L. tomentosa*;
- Realizar a caracterização fitoquímica por meio de técnicas fotolorimétricas e cromatográficas das polpas e sementes de *L. tomentosa*;
- Avaliar *in vitro* a presença de atividade antioxidante dos extratos etanólicos das polpas e sementes de *L. tomentosa*;
- Realizar a avaliação toxicológica de extratos etanólicos das polpas e sementes da *L. tomentosa* por meio de testes de hemólise, toxicidade aguda e toxicidade doses repetidas (28 dias).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho abordou a espécie vegetal *L. tomentosa*, arbórea, frutífera e perene, nativa da Mata Atlântica, mas adaptada às condições adversas do bioma Caatinga. Sobre esta planta existem alguns estudos na literatura, descrevendo o seu uso farmacológico, porém os estudos relatando suas características nutricionais são escassos. Anteriormente, nosso grupo realizou algumas investigações sobre o potencial antioxidante da semente desta espécie, o que nos motivou a prosseguir com os estudos de todo o fruto.

Neste trabalho foi realizada a caracterização nutricional das farinhas de amostras de sementes e polpas da referida espécie coletadas nos anos 2015 e 2016. Foi possível constatar que as sementes (LTS1 e LTS2) e polpas (LTP1 e LTP2) da *L. tomentosa* são boas fontes de fibra alimentar, com teores de minerais similares ou superiores a frutos tradicionalmente consumidos e que não apresentam os fatores antinutricionais de natureza proteica pesquisados (lectina e inibidores de proteases).

Além disso, extratos etanólicos das sementes (EELTS1 e EELTS2) e polpas (EELTP1 e EELTP2) foram preparados para, em seguida, determinar a composição de seus compostos fenólicos. Em relação ao EELTP1 e EELTP2, não foi identificado nenhum composto, além disso, as polpas também não se mostraram eficazes na atividade de neutralização do radical DPPH (DPPH acima de 1.000 µg/mL).

Já os extratos EELTS1 e EELTS2 apresentaram perfis fenólicos promissores e compostos nunca antes descritos na literatura para a espécie estudada, com predomínio de flavonoides. Em relação às atividades antioxidantes, os extratos etanólicos das sementes agiram por meio de diferentes mecanismos: neutralizando radical livre (DPPH), impedindo a peroxidação lipídica (TBRAS) e reduzindo o íon ferro (FRAP). Este fato é importante, uma vez que várias doenças crônicas são causadas ou geram estresse oxidativo.

Também foram realizados os testes de segurança de uso dos extratos EELTS1, EELTS2, EELTP1 e EELTP2. Em relação à atividade hemolítica, a presença de hemólise foi verificada apenas nas sementes em concentrações específicas e com valores abaixo de 30% (500 µg/mL no sangue humano e 2.000 µg/mL no sangue de coelho). Os resultados dos ensaios de toxicidade oral aguda com dose única não apresentaram quaisquer indício de toxicidade, sendo digno de nota que nenhum animal morreu durante o experimento. Da

mesma forma, os ensaios de toxicidade oral aguda com dose repetida também não detectaram quaisquer alterações no tamanho relativo dos órgãos dos animais, nos parâmetros hematológicos ou nos parâmetros histopatológicos dos órgãos. Em relação aos parâmetros séricos bioquímicos, apenas os níveis de potássio, nos machos, e os de fosfatase alcalina, nas fêmeas, mostraram alterações quando comparadas com o grupo controle.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a polpa de *L. tomentosa* pode ser explorada no ponto de vista nutricional, seja através do incentivo de seu consumo ou na forma de um ingrediente alimentício. Já a semente ganha destaque nutricional e farmacêutico, sendo uma alternativa para a indústria no desenvolvimento de um bioproduto. Apesar das sementes terem se destacado nas atividades antioxidantes *in vitro*, é importante a realização de ensaios *in vivo* que comprovem a ação antioxidante do extrato etanólico desta espécie, bem como um aprofundamento químico para elucidar os compostos presentes na *L. tomentosa*. Além disso, embora a polpa e a semente, tenham se mostrado seguras nas concentrações testadas, faz-se necessário, uma avaliação adicional de outros testes de toxicidade para estabelecer um perfil mais completo de segurança de uso.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G.O.; VIJAY, K.M.; GOPOLA, K.A.G; VARANDARAJ, M.C.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal Food Science Technology**. v 35, n. 4, p. 283-398, 1998.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonouns in Northeast of Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.17, p.114-140, 2007.
- AGUIAR, T.M.; SABAA-SRUR, A.U.O.; SAMICO, G.F. Potencial nutritivo e características físicas e químicas do abajeru. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 41, n. 1, p.102-109, 2011.
- AL-JABER, N.A., AWAAD, A.S., MOSES, J.E., Review on some antioxidant plants growing in Arab world. **Journal of Saudi Chemical Society**. v. 15, p. 293-307, 2011.
- ALMEIDA, T.S.; NETO, J.J.L; SOUSA, N. M.; PESSOA, I.P.; VIEIRA, L. R.; MEDEIROS, J. L. ; BOLIGON, A. A; HAMERS, A.R.M.; FARIAS, D. F.; PEIJNENBURG, A.; CARVALHO, A.F.U. Phenolic compounds of *Triplaris gardneriana* can protect cells against oxidative stress and restore oxidative balance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 93, 2017, 1261–1268, 2017.
- ALU'DATT, M.H.; RABABAH, T.; ALHAMAD, M.N.; AL-MAHASNEH, M.A. ; ALMAJWAL, A.; GAMMOH, S.; EREIFEJ, K.; JOHARGY, A.; ALLI, I. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**. v. 218, p. 99-106, 2017.
- AMZA, T.; AMADOU, I.; ZHU, K.; ZHOU, H. Effect of extraction and isolation on physicochemical and functional properties of an underutilized seed protein: Gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*). **Food Research International**. v. 44, p. 2843–2850, 2011.
- AMEH, S.J.; OBODOZIE, O.O.; INYANG, U.S.; ABUBAKAR, M.S.; GARBA, M. Current phytotherapy – a perspective on the science and regulation of herbal medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, p. 72 – 81, 2010.
- ANVISA. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**: Gerência de produtos especiais e gerência geral de alimentos. Brasília, 2013.
- BAREA-ÁLVAREZ, M.; ANDRADE, C.D.; HARO, A.; OLALLA, M.; SEIQUER, I.; RUFÍAN- HENARES, J.A. Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 48, p.34-40, 2016.
- BARREIROS, A.L.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BHATTACHARYYA, A., CHATTOPADHYAY, R., MITRA, S., CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiology Review**. v. 92, p. 326-354, 2014.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**. v. 5, p.9-19, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga, Serviço florestal brasileiro, Brasília, DF, 2010.

BUENO, A.L.; CZEPIELEWSKI, M.A. The importance for growth of dietary intake of calcium and vitamin D. **Jornal de Pediatria**. v. 84, n. 5, p. 386-394, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**. v.51, p. 15-25, 2013.

CASTILHO, R. O; KAPLAN, M. A.C. Constituintes químicos da licania tomentosa Beth (Chrysobalanaceae). **Química Nova**. v. 31, n.1, São Paulo, 2008.

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Review of dried fruits: phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. **Journal of Functional Foods**. v. 21, p.113-132, 2016.

COSTA, D. C.; COSTA, H. S.; ALBUQUERQUE, T. G.; RAMOS, F., CASTILHO, M. C.; SANCHES-SILVA, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science & Technology**. v. 45, p. 336-354, 2015.

DURANTI, M.; CONSONNI, A.; MAGNI, C.; SESSA, F.; SCAFARONI, A. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use a functional and nutraceutical ingredients. **Food Science & Technology**. v. 19, p. 624-633, 2008.

DUTRA, R.C., CAMPOS, M.M, SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug Discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. v. 112, p.4-29, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília, 2006. 296p.

FARIAS, D.F., SOUZA, T.M., VIANA, M.P., SOARES, B.M., CUNHA, A.P., VASCONCELOS, I.M., CARVALHO, A.F.U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 510- 736, 2013.

FEITOSA, E. A.; XAVIER, H.S.; RANDAU, K. P. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 22, n. 5, p. 1181-1186, 2012.

FERNANDES, J.; CASTILLO, R.O.; DA COSTA, M.R.; SOUZA, W.K.; COELHO KAPLAN, M.A.; GATTAS, C.R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**. v. 2, n. 20, p. 165-169, 2003.

FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**. n.4, p.32-39, 2007.

FLORENCE, N.T; CLARICE, D.N.; HUBERT, D.J; RACELINE, G.K.; ADOLFE, M.; PIERRE, K.; THEOPHILE, D. Acute and sub-acute toxicity of a lyophilized aqueous extract of the aerial part of *Spilanthes africana* Delile in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 172, p. 145-154, 2015.

GARIGLIO, M.A.; SAMPAIO, E.V.S.B; CESTARO, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. 368 p.

GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. **Cellular Signaling**. v. 19, p.1807-1819, 2007.

GUPTA, U.C.; GUPTA, S.C. Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review. **Pedosphere**. v. 24, n. 1, p. 13-38, 2014.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B., Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: Avoiding pitfalls. **Biomedical Journal**. v. 37, n. 3, p. 99-105, 2014.

IANNITTI, T., PALMIERI, B. Antioxidant therapy effectiveness: on up date. **Medical and pharmacological sciences**. v. 13, p. 245-278, 2009.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**. v. 126, n.4, p. 1821-1835, 2011.

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**. v. 89, p. 217-233, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **Hindawi Publishing Corporation**. p. 1-16, 2013.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. v.4, n.8, p. 118-126, 2010.

LU, Y.; SHIPTON, F.N.; KHOO, T.J.; WIART, C. Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. **Pharmacology & Pharmacy**. v. 5, p. 395-400, 2014.

MARANGON, G.P, FERREIRA, R. L. C., LIRA, D. F. S., SILVA, E. A., LOUREIRO, G. H. **Estrutura e padrão espacial da vegetação em uma área da caatinga**. *Floresta*. v. 43, n. 1, p. 83-92, 2013.

MIRANDA, M.M; GONÇAVES, J.L; ROMANOS, M.T.; SILVA, M.H.; EJZEMBERG, R.; GRANJA, L.F.; WIGG, M.D. Anti-herpes simplex vírus effect of a seed extract from tropical plant *Licania tomentosa* (Beth) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytomedicine**. v.9, p. 641-645, 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2018.

MONTEIRO, K.L; OLIVEIRA, C.; SILVA, B. M. S.; MORÔ, F. V.; CARVALHO, D. A. Caracterização morfológica de frutos, de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de *Licania Tomentosa* (Benth.) Fritsch. **Ciência Rural**. v. 42, n. 1, p. 90-97, jan. 2012.

MOURA, N.S.; VASCONCELOS, A.C.M.; BERNABÉ, B.M.; TEIXEIRA, L.J.Q.; SARAIVA, S.H. Ensaio toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v. 8, n. 15, 2012.

NASCIMENTO, V.T., SOUSA, L.G., ALVES, A.G.C., ARAÚJO, E.L., ALBUQUERQUE, U.P. Rural fences in agricultural landscapes and their conservation role in an area of Caatinga (dryland vegetation) in Northeast Brazil. **Environment, Development and Sustainability**. v.11, n.5, p.1005-1029, 2008.

NIJVELDT, R.J., NOOD, E.V., HOORN, D.E. C.V., BOELEN, P.G, NORREN, K.V, LEEVW, P.A.M.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. **American Journal Clinical Nutrition**. v. 74, p. 418-425, 2001.

PESSOA, I.P.; NETO, J.J.L.; ALMEIDA, T.S.; FARIAS, D.F.; VIEIRA, L. R.; MEDEIROS. J.L. BOLIGON, A.A.; PEIJNENBURG, AD; CASTELAR, I. ; CARVALHO, A.F.F.U. Polyphenol Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Seeds from Two Underexploited Wild *Licania* Species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. **Molecules**. v. 21, n. 1755, p. 1-16, 2016.

PHAM-HAY, L.A., HUA, H., PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**. v.4, n. 2, 2008.

PIAZZON, A.; VRHOVSE, K.U; MASUERO, D.; MATTIVI, F.; MANDOJ, F.; NARDINI, M. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. **Jornal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 60, n. 50, p. 12312-12323, 2012.

RAVISANKAR, P.; REDDY, A.A.; NAGALAKSHMI, B.; KOUSHIK, O.S.; KUMAR, B.V.; ANVITH, P.S. The Comprehensive Review on Fat Soluble Vitamins. **IOSR Journal of Pharmacy** . v. 5, n.11, p.12-28, 2015.

RIBEIRO, T.G; CHÁVEZ- FUMAGALLI, M.A.; VALADARES, D.G.; FRANCA, J.R.; LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; ANDRADE, P.H.R.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.; ARRUDA, A.L.A.; FARACO, A.A.G.; COELHO, E.A.F. CASTILLO, R.O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**. v.143, p.60-68, 2014.

RIZVI, S.; RAZA, S.T.; AHMED, F.; AHMAD, A.; ABBAS, S.; MAHDI, F. The role of vitamin E in human health and some diseases. **Sultan Qaboos University Medical Journal**. v. 14, n. 2, p.157-175, 2014.

SAMPAIO, B.L.; EDRADA-EBEL, R.; COSTA, F.B. Effect of the environment on thesecondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**. p.1-11, 2016.

SANTOS, A.K.; ARAGÃO FILHO, O.P.; AGUIAR, C.M.; MILINSK, M.C.; SAMPAIO, S.C.; PALÚ, F.; SILVA, E.A. Chemical composition, antioxidant activity and thermal analysis of oilextracted from favela (*Cnidoscopus quercifolius*) seeds. **Industrial Crops and Products**. v. 97, p. 368-373, 2017.

SANTOS, T.C.; JÚNIOR, J.E.N.; PRATA, A.P.N. Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na Alimentação Humana. **Scientia Plena**. v. 8, n. 4, p.1-7, 2012.

SAXENA, M., SAXENA, J., PRADHAN, A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. **International Journal Pharmaceutical Science**. v. 16, n. 28, p. 130-134, 2012.

SCHWARTZ, H.; SONTAG, G. Determination of secoisolariciresinol, lariciresinol and isolariciresinol in plant foods by high performance liquid chromatography coupled with coulometric electrode array detection. **Journal of Chromatography B**. v. 838, p. 78-85, 2006.

SEN, S., CHAKRABORTY, R., SRIDHAR, C., REDDY, Y.S.R, DE BIPLAD. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v. 3, n.1, p. 91-100, 2010.

SHAH, S. M. M.; SADIQ, A.; SHAH, S. M. H.; ULLAH, F., Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 14, n.1, p. 181, 2014.

SHAIKH, N.; MARRI, A.; PATHAN, M.; QURESHI, B. Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles. **European Academic Research**. v. 2, n. 10, 2015.

SILVA, G.G; SOUZA, P.A; MORAIS, P.L.D.; SANTOS, E.C.; MOURA, R.D.; MENEZES, J.B. Caracterização do fruto de ameixa silvestre (*Ximenia americana L.*). **Revista Brasileira Fruticultura**. v. 30, n. 2, p. 311-314, 2008.

SILVA, A.R.H; MOREIRA, L.R.; BRUM, E.S.; FREITAS, M.L.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; ROMAN, S.S.; MAZZANTI, C.M.; BRANDÃO, R. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethanopharmacology**. v. 153, p. 908-916, 2014.

SILVA, L.R; MARTINS, L.V; CALOU, I. B.F.; MEIRELES, M.S.D; FERREIRA, P.M.P; PERON, A.P. Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico . **Acta Toxicologica Argentina**. v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SLAVIN, J.L.; LLOYD, B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. **Advances in Nutrition**. v.3, p.506-516, 2012.

STEWART, N. The health benefits of dietary fiber consumption of adults in the United States. **Graduate Research Papers**. v. 37, P. 4-40, 2014.

SOETAN, K.O.; OLAIYA, C.O.; OYEWOLE, O.E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**. v. 4, N. 5, p. 200-222, 2010.

TARIQ, A; MUSSARAT,S; ADNAN, M. Review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological evidence of Himalayan anticancer plants. **Journal et Biophysica Acta-Biomembranas**. v.164, p. 96-119, 2015.

TEIXEIRA, L. L. Análises bromatológicas e fitoquímicas em frutos de *Licania tomentosa* (Benth) frisch. Dissertação (Mestrado em química) – Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011, 108p.

TROVÃO D.M.B. M, FERNANDES P. D, ANDRADE L.A, DANTAS NETO J. Seasonal variations of physiological aspects of Caatinga species. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**. v. 11, p.307-311, 2007.

VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B.; MACENA, R.H.M.; BASTOS, V.P.D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 16, n.3, p. 213-219, 2014.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MANCOL, I., CRONIN, M. T. D. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 39, n. 1, p. 44- 84, 2007.

YAKANDAWALA, D.; MORTON, C.M.; PRANCE, G. T. Phycogenetic relationships of the Chrysobalanaceae in ferred from chloroplast, nuclear and morphological data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 97, p. 259-281, 2010.

APÊNDICE A – ARTIGO DA TESE 1

Manuscrito formatado e submetido à revista *Industrial Crops and Products* (Impact Factor: 3.18).

Chemical Composition, Nutritional Properties and Antioxidant Activity of *Licania tomentosa* (Benth.) Fruits

Jackeline Lima Medeiros¹, Thiago Silva de Almeida¹, Luiz Carlos Pereira Almeida Filho¹, Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro², Edy Sousa de Brito², Marcelo Antonio Morgano³, Marta Gomes da Silva³, Davi Felipe Farias², Ana Fontenele Urano Carvalho*¹.

¹ Federal University of Ceara, Biochemistry and Molecular Biology Department, Campus Pici, BL 909, Zip code 60400-900, Fortaleza, CE, Brazil;

² Embrapa Agroindústria Tropical, 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil.

³ Institute of Food Technology, 13070178, Campinas, SP, Brazil.

⁴ Department of Molecular Biology, Federal University of Paraiba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil;

*Corresponding author:

Prof. Dr. Ana F. U. Carvalho

E-mail: aurano@ufc.br

Phone/Fax: +55 85 33669830

Abstract

In order to add value to underexploited plant species in Brazil we aimed to perform a nutritional characterization of *Licania tomentosa* pulps (LTP1 and LTP2) and seeds (LTS1 and LTS2) collected in 2015 and 2016, to identify the polyphenol compounds and to determine the antioxidant capacity by different methods of ethanolic extracts of the respective flours (EELTP1, EELTP2, EELTS1, EELTS2). Both pulps and seeds were good sources of fiber and presented moderate mineral content and absence of the investigated antinutritional factors. Eleven compounds were identified in EELTS1 and EELTS2 with predominance of flavonoids. Both showed remarkable antioxidant activity in the DPPH (SC_{50} of 15.87 ± 0.88 and 10.30 ± 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively), TBARS (IC_{50} 18.46 ± 2.24 and 20.84 ± 2.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) and FRAP assays (RC_{50} 0.203 ± 0.00 and 0.309 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). *L. tomentosa* has nutritional potential, it is a good source of bioactive antioxidant molecules and may be an alternative for the industry for the development of bioproducts.

Key words: Chrysobalanaceae, phenolic compounds, nutritional composition, antioxidant activity, wild plants, added value

1.Introduction

Brazil is a country of remarkable biodiversity and although plants are considered sources of an arsenal of bioactive molecules with pharmacological, food and industrial applications, much of the potential of Brazilian species is still unknown (Almeida et al., 2017). It is already well established that the regular consumption of fruits and vegetables have health benefits, since they reduce the risk of developing some pathologies, such as: cancer, diabetes, obesity, metabolic syndrome and Alzheimer's disease. This association occurs as a function of vitamins, minerals and bioactive molecules such as phenolic compounds present in these foods (Barea-Alvarez et al., 2016; Chang et al., 2016).

The bioactive potential of plants as well as the nutritional value is determined by the production and accumulation of primary and secondary metabolites, which may be different among plants of the same species due to the different environmental conditions. The chemical interaction between plants and their environment is mediated mainly by the biosynthesis of secondary metabolites, which exert their biological roles as an adaptive response to the environment. The main factors influencing the quali- and quantitative variation of the secondary metabolites are: local adaptation, temperature, altitude, ultraviolet radiation, water availability, soil composition and luminosity (Pavarani et al., 2012; Sampaio et al., 2016).

Licania tomentosa (Benth.), popularly known in portuguese as 'oiti' or 'oitizeiro', is a tree species, fruitful and perennial, native to the Atlantic Forest. In order to provide shade they are used in afforestation in squares, gardens, streets and avenues, mainly in the northern and coastal cities of Brazil (Monteiro et al., 2012). In popular medicine, *L. tomentosa* is used for the empirical treatment of diabetes (Agra et al., 2007). Phylogenetic studies have also indicated the pharmacological action of parts of this plant: extracts of leaves and fruit showed anticarcinogenic (Fernandes et al., 2003) and leishmanicidal activities (Ribeiro et al., 2014).

A previous study carried out by our group investigated the antibacterial, anticholinesterase and antioxidant activity of 21 seeds of Brazilian semiarid plants and revealed that *L. tomentosa* was one of the species that showed the best results regarding antioxidant activity (Farias et al., 2013). Along with this, the fruits of *L. tomentosa* are edible, with pulp and yellowish bark, fibrous, with almonds rich in oil and when ripe they are much sought after by the local fauna. However, they are little known nutritionally and therefore, not used in the agribusiness for the elaboration of products such as jelly, ice cream, sweets or even to commercialize the frozen pulp (Sousa et al., 2013). The objective of the present study was the physical and nutritional characterization of the *L. tomentosa* seeds and pulp, as well as the quantification and identification of the phenolic compounds and the determination of the antioxidant capacity in the ethanolic extracts of their seeds and pulp. In addition, since the environmental factor influences the primary and secondary metabolism of plants, comparative analyzes of the materials collected from the fruits were carried out in 2015 and 2016, in order to verify possible differences influenced by the environmental changes that may have occurred during this period.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemical used in this project had analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, ascorbic acid, ferrous sulfate and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetraethoxypropane (MDA), bovine serum albumin (BSA) fraction V free fatty acid, agarose type I, sodium azide, aluminium chloride, potassium acetate, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin, kaempferol, catechin, epicatechin and Folin–Ciocalteu’s phenolic reagent were acquired from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO,

USA). N-acetyl-L-cysteine (NAC), tert-butyl hydroperoxide solution (Luperox, TBHP) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) and were purchased from Sigma-Ildrich (Zwijndrecht, TheNetherlands).

2.2. Plant material

Samples of fresh fruits of *L. tomentosa* were collected at the end of the fruiting period in January 2015 and 2016 at Campus do Pici, Fortaleza, Ceará State (3°44'32.6"S 38°34'30.5"W). After the collection, exsicates were prepared and deposited at the Prisco Bezerra Herbarium (EAC 40215), located at the Federal University of Ceará - UFC (Fortaleza, Brazil). The seeds were separated from the pulp and both were dried at 50 °C in oven (FANEM, Model 002 CB, São Paulo, Brazil) for 24 h. The seeds and the pulp were then ground in a coffee grinder (Cadence, Itajaí, Brazil) to obtain a fine powder (particle size <0.5 mm), which was stored at room temperature (25 °C) in hermetically sealed plastic pots until the analysis. For nutritional composition analysis, the pulp and seed flours collected in 2015 and 2016 were denominated as follows: LTP1, *L. tomentosa* pulp flour collection 1 (2015); LTP2, *L. tomentosa* pulp flour collection 2 (2016); LTS1, *L. tomentosa* seed meal collection 1 (2015); LTS2, *L. tomentosa* seed meal collection 2 (2016).

2.3. Physical characterization of fruits and seeds

A total of 50 fruits and 50 seeds were selected for the physical characterization from the collections performed in 2015 and 2016. The diameter and length of the fruit and seed samples were measured with the aid of a pachymeter; and weighted in a digital balance (sensitivity 0.0001g) (Bioprecisa, Model FA2104N, São Paulo, Brazil).

2.4. Nutritional Assessment

2.4.1. Proximate composition

Pulps and seeds were analyzed for humidity, ash and total lipid contents according to AOAC (2000). Nitrogen was estimated by the micro-Kjeldahl method (AOAC, 2000) after sample acid digestion (Marconi equipment, MA 448, Piracicaba, Brasil), followed by a photolorimetric assay (Baethgen; Alley, 1989). Total protein content was calculated using the conversion factor $N \times 6.25$. Total dietary fiber was determined by using an enzymatic kit (TDF-100A, Sigma–Aldrich Co., MO, USA) and following the Prosky-AOAC method (AOAC, 2000). Digestible carbohydrate content was calculated from the percentile difference in relation to all other constituents according to the formula:

$$[100 - (\% \text{ crude protein} + \% \text{ crude lipid} + \% \text{ ash} + \% \text{ dietary fiber})].$$

2.4.2. Toxic and antinutritional factors

2.4.2.1 Crude extracts preparation

The crude extracts of pulp and seed samples were obtained according to Vasconcelos et al. (2010). Flours obtained as previously were mixed individually with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.15 M sodium chloride in a 1:10 (w/v) ratio and subjected to constant stirring for 4 h at 5 ± 2 °C. The resulting suspensions were centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C (Zentrifugen Rotina, model 380R, Tuttlingen, Germany) and the supernatants were collected and lyophilized for subsequent analyses.

Erythrocytes suspension Rabbit blood was collected with a syringe from the marginal ear vein. Rat blood was collected from the retro-orbital plexus under anesthesia. Human blood was obtained from an adult, healthy volunteer donor. Samples of 2 mL each were collected in EDTA tubes, homogenized and conditioned at 4 °C until the erythrocytes were isolated. All protocols with animals, adopted in this work, were previously approved by the Ethics

Commission in Animal Research (CEUA) of The Federal University of Ceará. To obtain the erythrocytes and prepare the suspensions, the blood samples were centrifuged (Fanem, São Paulo, Brazil) at 2,000 x g, 25 °C for 10 min. The supernatant was carefully discarded. To the erythrocyte precipitate 0.9% NaCl was added in order to replace the withdrawn plasma volume, the sample was homogenized and centrifuged again under the same conditions. The procedure was repeated for at least five times until a completely clear supernatant was obtained. The red blood cell precipitate was used to prepare 1% suspensions for hemolytic activity assay.

2.4.2.2. Lectins, trypsin and chymotrypsin inhibitor assays

The presence of lectins in the crude aqueous extract of pulps and seeds was evaluated by hemagglutinating activity assays, as described by Carvalho et al (2012).

The inhibitory activity towards chymotrypsin and trypsin was determined using azocasein as substrate (Erlanger et al., 1966). The activity was expressed as inhibition units.mg of proteins⁻¹, which is defined as decreasing in 0.01 absorbance at 440 nm.

2.4.3. Mineral composition

2.4.3.1. Microwave assisted closed digestion system

The mineral composition was determined according to AOAC (2012). A closed microwave digestion system (Start D, Milestone, Sorisole, Italy) was used to determine the minerals as follows: 500 mg of sample was weighed into a PTFE digestion flask, 8 mL concentrated HNO₃ and 2 mL H₂O₂ were added. The flasks were, then, sealed, transferred to a microwave digester, where the samples were digested. Four heating ramps were used with the application of 1,000 W of power: (a) room temperature to 70 °C in 5 min; (b) from 70 to 120 °C in 5 min; (c) from 120 to 170 °C in 5 min and (d) maintain at 170 °C for 25 min. After

cooling, the flasks were opened and the resulting solution transferred to a 25 mL Falcon tube in 5% (v/v) HNO₃.

2.4.3.2. Determination of Ca, Se, Cu, Fe, P, Mg, Mn, K, Na, Zn by ICP OES

The minerals were determined using ICP-OES, model 5100 VDV (Agilent Technology, Tokyo, Japan) equipped with a double pass nebulization camera and sea-spray nebulizer. Liquid argon of 99.996% purity (Air Liquide, São Paulo, Brazil) was used in the determination of Ca, Se, Cu, Fe, P, Mg, Mn, K, Na, Zn in order to generate the plasma, as both the nebulizing gas and the auxiliary gas. The optimized operational conditions of the equipment were as follows: power of the radiofrequency generator (1,200 W); flow rate of the nebulizer argon (0.5 L min⁻¹); main argon flow rate (12 L min⁻¹ Air); auxiliary argon flow rate (1 L min⁻¹ Air); sample flow rate (0.5 L min⁻¹), axial mode of vision; number of replicates (n=3) and the following wavelengths: Ca (317.933 nm); Se (196.026 nm); Cu (324.754 nm); Fe (259.940 nm); K (766.491 nm); Mg (279.553 nm); Mn (257.610 nm); Na (589.592 nm); P (213.618 nm) and Zn (206.200 nm).

The analytical curves were prepared from standard certified solutions at: 10,000 mg L⁻¹ for Na, K, P, Mg, Ca and 1000 mg L⁻¹ for Mn, Cu, Fe, Se and Zn (Merck, Darmstadt, Alemanha) in 5% (v/v) HCl solution. The minerals were determined by ICP OES, using the external calibration method, with analytical curves prepared with solutions at the following concentrations: 0.04 to 41 mg 100 g⁻¹ for Na and Ca; 0.06 to 61 mg 100 g⁻¹ for P and K; 0.001 to 1.000 for Fe, Cu, Se, Mn and Zn; 0.00025 to 0.1000 mg 100 g⁻¹ for Se and 0.015 to 14.5 mg 100 g⁻¹ for Mg.

2.4.4. Vitamin E and Carotenoids

Tocopherols and vitamin E were determined according to Brubacher et al (1985). Briefly, about 2 g of each sample (LTP1, LTP2, LTS1 and LTS2) were saponified with 50% hot potassium hydroxide, in a temperature between 80 and 90 ° C, for 30 min. The unsaponifiable material was extracted from the matrix with a mixture of ethyl ether: petroleum ether: ethyl acetate (63:32:05, v / v / v) sequentially. The fractions were combined and washed with deionized water to neutral pH. The extract was dried under nitrogen flow and diluted in *n*-hexane. The detection and quantification of tocopherols occurred in a Prominence LC-20A liquid chromatograph coupled to the fluorescence detector RF-10AXL (Shimadzu, Tokyo, Japan), using the excitation wavelength of 292 nm and emission of 336 nm. The analytes were resolved on a LiChrospher Si 60 normal phase column (12.5 cm long x 4 mm di and 5µm particles, Merck, Germany), having mobile phase *n*-hexane: ethyl acetate: acetic acid (97.6: 1.8: 0.6, v / v / v) in an isocratic system.

Carotenoids were determined according to Carvalho et al (1992). About 2 g of the triplicate samples were hydrated and the pigments were extracted with 30 mL portions of acetone in a homogenizer (Marconi, TE 102, Piracicaba, Brazil) until the acetone became colorless. The pigments were transferred to petroleum ether and the acetone removed by the addition of water. The extract was concentrated and the volume adjusted to 10 mL with petroleum ether. Carotenoid quantification occurs at 453 nm in a Cary 50 spectrophotometer (Varian, Victoria, Australia), using a value of 2592 absorbance units. All assays were performed in triplicate.

2.5. Chemical characterization of ethanol extracts of pulps and seed

2.5.1. Ethanolic extracts preparation

The pulps and seeds were separately oven dried at 50 °C, then ground to increase the contact surface, and submerged separately in ethanol PA (1: 2, m / v) for prolonged extraction

at room temperature with solvent change every three days of extraction, following the methodology described by Farias et al. (2013), with modifications. The extracts were filtered on Whatman® No.1 filter paper to remove minor impurities, and then the solvent was evaporated on a rotary evaporator under reduced pressure and temperature controlled between 50 °C, with subsequent removal of excess ethanolic solution in a water bath. The ethanolic extracts obtained were stored in tubes protected from light at -20°C until analysis. The ethanolic extracts of pulps and seeds, collected in 2015 and 2016, were named as follows: EELTP1, ethanolic extract from *L. tomentosa* pulp collection 1 (2015); EELTP2, ethanolic extract from *L. tomentosa* pulp collection 2 (2016); EELTS1, ethanolic extract from the *L. tomentosa* seed collection 1 (2015); EELTS2, ethanolic extract from e *L. tomentosa* seed collection 2 (2016).

2.5.2. Total Phenols

Total phenol content was determined following the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999) with some modifications, as described previously (Pessoa et al., 2016).

2.5.3. Total flavonoids

The aluminium chloride colorimetric method was used to determine the flavonoid content (Chang et al., 2002). Briefly, quercetin (10 mg) was dissolved in 80% (v/v) ethanol and diluted to 25, 50 and 100 µg/mL to build a calibration curve. Aliquots (0.5 mL) of the diluted standard solutions were separately mixed with 1.5 mL of 95% (v/v) ethanol, 0.1 mL 10% (m/v) aluminium chloride, 0.1 mL 1 M potassium acetate, and 2.8 mL distilled water. After incubation at room temperature (22 ± 3 °C) for 30 min, the absorbance readings of the reaction mixture were measured at 415 nm (Shimadzu UV-160A spectrophotometer, Kyoto, Japan). For the test samples and blank, aluminium chloride was substituted by 0.5 mL of the

ethanolic extract and distilled water, respectively. The assay was performed in triplicate and expressed as mg quercetin equivalent / g sample.

2.5.4. Identification of Phytochemicals by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

The identification of the phytochemicals in EELTP1, EELTP2, EELTS1, EELTS2 was performed in an UPLC system (Waters) coupled to a Quadripole system / Time of Flight (QtoF, Waters). Chromatographic runs were performed on a Waters Acquity UPLC BEH column (150 x 2.1 mm, 1.7 μ m), fixed temperature of 40 °C, mobile water phases with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B), gradient ranging from 2 to 95% B (15 min), flow rate of 0.4 mL / min and injection volume of 5 μ L.

The ESI mode was acquired in the range of 110-1180 *Da*. From source temperature set at 120 °C, desolvation temperature 350 °C, desolvation gas flow of 500 L / h, extraction cone of 0.5 V, capillary voltage of 2.6 kV. ESI + mode was acquired in the range of 110-1180 *Da*, fixed source temperature of 120 °C, desolvation temperature 350 °C, desolvation gas flow of 500 L / h and capillary voltage of 3.2 kV. Leucine enkephalin was used as a lock mass. The acquisition mode was MS^E. The instrument was controlled by Masslynx 4.1 software (Waters Corporation, Waters, Milford, USA)

2.5.5. In vitro Antioxidant activity

2.5.5.1. DPPH Radical Scavenging

The antioxidant activity of seed and pulp ethanolic extracts was evaluated using the photo-colorimetric method DPPH, based on the scavenging capacity to neutralize DPPH free radical (Zhang et al., 2014). Briefly, 100 μ L 0.3 mM ethanolic DPPH solution were added to 100 μ L of the test sample also dissolved in ethanol, at concentrations ranging from 0.5 to 512

$\mu\text{g/mL}$, in triplicate, in a 96-well microplate. The negative control consisted of 100 μL DPPH and 100 μL ethanol. The reaction was proceeded in the dark at room temperature (22 ± 3 $^{\circ}\text{C}$) for 30 min and the absorbance readings were taken in a spectrophotometer at 518 nm. DPPH-scavenging activity was calculated by the following formula: scavenging activity (%) = $100 \times (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}$. SC_{50} (the sample concentration needed to scavenge 50% of DPPH radical) was obtained by plotting the DPPH-scavenging percentage of each sample against the sample concentration. Ascorbic acid was used as positive control in this experiment.

2.5.5.2. TBARS Assay

TBARS production was determined using egg yolk phospholipids (Sabir, Rocha, 2008). The phospholipids, obtained from the homogenate of egg yolk membrane, were added to the reaction mixture containing various concentrations of the ethanolic extracts (4 to 100 $\mu\text{g/mL}$) and deionized water to 500 μL final volume. The reaction mixture was pre-incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h in the presence or absence of iron (75 μM) as a lipid peroxidation stress agent. The colour reaction was developed by adding 500 μL acetic acid (20%, v/v) and 500 μL 0.6% (v/v) TBA of aqueous TBA solutions was incubated at 97 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Likewise, a series of dilutions of 0.03 mM MDA standard solution was incubated at 97 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Absorbance readings were measured at 532 nm (Spectronic™ Genesys™ 10 VIS Spectrophotometer 335900, Thermo Fisher Scientific Inc., Wisconsin, USA). TBARS was expressed in μg of MDA/ mL of sample.

2.5.5.3. FRAP Assay

This assay was performed as described by Benzie and Strain (1999). An aliquot (90 μL) of the diluted ethanolic extracts from fruits and seeds was homogenized with 270 μL

distilled water and 2.7 mL of FRAP reagent. Then, they were maintained in a water bath at 37 °C for 30 min. Absorbance readings were measured at 595 nm (Spectronic™ Genesys™ 10 VIS Spectrophotometer 335900, Thermo Fisher Scientific Inc., Wisconsin, USA) using the FRAP reagent as blank. The calibration curve was constructed using different concentrations of ferrous sulfate heptahydrate (0–2000 mM) and the results expressed in millimoles of ferrous sulfate per milligram of seed and pulp ethanolic extracts.

2. 6. Statistical Analysis

Results were expressed as means \pm standard deviation. To evaluate the degree of similarity between the variables, simple comparisons tests (t-test) were performed. The difference was considered statistically significant when $p < 0.05$. For some assays, the results were expressed as EC₅₀ (median effective concentration), which represents the compound concentration where 50% of its maximal effect is observed. In the present study it was expressed as SC₅₀ ("S" for Scavenging) and IC₅₀ ("I" for inhibition).

3. Results and discussion

The analysis of the physical characteristics of *L. tomentosa* fruits and seeds showed that the fruits have elongated format and rounded base, with average values for length, diameter and weight of 7.35 ± 0.12 cm, 4.27 ± 0.06 cm, and 91.54 ± 3.37 g, respectively, in the collection 1, and 7.11 ± 0.11 cm, 4.21 ± 0.06 cm, and 85.43 ± 2.64 g in the collection 2, respectively. On the other hand, the measurements of the seeds are 3.08 ± 0.12 cm, 2.47 ± 0.10 cm, and 39.78 ± 1.28 g for length, diameter, and weight, respectively, in the collection 1, and 2.98 ± 0.09 cm, 2.41 ± 0.09 cm, and 37.71 ± 1.09 g in the collection 2, respectively. There was no statistical difference in weight, diameter or length of the fruits and seeds

collected in the years 2015 and 2016. Moreover, the weight of the seeds constitutes almost 50% of the general mass of the fruit, which motivated us to analyze the nutritional attributes not only of the pulp, but also of the seeds aiming at a possible use as a food ingredient.

The proximate composition of seeds and pulp is shown in Table 1. Both the pulp (LTP1 and LTP2) and seed (LTS1 and LTS2) showed values of lipids, proteins and ashes, similar to those observed in some fruits (< 5%) (Ekpete et al., 2013; Hussain et al., 2010; Islary et al., 2016). However, they are excellent sources of dietary fiber (25% in seeds and 41% in pulp) which is relevant since foods with high fiber content are associated with many beneficial health effects. A generous intake of dietary fiber reduces risk for developing coronary heart disease, hypertension, obesity, diabetes and gastrointestinal disorders (Othman; Ozgoz, 2014).

It is already known that fruits are excellent sources of dietary fiber, and it is worth mentioning that 'oiti' pulp showed values similar or greater than those of some fruits usually consumed by the population. When comparing the results of proximal composition of pulp with those described in the literature, similarity was observed in the values described for apple pulp (Onivogui et al., 2014), in what concerns protein content (1.56%) and lipids (1.31%). Ash values, however, were much lower (about 3%) than those of apple pulp (5.72%), but these values are higher than the average described for fruits in general (Ekpete et al., 2013; Hussain et al., 2010; Islary et al., 2016). In relation to dietary fiber, another study (Bampi et al., 2010), with grape pulp has shown lower values (27.34%) than the ones of the present study (about 40%). When comparing the data on proximal composition of seeds with those of other fruits, similar values were observed with those of apple (Onivogui et al., 2014), with carbohydrate predominance (71.11%), protein content of 2.74% and ash of 2.62%. Nevertheless, the lipid content of apple seeds was quite high (15.86%). Another study, with

grape seeds (Aghamirzaei et al., 2015) has shown higher values for dietary fiber (42.74%) when compared to ours (25%).

Diets rich in fruits and vegetables are widely recommended for health-related benefits due to their concentrations of vitamins, minerals and phytochemicals (Slavin et al., 2012). Vitamin E is a collective term given to a group of fat soluble compounds. There are eight natural forms of vitamin E, named as alpha-, beta-, gamma- and delta- tocopherol and alpha-, beta-, gamma- and delta-tocotrienol which are synthesized by plants from homogentisic acid. Alpha- and gamma-tocopherols are the two major forms of vitamin E, with the relative proportions of them depending on the source (Rizvi et al, 2014). In the present study (Table 2), alpha- and gamma-tocopherol values, respectively in LTS1 (0.74 and 1.02 mg /100 g) and LTS2 (0.38 and 0.33 mg /100 g) were higher than those observed in pulps, LTP1 (0.02 and 0.04 mg /100g) and LTP2 (0.06 and 0.14mg/g). The possibly variable environmental condition (e.g., rainfall patterns) between the two years fruits were collected may have influenced the different results between LTS1 and LTS2 and between LTP1 and LTP2. These better values of alpha-tocopherol in seeds were also similar or even higher than those of α -tocopherol in other fruits pulp (Chun et al., 2006), which showed values ranging from 0.09 to 0.38 mg /100 g in apples; 0.13 mg / 100 g in bananas, 0.38 mg / 100 g in grapes, 1.31 mg / 100 g in kiwi, 0.25 mg /100 g in oranges, 0.06 to 0.21 in pears and 0.02 mg /100 g in pineapple.

With regard to β -, δ -tocopherol and carotenoids, both pulp and seed did not show detectable values. The low vitamin E concentration observed in pulps and seeds was somehow expected, since most fruits and vegetables contain low to moderate levels of vitamin E activity. Nevertheless, due to the abundance of plant-derived foods in our diets, they provide a significant and consistent source of vitamin E. In fact, the richest dietary sources of vitamin E are edible vegetable oils, which contain all different homologues in

varying proportions (Rizvi et al, 2014). In relation to carotenoids, Khoo et al (2011) have also observed low concentrations or not detected values (ND) in the pulp of different fruits: kiwi species (0.074 and 0.092 mg / 100g fresh weight), banana (0.04 to 0.092 mg / 100 g fresh weight), guava (0.001 mg / 100 g fresh weight), star fruit (ND, 0.028 mg / 100g fresh weight), strawberry (ND) and apple (0.031 and 0.036 mg / 100 g fresh weight).

When analyzing the minerals (Table 3) determined in *L. tomentosa*, there was statistical difference between the pulps (LTP1 and LTP2) and the seeds (LTS1 and LTS2). In general, the pulps showed a higher concentration of minerals when compared to the seeds, especially calcium, magnesium, potassium and sodium. When studying different apple cultivars, Lee (2012) observed lower values of calcium (1.97 to 4.97 mg / 100 g), magnesium (2.43 to 3.20 mg / 100 g), phosphorus (10 to 14.7 mg / 100 g), sodium (0.87 to 0.98 mg / 100 g), copper (0.0 to 0.04), zinc (0.03 to 0.09 mg / 100 g) and iron (0.11 to 0.14 mg / 100 g) when compared to those of the present study.

Another study carried out by Pires et al. (2015), when determining the concentration of potassium, phosphorus, calcium, manganese, sodium, magnesium, iron, zinc, copper and selenium in conventional mango pulp, barbados cherry and strawberry also obtained lower or similar results to those of *L. tomentosa* pulp. It can be emphasized that the samples (LTP1, LTP2, LTS1 and LTS2) stand out as good mineral sources, since they present values similar or higher than those of fruits commonly consumed by the population. This result is of great relevance since the minerals participate in different biological processes in our organism, besides being related to the prevention of some pathologies when consumed in a balanced and adequate diet. For example, calcium is the main constituent of bones and teeth, besides its role in the regulation of nerve and muscle function; iron forms the hemoglobin, having as main function oxygen transport; sodium is the main extracellular fluid cation and potassium, the

main intracellular fluid cation, both involved in the maintenance of osmotic pressure (Soetan et al., 2010).

As to the presence of toxic and antinutritional factors, in the present study, the samples (LTS1, LTS2, LTP1, LTP2) did not show any hemagglutinating activity when tested with different types of blood (rabbit, mouse and human) at any of the dilutions (1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16, 1:32 and 1:64). This result remained the same when the hemagglutinating test was run in blood previously treated with trypsin. Thus, no hemagglutinating activity was detected to indicate the presence of lectins. The absence of lectins is considered, from the nutritional point of view, as a positive factor since they are not usually degraded in the gastrointestinal tract and consequently can interfere in the absorption of nutrients (Santos et al., 2014). The samples also showed no inhibitory activity of trypsin and chymotrypsin. This result is also relevant because protease inhibitors are capable of complexing with digestive enzymes, thus inhibiting their catalytic activity, and damaging the digestive process (Dokka; Davuluri, 2014). Thus, our result is a positive one when compared, for example, to those by Diaby et al. (2016) with gingerbread plum seeds, also belonging to *Chrysobalanaceae* family, which detected the presence of trypsin inhibitors in the two sites collected.

In addition to nutritional characterization, we sought to identify phytochemical compounds present in this fruit to relate them to a possible antioxidant activity. For this, the ethanolic extracts were initially prepared and the samples yields were calculated showing similar values between collections: EELTS1 (26.56%), EELTS2 (24.90%), EELTP1 (15.87%) and EELTP2 (16.74%).

The preliminary study of the phytochemical compounds was carried out by the quantitative tests of total polyphenols and flavonoids in EELTP1, EELTP2, EELTS1 and EELTS2 (Table 4). The determination of total polyphenols showed that EELTS2 ($203.00 \pm 1.44 \mu\text{g} / \text{mg}$) had similar concentration of phenolic components when compared to EELTS1

($192.40 \pm 3.12 \mu\text{g} / \text{mg}$). No total polyphenols were detected in EELTP1 and EELTP2. The total flavonoids of EELTS1 and EELTS2 were significantly similar to each other (about $30 \mu\text{g} / \text{mg}$) and higher than EELTP1 and EELTP2 (about $20 \mu\text{g} / \text{mg}$). In order to elucidate the phytochemical profile of these compounds, the UPLC-QTOF of the ethanolic extracts of pulps and seeds was performed. The results (Figures 1 and 2) showed similar profile in the two samples (EELTS1 and EELTS2), with a total of 26 peaks, of which tentatively were identified. The compounds identified in EELTS1 (Table 5) and EELTS2 (Table 6) were flavonoids (gallocatechin dimer isomer, gallocatechin, quercetin pentosyl-hexoside), phenolic acids (coumaric acid, ferulic acid), glycoside (hydroxy jasmonic acid-O-glucoside and hydroxy-dihydroxy-glucoside), lignan (lariciresinol hexoside), diterpene (tinospinoside D isomer) and organic acid (naphthalenedicarboxylic acid-hexose). Few studies have identified phytochemical compounds present in *L. tomentosa*. In the present study, of the tentatively identified, only catechin, quercetin and derivatives had already been reported (Feitosa et al., 2012), all the others are so far unpublished for this species. Some of the compounds identified in EELTS1 and EELTS2 have already been shown to have biological activities, e.g., diterpenes in species of Chrysobalanaceae family exhibit antifungal, antimalarial and anti-HIV activity (Feitosa et al., 2012). Flavonoids also present a wide variety of biological activities, such as: neuroprotective, antioxidant, antimicrobial, antitumorigenic and anti-inflammatory activities (Almeida et al., 2017; Carrasco et al., 2009). Phenolic acids are associated with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities (Heleno et al., 2015).

When performing the UPLC-QTOF analyzes of the ethanol extract of *L. tomentosa* pulp, 15 peaks were detected and none of them were identified. In addition, the initial test for the determination of antioxidant activity, by neutralizing the DPPH radical, revealed that both EELTP1 and EELTP2 did not have this activity (DPPH above $1000 \mu\text{g} / \text{mL}$). Thus, we did not continue the other tests with pulp samples.

In general, the ethanolic extracts of the seeds showed promising results in relation to antioxidant activities detected by different methods (Table 7). The SC_{50} values in the DPPH assay for EELTS1 and EELTS2 (15.87 ± 0.88 and 10.30 ± 0.15 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively) were somewhat close to that of the positive control (i.e., ascorbic acid, 7.30 ± 0.05 $\mu\text{g} / \text{mL}$), which is already recognized as an efficient antioxidant (Du et al 2012). Thus, the results show that EELTS1 and EELTS2 have the ability to directly donate electrons and neutralize the DPPH free radical. When comparing with data in literature, our results deserve to be highlighted. A study with a hydroalcoholic extract of leaves from *L. tomentosa* showed a lower neutralization capacity of the DPPH radical (73.33 ± 4.43 $\mu\text{g} / \text{mL}$) when compared to that of the present study (Silva et al., 2012). Another work with ethanolic extract of *L. tomentosa* seeds also presented a lower neutralization capacity of DPPH (216.72 $\mu\text{g} / \text{mL}$) in relation to EELTS1 and EELTS2 (Farias et al., 2013).

By the FRAP method, it was possible to observe the ability of the samples to reduce the ferric ion to the ferrous form. This assay is important, since iron (II) can participate in the Fenton reaction, generating the hydroxyl radical, which is extremely reactive and can react causing damage to several molecules (Valko et al., 2006). In the present study, it was observed that EELTS2 (0.309 ± 0.01 mM) presented better results when compared to EELTS1 (0.203 ± 0.00 mM).

When considering the capacity lipid peroxidation inhibition by the TBARS test with and without iron, a stress inducing agent, no statistical difference was observed between the samples. In the absence of iron, EELTS1 (18.46 ± 2.24 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and EELTS2 (20.84 ± 2.05 $\mu\text{g} / \text{mL}$) presented better results when compared to those by Pessoa et al. (2016), with ethanolic extracts (236.07 ± 23.76 $\mu\text{g} / \text{mL}$), methanolic fraction (105.72 ± 32.53 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and ethyl acetate fraction (86.57 ± 15.97 $\mu\text{g} / \text{mL}$) of *L. tomentosa* seeds. In relation to TBARS assay with iron, EELTS1 (93.94 ± 2.49 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and EELTS2 (88.00 ± 2.08 $\mu\text{g} /$

mL) were not as effective when compared to ethanolic extracts ($20.71 \pm 2.89 \mu\text{g} / \text{mL}$) and methanolic fraction ($8.55 \pm 3.97 \mu\text{g} / \text{mL}$) of *L. tomentosa* from that same study. In this assay, it was observed that the samples acted more directly on the free radicals formed to protect the lipid membrane.

The rationale of the results of antioxidant activity shown by EELTS1 and EELTS2 can be explained by the phytochemical compounds present in these samples. According to Pessoa et al. (2016), flavonoids have a direct correlation with the results of DPPH and TBARS assays without iron stress. The antioxidant activity of flavonoids is frequently reported in the literature, and quercetin is usually used as a positive control of the test (Lu et al., 2014).

4. Conclusions

L. tomentosa seeds and pulps showed to be good sources of dietary fiber and have minerals content similar or higher than those of traditionally consumed fruits. In addition, they do not show the studied antinutritional factors and the seed ethanolic extracts have promising phenolic profiles, predominantly flavonoids, with compounds not previously described in the literature for this specie, and with high antioxidant activity. *L. tomentosa* fruit can be exploited from a nutritional point of view, either by encouraging its consumption fresh or in the form of a food ingredient or pharmaceutical product.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest and that Journal policies detailed in the guide have been reviewed.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of ITAL (Institute of Food Technology), Embrapa Tropical Agroindustry and INSA (National Institute of Semiarid)/CNPq (National Council for Scientific and Technological Development (Grant number 35/2010-562857/2010-9)).

References

- Aghamirzaei, M., Peighambaroust, S. H., Azadmard-Damirchi, S., Majzoobi, M., 2015. Effects of Grape Seed Powder as a Functional Ingredient on Flour Physicochemical Characteristics and Dough Rheological Properties. *J. Agr. Sci. Tech.* 17, 365-373.
- Agra, M. F., Freitas, P. F., Barbosa-Filho, J.M. 2007. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonouns in Northeast of Brasil. *Brazilian J. of Pharm.* 17, 114-140.
- Almeida, T.S., Neto, J.J.L, Sousa, N. M., Pessoa, I.P.; Vieira, L. R., Medeiros, J. L., Boligon, A. A, Hamers, A.R.M., Farias, D. F., Peijnenburg, A., Carvalho, A.F.U. 2017 Phenolic compounds of *Triplaris gardneriana* can protect cells against oxidative stress and restore oxidative balance. *Biomed.Pharmacother.* 93, 1261–1268, 2017.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. AOAC, MD.
- AOAC, 2012. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 19th ed. AOAC, MD.
- Baethgen, W. E., Alley, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. 1989. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 20, 961-96.
- Bampi, M, Bicudo, P., Oliveira, M. O.P., Fontoura, P.S.G., Ribani, R. H. 2010. Chemical composition of fruit, concentrated extract and flour from “Japanese grape”. *Cienc. Rural.* 40, 2361-2367.

- Barea-Álvarez, M., Andrade, C.D., Haro, A., Olalla, M., Seiquer, I., Rufían- Henares, J.A. 2016. Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles. *J Food Compos Anal.* 48, 34-40.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. 1999. *Methods Enzymol.* 299, 15-27, 1999.
- Brubacher, G., Mueller-Mulot, W., Southgate, D.A.T. 1986. *Methods for the Determination of Vitamins in Food.* Elsevier Applied Science Publishers. 97-106.
- Carrasco, D., Méndez, J., Braca, A., de Leo, M., González-Mujica, F., Duque, S. 2009. Effect of flavonoids from *Exellodendron coriaceum* (Chrysobalanaceae) on glucose-6-phosphatase. *Nat Prod Commun.* 4, 1657–1659.
- Carvalho, A. F. U., Sousa, N.M, Farias, D.F., Rocha-Bezerra, L.C.B., Silva, R.M.P, Viana, M.P., Gouveia, S.T., Sampaio, S.S., Sousa, M.B., Lima, G.P.G, Morais, S.M., Barros, C.C., Freire-Filho, F.R. 2012. Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. *J Food Compos Anal.* 26, 81-88.
- Carvalho, P.R.N., Collins, C.A., Rodriguez-Amaya, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity flow column chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography. 1992. *Chromatogr.* 33, 133-137.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. 2002. *J. Food Drug Anal.* 10, 178–182.
- Chang, S. K., Alasalvar, C., Shahidi, F. 2016. Review of dried fruits: phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *J Func Foods.* 21, 113-132.

- Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., Eitenmiller, R.R. 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J Food Compos Anal.* 19, 196-204.
- Diaby, M., Amza, T., Onivogui, G., Zou, X., Jin, X.G.W.Q. 2016. Chemical composition, antinutritional evaluation and phenolic compounds in gingerbread plum (*Neocarya Macrophylla*) kernel. *Euro Acad Res.* 4, 4602- 4626.
- Dokka, M.K., Davuluri, S.P. Antimicrobial activity of a trypsin inhibitor from the seeds of *Abelmoschus moschatus* .L. 2014. *Inter J Curr Microbiol Appl Sci.* 3, n.5, 184-199.
- Du J., Cullen, J.J., Buettner, G.R. 2013. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1826, 443-457.
- Ekpete, O. A., Etori, O.S., Fubara, E.P. 2013. Proximate and Mineral Composition of Some Nigerian Fruits. *Br J Appl Sci Technol.* 3, 1447-1454
- Erlanger, B. F; Kolowsky, N, Cohen, W. 1961. The action of chymotrypsin on two chromogenic substrates. *Arch Biochem.* 95, 271-278.
- Farag, M.A., Ezzat, S.M., Salama, M.M.; Tadros, M.G. 2016. Anti-acetylcholinesterase potential and metabolome classification of 4 *Ocimum* species as determined via UPLC/qTOF/MS and chemometric tools. *J Pharm Biomed Anal.* 125, 292-302.
- Farias, D. F., Souza, T. M., Viana, M. P., Soares, B. M., Cunha, A. P., Vasconcelos, I. M., Carvalho, A. F. U. 2013. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. *BioMed Res Int.* 2013, 1-9.
- Feitosa, E. A., Xavier, H.S., Randau, K. P. *Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology.* 2012. *Braz J Pharm.* 22, 1181-1186.

- Fernandes J. , Castilho, R. O., da Costa, M. R., Wagner-Souza K., Coelho, K. M. A, Gattass, C. R. 2003. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett.* 2, 165-169.
- Heleno, S.A.,Martins, A., Queiroz, M. J. R.P.,Ferreira, I. C. F. R. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parente compounds: A review. *Food Chem.* 173, 501-513.
- Huis, R., Morreel, K., Fliniaux,O., Lucau-Danila, A., Fénart, S., Grec, S., Neutelings G., Chabbert, B., Mesnard, F., Boerjan, W., Hawkins, S. 2012. Natural Hypolignification Is Associated with Extensive Oligolignol Accumulation in Flax Stems. *Plant Physiology.* 158, 1893-1915.
- Hussain, A., Yasmin, A., Ali, J. 2010. Comparative study of chemical composition of some dried apricot varietiesgrown in northern áreas of pakistan. *Pak J Bot.* 42, 2497-2502.
- Islary, A., Sarmah, J., Basumatary, S. 2016. Proximate composition, mineral content, phytochemical analysis and *in vitro* antioxidant activities of a wild edible fruit (*Grewia sapida* Roxb. ex DC.) found in Assam of North-East India. *J Invest Biochem.* 5, 21-31.
- Karar, M.G.E.; Kuhnert, N. 2015. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (Crataegutt Tropfen). *J Chem Biol Therapy.* 1, 1-23.
- Khoo, H., Prasad, K.N., Kong, K., Jiang, Y., Ismail, A. 2011. Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. *Mol.* 16, 1710-1738.
- Lee, C.Y. 2012. Common nutrients and nutraceutical quality of apples. *N Y Fruit Quartely.* 20,1-6.
- Lu, Y., Shipton, F.N., Khoo, T.J., Wiart, C. 2014. Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. *Pharmacol. Pharm.* 5, 395–400.

- Monteiro, K.L, Oliveira, C., Silva, B. M. S., Moro, F. V., Carvalho, D. A. 2012. Caracterização morfológica de frutos, de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de *Licania Tomentosa* (Benth.) Fritsch. *Ciênc Rural*. 42, 90-97.
- Navarro, M., Zhao, Y., Sun, J., Moreira, I., Arnaez, E., Vargas, F., Harnly, J.M., Chen, P. 2017. Chemical Profiling of Polyphenolic Compounds in the Fruit Skin of *Prunus Domestica* Plums from Costa Rica. *J Res Anal*. 3, 1-10.
- Onivogui, G., Zhang, H., Mlyuka, E., Diaby, M., Song, Y. 2014. Chemical Composition, Nutritional Properties and Antioxidant Activity of Monkey Apple (*Anisophyllea laurina* R. Br. ex Sabine). *J Food Nutr Res*. 2, 281-287.
- Ötles, S., Ozgoz, S. 2014. Helf effects of dietary fiber. *Acta scie pol Technol aliment*. 13, 191-202.
- Pessoa, I.P., Neto, J.J.L., Almeida, T.S., Farias, D.F., Vieira, L. R., Medeiros, J.L. Boligon, A.A., Peijnenburg, A. D, Castelar, I., Carvalho, A.F.F.U. 2016. Polyphenol Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Seeds from Two Underexploited Wild *Licania* Species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. *Mol*. 21, 1-16.
- Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., Lopes, N.P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Sci Technol*. 176, 5– 16.
- Pires, P. C.C., Candido, F.G., Cardoso, L.M., Costa, N.M.B., Martino, H. S.D., Santana, H.M.P. 2015. Comparison of mineral and trace element contents between organically and conventionally grown fruit. *Fruits*. 70, 29-36.
- Ribeiro, T.G, Chavez- Fumagalli, M.A., Valadares, D.G., Franca, J.R., Lage, P.S., Duarte, M.C., Andrade, P.H.R., Martins, V.T., Costa, L.E., Arruda, A.L.A., Faraco, A.A.G., Coelho, E.A.F., Castilho, R.O. 2014. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exper Parasitol*. 143, 60-68.

- Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., Mahdi, F. 2014. The role of vitamin E in human health and some diseases. *SQU Medical Journal*. 14, 157-175.
- Sabir, S.M., Rocha, J.B.T.2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. *J. Ethnopharmacol.* 120, 226–232.
- Sampaio, B. L., Edrada-Ebel, R., Costa, F. B. 2016. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scie Reports*. 6, 1-11.
- Santos, A.F.S, Silva, M.D.C, Napoleao, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, C.B.B. 2014. Lectins: function, structure, biological properties and potential applications. *Curr Top Pept Protein Res.* 15, 1-23.
- Silva, J.B.N.F., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M., Felipe, C.F.B. 2012. Antibacterial and antioxidante of *Licania tomentosa* (Benth.). *Arch. Biol. Sci.* 64, 459-464.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 299, 152–178.
- Slavin, J.L., Lloyd, B. 2012. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv. Nutr.* 3, 506–516.
- Soetan, K.O., Olaiya, C.O., Oyewole, O.E. 2010. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *Afri J Food Sci.* 4, 200-222.
- Sousa, E.P., Silva, L.M.M., Sousa, F.C., Martins, J.J.A., Gomes, J.P. 2013. Características físicas e físico-química dos frutos de oiti. *Tecnol cienc agr.* 7, 39-43.
- Stanisavljević, N.S., ILIC, M., Jovanović, Z.S., Čupić, T., Dabić, D.C., Natić, M.M., Tešić, Z.L., Radović, S.S.2015. Identification of seed coat phenolic compounds from

- differently colored pea varieties and characterization of their antioxidant activity. Arch. Biol. Sci. 67, 829-840.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160, 1–40.
- Vasconcelos, I.M., Maia, F.M.M., Farias, D.F., Campello, C.C., Carvalho, A.F.U., Moreira, R.A., Oliveira, J. T.A. 2010. Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. J Food Compos Anal. 23, 54-60.
- Xu, L.L, Guo, F.X., Chi,S.S., Wang, Z.J, Jiang, Y.Y., Liu,B., Zhang, J.Y. 2017. Rapid Screening and Identification of Diterpenoids in *Tinospora sinensis* Based on High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Linear Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometry. Mol. 22, 1-17.
- Wang, J., Jia, Z., Zhang, Z. , Wang, Y., Liu, X., Wang, L., Lin, R. 2017. Analysis of Chemical Constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. By UPLC-ESI-Q-Exactive Focus-MS/MS. Mol. 22, 1-20.
- Zhang, L., Caitu, Z., Xie, X., Wang, H., Wang, H., Wang, Z.X., Meisha, X., Lu, Y. 2017. Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) peel: A better source of antioxidants and a -glucosidase inhibitors than pulp, flake and seed, and phytochemical profile by HPLC-QTOF-MS/MS. Food Chem. 234, 303-313.
- Zhang, X.L., Guo, Y.S., Wang, C.H., Li, G.Q., Xu, J.J., Chung, H.Y., Ye, W.C., Li, Y.L., Wang, G.C. 2014. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. Food Chem. 152, 300–306.

Table 1

Moisture and proximate composition on a dry basis (%) of *Licania tomentosa* pulp and seeds flours.

	LTS1	LTS2	LTP1	LTP2
Moisture	37.39 ± 0.37 ^a	38.18 ± 1.19 ^a	73.82 ± 1.29 ^a	76.02 ± 0.67 ^a
Protein ¹	3.10 ± 0.10 ^a	3.47 ± 0.13 ^b	3.82 ± 0.03 ^a	4.59 ± 0.16 ^b
Fat	0.59 ± 0.01 ^a	0.90 ± 0.02 ^b	3.34 ± 0.08 ^a	4.08 ± 0.08 ^b
Dietary Fiber	25.62 ± 0.17 ^a	27.45 ± 0.2 ^b	39.18 ± 0.28 ^a	41.70 ± 0.24 ^b
Ash	1.68 ± 0.02 ^a	1.76 ± 0.04 ^b	2.75 ± 0.04 ^a	2.86 ± 0.03 ^b
Digestible Carbohydrate ²	69.01 ^a	66.42 ^b	50.91 ^a	46.77 ^b

Mean ± SD values of fruit and seed followed by different letters in the same row represent significant ($p < 0.05$) differences.

¹N x 6.25;

²The available digestible carbohydrate content was determined by calculating the percentile difference from all the other constituents according to the formula:

[100 g dry weight- (g crude protein + g crude lipid + g ash + g dietary fiber)]/100 g;

LTS1: *L. tomentosa* seed flour collection 1 (2015); LTS2: *L. tomentosa* seed flour collection 2 (2016); LTP1: *L. tomentosa* pulp flour collection 1(2015); LTP2: *L. tomentosa* pulp flour collection 2(2016).

Table 2
Vitamins of *Licania tomentosa* pulp and seed flours.

	LTS1	LTS2	LTP1	LTP2
Tocopherol (mg/100g)				
Alpha (α)	0.74 ± 0.0^a	0.38 ± 0.02^b	0.02 ± 0.00^a	0.06 ± 0.00^b
Beta (β)	ND < 0.01	ND < 0.01	ND < 0.01	ND < 0.01
Gamma (γ)	1.02 ± 0.02^a	0.33 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^a	0.14 ± 0.00^b
Delta (Δ)	ND < 0.01	ND < 0.01	ND < 0.01	ND < 0.01
Total	1.76 ± 0.0^a	0.71 ± 0.02^b	0.06 ± 0.00^a	0.20 ± 0.01^b
Vitamin E				
UI/100g	1	< 1	< 1	< 1
Expressed as α -tocopherol (mg/100g)	0.88 ± 0.02^a	0.43 ± 0.01^b	0.02 ± 0.00^a	0.08 ± 0.00^b
Total carotenoids (mg/100g)				
Expressed such as betacarotene	ND < 2	ND < 2	ND < 2	ND < 2

Mean \pm SD values of fruit and seed followed by different letters in the same row represent significant ($p < 0.05$) difference. ND: not detected

LTS1: *L. tomentosa* seed flour collection 1 (2015); LTS2: *L. tomentosa* seed flour collection 2 (2016); LTP1: *L. tomentosa* pulp flour collection 1(2015); LTP2: *L. tomentosa* pulp flour collection 2 (2016).

Table 3
Minerals Elements of *Licania tomentosa* pulp and seed flours.

Elements (mg/100g)	LTS1	LTS2	LTP1	LTP2
Calcium	71.47 ± 0.12 ^a	86.76 ± 0.59 ^b	167.8 ± 1.69 ^a	189.7 ± 1.23 ^b
Selenium	0.04 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.06 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.00 ^b
Copper	0.73 ± 0.00 ^a	0.49 ± 0.00 ^b	0.77 ± 0.00 ^a	0.66 ± 0.00 ^b
Iron	0.77 ± 0.02 ^a	1.40 ± 0.24 ^b	1.09 ± 0.01 ^a	1.20 ± 0.00 ^b
Phosphor	50.60 ± 0.06 ^a	58.63 ± 0.48 ^b	54.87 ± 0.45 ^a	60.50 ± 0.40 ^b
Magnesium	61.04 ± 0.24 ^a	70.43 ± 0.32 ^b	83.35 ± 0.89 ^a	79.19 ± 0.50 ^b
Manganese	0.29 ± 0.00 ^a	0.31 ± 0.00 ^b	0.49 ± 0.00 ^a	0.34 ± 0.00 ^b
Potassium	588.90 ± 1.01 ^a	643.1 ± 6.88 ^b	887.3 ± 8.35 ^a	943.9 ± 7.28 ^b
Sodium	22.61 ± 0.10 ^a	16.26 ± 0.21 ^b	144.8 ± 1.23 ^a	111.1 ± 0.78 ^b
Zinc	0.56 ± 0.01 ^a	0.49 ± 0.00 ^b	0.56 ± 0.00 ^a	0.56 ± 0.02 ^a

Mean ± SD values of fruit and seed followed by different letters in the same row represent significant ($p < 0.05$) differences.

LTS1: *L. tomentosa* seed flour collection 1 (2015); LTS2: *L. tomentosa* seed flour collection 2 (2016); LTP1: *L. tomentosa* pulp flour collection 1(2015); LTP2: *L. tomentosa* pulp flour collection 2(2016).

Table 4

Phenolic compound and flavonoid contents of *Licania tomentosa* pulp and seed ethanolic extract.

Phenolic compound	EELTS1	EELTS2	EELTP1	EELTP2
Total Polyphenols ¹	192.40 ± 3.12	203.00 ± 1.44	ND	ND
Flavonoids ²	29.29 ± 0.36	29.88 ± 0.48	19.80 ± 1.57	20.67 ± 0.17

Mean ± SD values of fruit and seed followed by different letters in the same row represent significant ($p < 0.05$) differences. ND: not detected.

¹Gallic acid equivalent in mg per g of sample. ²Quercetin equivalent in mg per g of sample.

EELTP1: ethanolic extract from *L.tomentosa* pulp collection 1 (2015); EELTP2: ethanolic extract from *L.tomentosa* pulp collection 2 (2016); EELTS1: ethanolic extract from *L.tomentosa* seed collection 1 (2015); EELTS2: ethanolic extract from the *L.tomentosa* seed collection 2 (2016).

Table 5

Phytochemical compounds detected in *Licania tomentosa* seed ethanolic extract collection 1 (EELTS1) by using UPLC-QTOF in negative ionization modes.

Peak no.	Rt min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Referências
1	0.88	377.0832	377.0873	341.1111, 215.0272, 179.0554	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	4.5	Naphthalenedicarboxylic acid-hexose	Zhang et al 2017
2	1.88	609.1260	609.1244	483.0957, 441.0864, 423.0727, 305.0670	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	2.6	Gallocatechin dimer isomer	Stanisavljević et al.,2015
3	1.99	609.1248	609.1244	483.0819, 441.0880, 423.0710, 305.0643	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	0.7	Gallocatechin dimer isomer	Stanisavljević et al.,2015
4	2.24	305.0663	305.0661	287.0627, 261.0519, 221.9578, 219.0638, 179.0327	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	0.7	Gallocatechin	Stanisavljević et al.,2015
5	2.55	163.0399	163.0395	119.0502	C ₉ H ₇ O ₃	2.5	Coumaric acid	Wang et al 2017
6	2.79	193.0498	193.0501	178.0287, 149.0593, 134.03	C ₁₀ H ₉ O ₄	1.6	Ferulic acid	Wang et al 2017
7	2.86	443.1916	443.1917	327.0729, 305.0672, 303.0529	C ₂₁ H ₃₁ O ₁₀	0.2	Unknown	-
8	3.28	387.1666	387.1655	207.5279, 163.1131	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	2.8	Hydroxy jasmonic acid-O-glucoside	Farag et al.,2016
9	3.61	389.1813	389.1812	227.1260, 134.0350, 101.0201	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	0.3	Hydroxi-dihydrojasmonic acid-O-glucoside	Karar et al., 2015
10	3.85	363.0718	363.0716		C ₁₇ H ₁₅ O ₉	0.6	Unknown	-
11	4.06	521.2029	521.2023	359.1454, 329.1387	C ₂₆ H ₃₃ O ₁₁	1.2	Lariciresinol hexoside	Huis et al., 2012
12	4.23	595.1298	595.1299	463.0954, 301.0353	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	0.2	Quercetin pentosyl-hesoside	Navarro et al., 2017
13	4.32	567.2069	567.2078	521.2017, 359.1497, 341.1444, 329.1387	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₃	1.6	Tinospinoside D isomer	Xu et al., 2017
14	4.47	564.4116	564.4116	-	C ₂₉ H ₅₈ NO ₉	0.7	Unknown	-
15	4.78	677.4943	677.4952	351.0148	C ₃₅ H ₆₉ N ₂ O ₁₀	1.3	Unknown	-
16	5.01	790.5880	790.5892	-	C ₃₉ H ₈₄ NO ₁₄	1.5	Unknown	-
17	5.19	949.6860	949.6827	903.6732, 836.6055, 790.5879, 677.5103, 579.3063, 357.1234	C ₅₁ H ₉₇ O ₁₅	3.5	Unknown	-
18	5.53	711.4007	711.4014	503.3426, 179.0399	C ₃₀ H ₆₃ O ₁₈	1.0	Unknown	-
19	5.63	417.2490	417.2488	139.0382, 193.0540, 161.0442, 163.0449	C ₂₁ H ₃₇ O ₈	0.5	Unknown	-
20	5.99	417.2492	417.2488	161.0505, 179.0303	C ₂₁ H ₃₇ O ₈	1.0	Unknown	-
21	6.46	365.0292	365.0297	350.0088, 230.9623, 151.0012	C ₁₉ H ₉ O ₈	1.4	Unknown	-
22	6.70	695.4042	695.4065	487.3413	C ₃₀ H ₆₃ O ₁₇	3.3	Unknown	-
23	6.98	365.0258	365.0257	285.0715, 350.0082, 230.9559, 150.9981	C ₁₄ H ₉ N ₂ O ₁₀	0.3	Unknown	-
24	8.01	603.3009	603.3012	560.2936, 469.2360, 365.0294, 116.9309	C ₄₂ H ₃₉ N ₂ O ₂	0.5	Unknown	-
25	8.43	679.4065	679.4057	605.3160, 471.3469	C ₃₇ H ₅₉ O ₁₁	1.2	Unknown	-
26	8.84	593.1222	593.12011	236.1065, 221.1528, 116.9243	C ₁₉ H ₂₉ O ₂₁	2.1	Unknown	-

Table 6

Phytochemical compounds detected in *Licania tomentosa* seed ethanolic extract collection 2 (EELTS2) by using UPLC-QTOF in negative ionization mode.

Peak no.	Rt Min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Ref.
1	0.88	377.0884	377.0873	341.1046, 215.0313	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	2.9	Naphthalenedicarboxylic acid-hexose	Zhang et al 2017
2	1.88	609.1219	609.1244	483.0937, 441.08555, 423.0734, 305.0679	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	4.1	Galocatechin dimer isomer	Stanisavljević et al.,2015
3	1.98	609.1234	609.1244	483.0937, 441.0875, 423.0734, 305.0679	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	1.6	Galocatechin dimer isomer	Stanisavljević et al.,2015
4	2.24	305.0648	305.0661	287.0674, 261.0462, 221.9527, 179.0304	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	4.3	Galocatechin	Stanisavljević et al.,2015
5	2.54	163.0401	163.0395	119.0479	C ₉ H ₇ O ₃	3.7	Coumaric acid	Wang et al., 2017
6	2.79	193.0507	193.0501	178.0296, 149.0563	C ₁₀ H ₉ O ₄	3.1	Ferulic acid	Wang et al., 2017
7	2.85	443.1916	443.1917	327.0828, 305.0645, 303.0584, 193.0501, 125.0194, 89.0039	C ₂₁ H ₃₁ O ₁₀	0.2	Unknown	-
8	3.28	387.1662	387.1655	207.0961, 163.1122	C ₁₈ H ₂₇ O ₉	1.8	Hydroxy jasmonic acid-O-glucoside	Farag et al.,2016
9	3.34	387.1632	387.1628	405.1770, 135.0414	C ₁₄ H ₂₃ N ₆ O ₇	1.0	Unknow	-
10	3.61	389.1825	389.1812	227.1420, 134.0292	C ₁₈ H ₂₉ O ₉	3.3	Hydroxi-dihydrojasmonic acid-O-glucoside	Karar et al., 2015
11	3.86	363.0718	363.0716	96.9605	C ₁₇ H ₅₉ O ₉	0.6	Unknown	-
12	4.06	521.2035	521.2023	359.1474, 319.1387	C ₂₆ H ₃₃ O ₁₁	2.3	Lariciresinol hexoside	Huis et al., 2012
13	4.23	595.1319	595.1299	463.0965, 301.0431	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	3.4	Quercetin pentosyl- hesoside	Navarro et al., 2017
14	4.31	567.2069	567.2078	521.1970, 359.1516, 341.1406, 329.1363	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₃	1.6	Tinospinoside D isomer	Xu et al., 2017
15	4.47	564.4117	564.4112	610.4255, 525.0812, 565.4162	C ₂₉ H ₅₈ NO ₉	0.9	Unknown	-
16	4.78	677.4960	677.4952	351.0155	C ₃₅ H ₆₉ N ₂ O ₁₀	1.2	Unknown	-
17	5.01	790.5862	790.5892	836.5898	C ₃₉ H ₈₄ NO ₁₄	3.8	Unknown	-
18	5.19	949.6841	949.6827	903.6649, 836.6093, 790.5836, 677.5015	C ₅₁ H ₉₇ O ₁₅	1.5	Unknown	-
19	5.53	711.4013	711.4014	790.5930, 503.3389, 179.0357	C ₃₀ H ₆₃ O ₁₈	0.1	Unknown	-
20	5.63	417.2496	417.2488	903.699,790.5812, 497.2195,471.1686, 193.0523,163.0400, 101.0228	C ₂₁ H ₃₇ O ₈	1.9	Unknown	-
21	5.97	417.2472	417.2488	487.3473, 179.0584, 161.0473, 101.0256, 89.0244	C ₂₁ H ₃₇ O ₈	3.8	Unknown	-
22	6.46	365.0298	365.0297	531.3188,501.3274, 395.1366, 350.0060 ,343.1431, 285.0503, 241.0079, 230.9661, 187.9809, 150.9897	C ₁₉ H ₉ O ₈	0.3	Unknown	-
23	6.70	695.4067	695.4065	487.3431	C ₃₀ H ₆₃ O ₁₇	0.3	Unknown	-
24	6.99	365.0251	365.0257	487.3472, 230.9573, 151.0000	C ₁₄ H ₉ N ₂ O ₁₀	1.6	Unknown	-
25	8.04	603.3013	603.3012	555.2757	C ₄₂ H ₃₉ N ₂ O ₂	0.2	Unknown	-
26	8.85	593.1170	593.1137	555.2906, 325.1805, 221.1593	C ₁₉ H ₂₉ O ₂₁	5.2	Unknown	-

Table 7Antioxidant activity of *Licania tomentosa* seeds ethanolic extract.

	DPPH assay	FRAP	TBARS assay IC ₅₀ (µg/mL)	
	SC ₅₀ (µg/mL)	(mM FeSO ₄ /mg extract)	Without iron stress	With iron stress
EELTS1	15.87 ± 0.88 ^c	0.203 ± 0.00 ^a	18.46 ± 2.24	93.94 ± 2.49
EELTS2	10.30 ± 0.15 ^b	0.309 ± 0.01 ^b	20.84 ± 2.05	88.00 ± 2.08
Ascorbic Acid ¹	7.30 ± 0.05 ^a	-	-	-

Values are means ± SD of three measurements. Values with different letters at the same column differ by Tukey test at $p < 0.05$. ¹ Used as positive control.

EELTS1: ethanolic extract from *L. tomentosa* seed collection 1 (2015); EELTS2: ethanolic extract from the *L. tomentosa* seed collection 2 (2016).

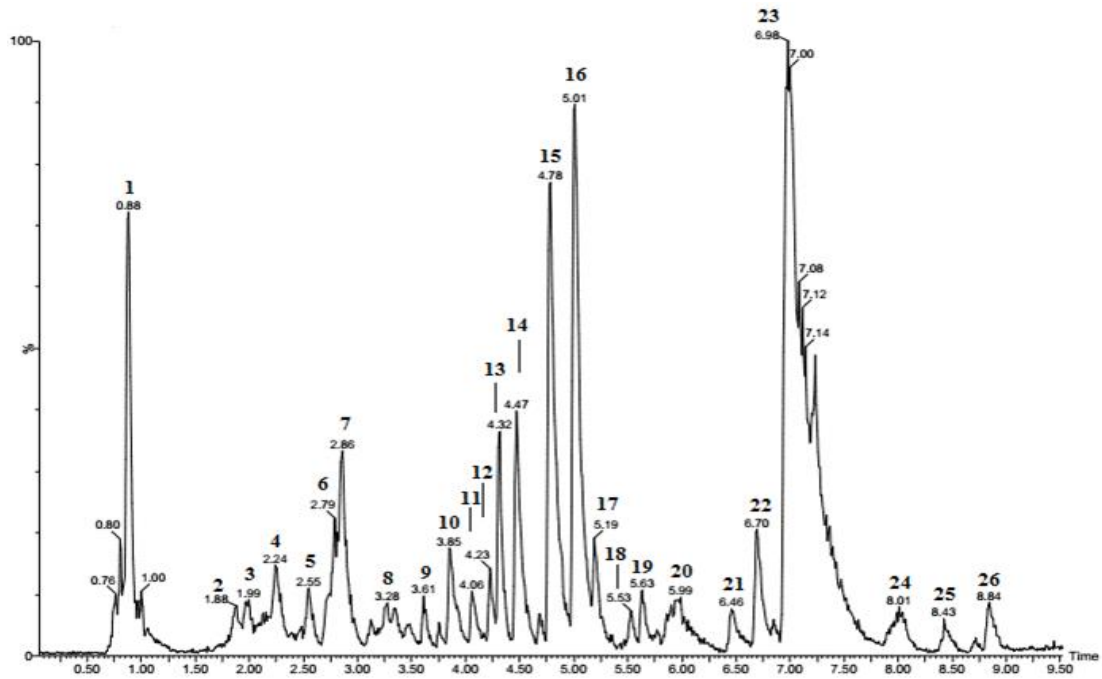


Fig 1. UPLC chromatogram of *Licania tomentosa* seeds ethanolic extract collection 1 (EELTS1). 1= Naphthalenedicarboxylic acid-hexose, 2= Gallic catechin dimer isomer, 3= Gallic catechin dimer isomer, 4= Gallic catechin, 5= Coumaric acid, 6= Ferulic acid, 7= Unknown, 8= Hydroxy jasmonic acid-O-glucoside, 9= Hydroxy-dihydrojasmonic acid-O-glucoside, 10= Unknown, 11= Lariciresinol hexoside, 12= Quercetin pentosyl-hexoside, 13= Tinospinoside D isomer, 14 -26= Unknown.

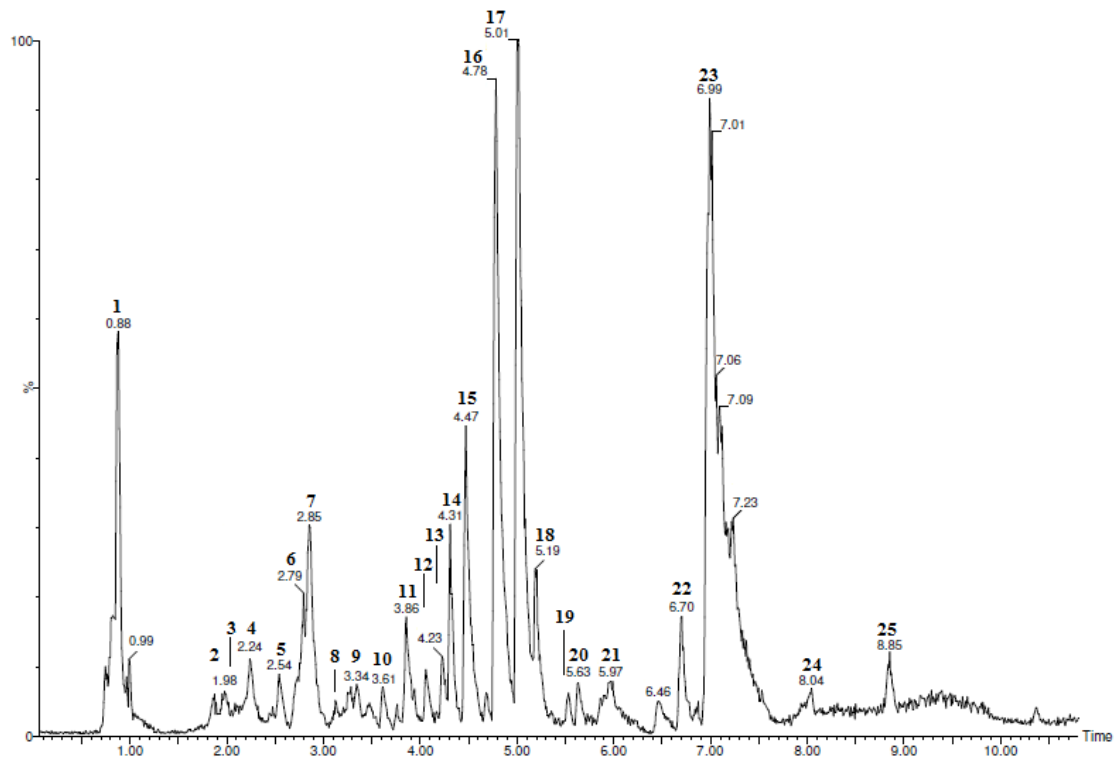


Fig 2. UPLC chromatogram of *Licania tomentosa* seeds ethanolic extract collection 2 (EELTS2). 1= Naphthalenedicarboxylic acid-hexose, 2= Gallic catechin dimer isomer, 3= Gallic catechin dimer isomer, 4= Gallic catechin, 5= Coumaric acid, 6= Ferulic acid, 7= Unknown, 8= Hydroxy jasmonic acid-O-glucoside, 9 = Unknown, 10 = Hydroxi-dihydrojasmonic acid-O-glucoside, 10=, 11= Unknown, 12= Lariciresinol hexoside, 13= Quercetin pentosyl-hesoside, 14= Tinospinoside D isomer, 15 -25= Unknown.

APÊNDICE B – ARTIGO DA TESE 2

Manuscrito será submetido à revista Food and Chemical Toxicology (Impact Factor: 3.77).

Toxicological assessment of the edible and medicinal plant specie *Licania tomentosa* (Benth.)

Frist

Jackeline Lima Medeiros¹, Davi Felipe Farias ², Gabrielle Paula Freire¹, Thaís Borges Moreira¹, Pedro Matheus Sousa Tabosa¹, José Joaquim Lopes Neto¹, Thiago Silva Almeida¹, Daniel Araujo Viana³, Ana Fontenele Urano Carvalho*¹

¹Federal University of Ceara, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Campus Pici, 909, 60455-970, Fortaleza, Brazil; (JLM) jackelinemedeiros@hotmail.com; (GPF) gabrielle.de.paula@hotmail.com; (TBM) thais.ufc@hotmail.com; (PMST) pyedrosousa@hotmail.com; (JLN) lopes.joaquimm@hotmail.com; (TSA) thiago.urca@gmail.com

²Federal University of Paraiba, Department of Molecular Biology, 58051-900, João Pessoa, Brazil; (DFF) davi@dbm.ufpb.br

³Ceara State University, Campus Itaperi, 60740-903, Fortaleza, Brazil; (DAV) viana_daniel@yahoo.com.br

*Corresponding author:

Prof. Dr. Ana F. U. Carvalho

E-mail: aurano@ufc.br

Phone/Fax: +55 85 33669830

Abstract

Licania tomentosa is an underexploited wild plant species with moderate use in food and folk medicine despite its promising bioactive and pharmacological properties. A possible reason for that is the fact that no studies have been performed about its safe use. This study aimed to perform *in vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of the ethanolic extract of its fruit pulp (EELTP) and seeds (EELTS). We evaluated hemolytic activity and oral toxicity in rodents through single dose and repeated dose acute toxicity tests (28 days). EELTP did not cause hemolysis of rabbit and human erythrocytes, whereas EELTS showed hemolytic activity up to 30% at concentrations of 500 $\mu\text{g/mL}$ for human blood (A, B and O) and 2,000 $\mu\text{g/mL}$ for rabbit blood. The extracts did not show acute toxicity in mice when tested at 2,000 mg / kg and no changes were observed in the relative size of organs, hematological and histopathological parameters of rats in the repeated dose toxicity test (1,000 mg / kg). As to serum biochemical parameters, significant differences were observed for potassium values (pulp: 7.37 ± 0.07 ; seed: 7.57 ± 0.39 mmol / L) in males and of alkaline phosphatase (pulp: 109.30 ± 4.84 ; seed: 118.30 ± 3.84 U / L) in females. *L. tomentosa* extracts did not cause systemic toxicity and are considered safe especially because of the conditions in which they were tested (limit dose). However, further studies of subchronic or chronic toxicity are required to accomplish a complete toxicity profile.

Key words: Medicinal plant, unconventional plant food, phenolic compound, safe use, toxicity.

1. Introduction

Interest in natural products has increased significantly worldwide, especially in developed countries, due to the increasing use of bioactive plant-derived components in modern therapeutics. The global market estimates that more than \$ 20 billion is spent annually on plant-based drugs, as approximately 30% of drug therapy is derived from natural sources such as microorganisms and plants. In some specific areas, such as oncology, plant-based therapy may correspond up to 60% (Dutra et al., 2016).

The use of plants for therapeutic purposes is a common practice often independently performed without medical monitoring. This practice is based on the “appeal to nature” fallacy. However, many components with medicinal activities extracted from plants have already shown cytotoxic, genotoxic and / or mutagenic action (Silva et al., 2014). This improper practice has raised the issue of the safety of the medicinal plants use as a matter of public health (Ekor, 2014).

Licania tomentosa (Benth.)Frist is a plant specie native to the Brazilian coast, called popularly in Portuguese “oiti” or “oitizeiro”. It is a tree specie, fruitful, perennial and considered an unconventional food plant because the fruit pulp is edible and is consumed fresh on a small scale or used in the production of jams, jellies and flours (Sousa et al., 2013). In addition, it is also used in folk medicine as treatment of inflammatory processes and gastrointestinal disorders (abdominal pain, diarrhea and dysentery) (Feitosa et al., 2012).

Studies of extracts and compounds isolated from various parts of *L. tomentosa* have described activities of pharmacological interest. The aqueous extract of the seeds showed inhibitory activity of the herpes simplex virus (Miranda et al., 2002). Triterpenes isolated from leaves and fruits showed anticarcinogenic action against leukemia cell lines (Fernandes et al, 2003). According to Merlin et al. (2017), the therapeutic effect of medicinal plants is largely related to the action of biologically active phenolic compounds. Research indicates

that the presence of phenols is directly related to antioxidant, antifungal, anti-depressant and anti-inflammatory properties.

Recently, our research group showed that the ethanolic extract and derived fractions (hexanic, chloroform, ethyl acetate, methanolic and aqueous acetate) obtained from the *L. tomentosa* seeds showed very different profiles of flavonoids and phenolic acids. Eleven different compounds were identified in the ethanolic extract and fractions, the majority of which were: chlorogenic acid, caffeic acid and ellagic acid. In addition, *L. tomentosa* samples showed promising antioxidant activity associated with low cytotoxicity (Pessoa et al., 2016).

Although *L. tomentosa* is a specie with several promising uses and bioactive and pharmacological properties, to our knowledge there are no studies on the safety of use of the most employed parts of this plant which are the fruit pulp and seed. In this way, this study aimed to perform *in vitro* and *in vivo* toxicological evaluations of the ethanol extract of its pulp and seed. The extracts were evaluated for the presence of hemolytic activity as well as for a single dose acute toxicity and repeated doses (28 days) toxicity in mice and rats, respectively. The results offer subsidies for the safe use and development of food products and biopharmaceuticals from this neglected species.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Mature fruits of *L. tomentosa* were collected from three trees in the months of January 2015 and 2016, in Fortaleza, northeastern Brazil (3 ° 44'32.6 "S 38 ° 34'30.5" W). Fifty fruit samples were collected in 2015 and fifty in 2016 from the same trees. A branch containing leaves, flowers and fruits was used to prepare and deposit exsicata at the Herbarium Prisco Bezerra, in Federal University of Ceará (Fortaleza, Brazil), which received the number EAC 40215. The seeds were manually separated from the fruits pulp and dried in oven at 50 °C

(FANEM, Model 002 CB, São Paulo, Brazil) until constant weight. The dried seeds and pulp were pulverized in an electric grinder (Cadence, Itajaí, Brazil) to obtain homogeneous flours (particle size <0.5 mm), which were stored in hermetically sealed plastic jars until further analysis.

2.2. *Ethanollic extract samples*

The ground samples of pulp and seed were subjected to cold prolonged extraction with 99% ethanol (1: 2 m / v) with solvent changes every three days of extraction, following the methodology described by Farias et al. (2013). The obtained extracts were subjected to filtration on Whatman® n. 1 filter paper and then, the solvent present in the extracts was evaporated in a rotary evaporator (TE-210 Tecnal Piracicaba, Brazil) under reduced pressure and temperature controlled at 50 °C. At the end, the ethanollic extract of the seeds of *L. tomentosa* (EELTS) and the ethanollic extract of the pulp of *L. tomentosa* (EELTP) were obtained. The extracts were kept frozen at -20 °C until analysis.

2.3. *Hemolytic activity*

2.3.1. *Human and rabbit blood collection*

Human blood samples (A, B and O) were obtained from healthy donors of either sex, aged 20–30 years, with no history of recent illness, no smoking, and no recent exposure to radiation, drug, or alcohol. Aliquots (5 mL) of peripheral blood of two volunteers for each blood type were collected by using safety needle (BD vacutainer®) in EDTA-containing tubes. This procedure was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Ceará (UFC). Rabbit blood samples were collected from two animals of New Zealand strain, three months old. Aliquots (2 mL) were collected in EDTA-containing tubes from a small perpendicular incision in the marginal vein of the ear. The Ethics Committee on Animal Use of Federal University of Ceará, which follows the Brazilian animal experimentation regulation and guidelines on animal welfare approved the rabbit blood

sampling. All blood samples were gently shaken by inversion and conditioned at 4 °C until the time for separating the erythrocytes.

2.3.2. Erythrocytes suspension

To obtain the erythrocytes and prepare the suspensions, human and rabbit blood samples were centrifuged (Fanem, São Paulo, Brazil) at 2,000 x g, at 25 °C for 10 min and the supernatant was carefully discarded. Appropriate volume of 0.9% NaCl solution was added to the erythrocyte precipitate to replace the withdrawn plasma volume, the sample was, then, gently shaken by inversion and centrifuged again under the same conditions. The procedure was repeated until a totally clear supernatant was obtained. The erythrocyte precipitate was used to prepare 1% suspensions for hemolytic activity assay.

2.3.3. Hemolysis evaluation

The hemolytic activity assay of EELTS and EELTP was performed according to methodology described by Bernheimer (1988) and Merker and Levine (1986). Suspensions of 1% rabbit and human erythrocytes (A, B and O) were diluted 1:10 (m / v) in 0.9% NaCl containing several dilutions of the extracts, from 1: 2 to 1: 1024. The tubes were then incubated in oven at 37 °C for 1 h. The tubes were centrifuged at 1,000 x g for 5 min and the supernatant used to assess the degree of hemolysis which is calculated by the amount of hemoglobin release measured at a wavelength of 540 nm (Biospectro, SP-220, Curitiba, Brazil). Complete lysis (100%) was obtained by diluting 100 µL of the cell suspension in 900 µL of distilled water, using a negative control with the same proportion of cells in saline solution. The hemolytic activity was calculated according to the following formula: % hemolysis = $(Abs_{540} \text{ sample} - Abs_{540} \text{ of } 0.9\% \text{ NaCl}) \times 100 / Abs_{540} \text{ of distilled water}$.

2.4. Toxicological tests

2.4.1. Animals

Female (n = 18) Swiss mice and male (n = 15) and female (n = 15) Wistar rats were obtained from the animal facilities of Federal University of Ceará. Females were nulliparous and not pregnant. The animals were housed at 23.0 ± 2.0 °C, with photoperiod of 12 h light / dark and humidity of 45-55%. The animals were kept in polypropylene cages with pine shavings (Biotécnicas, São Paulo, Brazil) and water and feed (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brazil) *ad libitum* until they reached the appropriate weight for the experiments. The use of rats and mice in the toxicity assays was approved by the Federal University of Ceará Ethics Committee on Animal Use.

2.4.2. *Single dose acute toxicity assay*

The acute oral toxicity study was performed according to protocol 423 of the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD, 2009), with slight modifications. Female Swiss mice (n = 6 / group) were used, with 8 to 12 weeks age. EELTS and EELTP were resuspended in saline and administered by oral gavage at limit dose of 2,000 mg / kg body weight. An additional group of animals administered with saline was also used. All mice were observed during the first few hours after sample administration and for the next 14 days. Animals behaviour and toxicity signs were monitored for changes in the normal appearance of skin, mucous membranes, eyes, respiratory movements and behavior inherent to damage to central and autonomic nervous systems.

2.4.3. *Twenty-eight-day repeated dose toxicity test*

The repeated dose oral toxicity study (28 days) was performed according to the OECD 407 protocol (OECD, 2008), with slight modifications. Male and female Wistar rats (n = 5 / group), less than 9 weeks old, were used. Samples were resuspended in 0.9% saline and administered by oral gavage daily for 28 days using at 1,00 mg / kg body weight. Additional male and female groups administered with saline were used. The possible effects of the

samples on the natural behavior of rats was observed as previously described. Rat weights were recorded weekly. On the 28th day, rats were blood sampled through the retro-orbital plexus for the hematological and serum analyzes. Subsequently, the animals were euthanized by halothane overdose in a hermetically sealed chamber and dissected for visualization of anatomical and morphological condition of vital organs, and then carefully weighed to obtain the wet weight. The organs were immersed in 10% formalin for 24 h and then transferred to 70% ethyl alcohol until the completion of the histological routine.

2.4.3.1. Hematology and serum biochemistry

A part of the blood collected at the end of the oral dose toxicity test were kept in EDTA tubes for determination of hematological parameters and another part was collected to obtain serum for the determination of biochemical parameters. Blood samples were used to determine hematological and biochemical parameters. Hematological parameters were checked using an automated hematological analyzer (Sysmex, pocH - 100 iV Diif, Kobe, Japan). The following parameters were determined: total hemoglobin (HBC), hematocrit (HCT), mean corpuscular concentration (MCH), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular concentration of hemoglobin (MCHC), total white blood cell counts (WBC), total erythrocytes (PLT), mean platelet volume (MPV), percentage of neutrophils, basophils and monocytes of total WBC (OTHR%) and macrothrombocyte index (P-LCR).

The biochemical parameters were verified by an automated biochemical analyzer (Cobas C111, São Paulo, Brazil). Concentrations of glucose, total cholesterol, urea, creatinine, total protein, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase and creatinine were determined. Blood sodium and potassium levels were determined using Bioclin kits (Belo Horizonte, Brazil), following the manufacturer's instructions.

2.4.3.2. *Relative organs wet weight and histopathology*

At the end of the repeated dose toxicity test, the animals were carefully dissected and the organs were checked for their appearance (color, presence of stains and / or anatomical irregularities) by histopathologist. The carcasses and organs were weighed in a precision balance (0.0001 g). The organs dissected were the brain, thymus, heart, spleen, liver, adrenals, kidneys, gonad and accessory sexual organs (epididymis and testes or uterus and ovaries). The organs were then fixed by immersion in 10% buffered formalin for histopathological analysis.

All organs were processed in various stages of dehydration with ethanol in increasing concentrations (from 70 to 100%), diaphanized with xylol and paraffin embedded until solidified. Subsequently, they were cut and stained with eosin-hematoxylin. The slides of each structure were analyzed by a histopathologist, using a light microscope.

2.5. *Statistics*

Statistical comparisons were designed to determine whether differences in the response variables described above (body weight, hematology, serum biochemical parameters and relative organ wet weights) were attributable to EELTS and EELTP groups compared to the control group, saline. Significant differences between means were analyzed by Student's t-test and two-way with the GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

Extracts of plants rich in phenolic compounds frequently cause hemolysis of mammalian erythrocytes, and it is therefore important to investigate the presence of hemolytic activity (Ghandi, Cherian, 2000). In addition to the simple verification of the hemolytic properties of a sample, the hemolytic activity assay is useful to determine whether the

cytotoxic activity of the substance is related to direct cell membrane damage (Alencar et al., 2015). In this study, no hemolytic activity was detected in the EELTP against any of the blood types tested (rabbit and human type A, B and O), even at the highest tested concentration (2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). On the other hand, EELTS caused hemolysis of erythrocytes of both species (Figure 1). In human erythrocytes, hemolysis did not occur in a concentration-dependent manner and the highest hemolysis rate (30%) was verified at an intermediate concentration, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In rabbit erythrocytes, the highest hemolysis rate was also 30% but, this time, it was verified at the highest tested concentration, 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The hemolytic activity of EELTS can be explained for the presence of saponins in its composition as previously demonstrated by our team (Pessoa et al., 2016). The saponins have a surfactant effect and, when they come into contact with the erythrocyte suspension, they can permeabilize the red blood cells membrane, making them susceptible to hemolysis (Baumann et al., 2000; Voutquene et al., 2002). The presence of hemolytic compounds is quite common in plant extracts. For example, Kalita et al. (2011) studied extracts from the leaves of *Lantana camara*, also identified hemolytic activity in human blood in all the extracts tested (aqueous extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction, chloroform fraction, methanolic fraction and ethanolic fraction). The minimum activity observed in that study was in the aqueous extract (4.62%) and the maximum in the chloroform fraction (20.51%). The presence of hemolytic activity in EELTS points to the cautious use of *L. tomentosa* seeds for pharmacological purposes and in the food industry. Subsequently, EELTS can be subjected to thermal treatment and /or proteolytic digestion to evaluate the stability of hemolytic activity. This information may contribute to the development of strategies that reduce its hemolytic action but at the same time maintain the antioxidant properties of the extract (Pessoa et al., 2016).

Another means of evaluating the toxicity of an extract is through the acute toxicity test. This is part of a set of initial screening tests for chemicals for which there are no or few

toxicological studies (OECD, 2009). After administration of EELTS and EELTP in a single dose (2,000 mg /kg body weight), no death was recorded, behavioral, physical or any sign of toxicity was observed during the 14-day duration of the experiment. No macroscopic changes were observed in the organs dissected after the end of the experiment. Silva et al. (2014) carried out a toxicological evaluation of the ethyl acetate fraction of the root of *Scutia buxifolia* Reissek, in order to verify the safety of this species, since phytochemical studies showed the presence of polyphenols and flavonoids associated with antioxidant action. These authors did not observe any signs of toxicity, behavioral changes, weight changes or death occurrence in the 14 days of the experiment.

After the single dose acute toxicity test the oral toxicity test was performed with repeated doses for 28 days. The objective of this test was to assess the possible health risks resulting from continuous exposure in a limited period, observing the possible signs of cumulative effect in the organism, allowing a more complete evaluation (AOCD, 2008). As in the single dose acute oral toxicity test, no death and no change in behavior, physical or any other sign that could indicate toxicity were evident in males or females. Table 1 shows the body weight gain and food intake of the control group (saline solution) and of the test groups (EELTP and EELTS). There were no significant differences on the body weight gain and the mean feed intake between the test and control groups in either sex. Christopher et al. (2017) also performed 28-day repeated dose toxicity tests on methanolic extract of *Polygonum minus* leaves and observed no significant changes in body weight and feed intake of male and female rats after comparison with the control (saline solution). Phytochemical studies executed by the same research group with the *P. faecal* species have demonstrated the presence of flavonoids (mainly myricetin and quercetin) related to the inhibition of LDL oxidation, anti-ulcerative and anti-inflammatory activity. In addition to the body weight record, the relative moist weight of the male and female rat organs including the reproductive organs (brain, thymus,

heart, liver, spleen, kidneys, adrenals, testis, epididymis, ovaries and uterus) were used as another indicator of exposure to harmful agents. There were no significant changes in the relative moist body weight of either males or females, when comparing the test groups (EELTP and EELTS) with the control group (saline solution) (Table 2). Yam et al. (2013) studying *Orthosiphon stamineus* Benth, an important medicinal plant in Malaysia, also did not observe changes in the relative weight of organs of male and female rats that received orally the methanolic extract at any of the concentrations tested (1,250 mg /kg, 2,500 mg / kg and 5,000 mg /kg) when compared to the saline-only control.

The hematological parameters of the animals receiving daily oral dose of 1,000 mg / kg for 28 days of EELTP, EELTS or saline were determined and are summarized in Table 3. Treatment with the extracts did not promote significant changes in these parameters. As in the present work, aqueous extracts of *C. velutina* branches and leaves did not show alterations in hematological parameters when compared to control (Araujo et al., 2017). When quantifying (Table 4) the biochemical parameters, no statistical differences were observed between the test groups (EELTP and EELTS) and the control group (saline solution) for most parameters. However, the concentrations observed for potassium in males, and alkaline phosphatase in females of the test groups were significantly different ($p < 0.05$) in relation to the control group. Potassium is the most abundant cation in the intracellular fluid where it plays a fundamental role in the maintenance of cellular function, being essential in the muscular, cardiovascular, nervous, endocrine, respiratory, digestive and renal system (Stone et al., 2016). This mineral determines the osmolarity and distribution of fluids inside and outside the cell. Hyperkalemia is characterized by elevated potassium in the blood and may be caused by increased intake of this mineral, low urinary excretion, or transcellular abnormalities. This pathology has a multifactorial etiology, such as drug use and hyperglycemia; however, renal failure is the most common cause (Vieira; Wouka, 2015). The EELTP and EELTS promoted

changes in potassium concentration in males only (7.37 ± 0.47 and 7.57 ± 0.39 mmol /L, respectively), when compared to the control group (3.29 ± 0.07 mmol /L), indicating a possible renal damage. However, this is not a conclusive finding, since no macroscopic or histopathological changes were observed in the organs of male or female rats after dissection. Besides, potassium levels tend to exhibit high variations which can be related to several factors in processing the sample.

Alkaline phosphatase, in turn, is produced in various tissues, such as bones, kidneys, intestine, lung, placenta, neutrophils and activated T lymphocytes. It represents a group of four isoenzymes (bone, liver, intestinal and placental) that participate in important metabolic processes, such as bone formation, lipid transport, transport of renal and intestinal phosphate, transport of immunoglobulins of the IgG class during gestation and regulation of the pancreatic chloride channels (Melo et al., 2004; Pace et al., 1999). Both EELTP and EELTS showed higher alkaline phosphatase concentrations in females when compared to those of control group. Generally, little difference in sensitivity is observed between the sexes of the animals, but in cases where differences are observed, females are more sensitive (OECD, 423). EELTP, EELTS and saline showed alkaline phosphatase concentrations in rats of 109.30 ± 4.84 , 118.30 ± 3.84 , 76.75 ± 1.65 U /L, respectively. Males treated with *L. tomentosa* extracts showed levels similar to those of saline treated male rats. The reference values for alkaline phosphatase observed for Wistar rats vary widely in the literature according to the origin and sex of the animal. Ping et al. (2013) have described alkaline phosphatase values ranging from 142.0 to 231.0 U /L and Yam et al., (2013), from 247.0 to 316.0 U / L. Several factors may influence the increase of this enzyme in the serum, such as: age, drug therapy, temperature, pH, ion concentration, endocrine disease, gestational stage and neoplasias (Al-Shehri, 2006; Fernandez; Kidney, 2007). Although increased levels of this enzyme suggest hepatic damage, in the present study no histopathological changes were

observed in the liver of the animals treated with EELTS and EELTP. Similarly, no significant changes in alanine amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) levels were observed in the test groups compared to the control group, both in males and females. These are enzymes used as indicative of liver diseases (Table 4).

Histopathological analysis revealed that EELTP and EELTS did not cause changes in the organs tested. All the organs presented characteristics similar to those of the control group, which received only saline. Likewise, macroscopic changes, cytotoxic effect or any other signs indicating toxicity were not observed.

4. Conclusions

Ethanollic extracts of pulp and seed of *L. tomentosa* have been described as promising sources of bioactive phenolic compounds, but very little is known about the safe use of this underexplored species. In the present study, these samples were evaluated for *in vitro* hemolytic activity and *in vivo* toxicity by means of the single and repeated dose (28 days) oral acute toxicity test in rodents. The ethanollic extract of the pulp did not cause hemolysis in rabbit and human erythrocytes, whereas the seed extract showed hemolytic activity at rates up to 30%. This result deserves attention as to the need of further studies on the stability of hemolytic activity as well as to evaluate cytotoxicity against other cell types. On the other hand, these extracts did not cause mortality of the animals in the single dose and repeated dose acute toxicity tests. Among all the other parameters analyzed, only potassium levels in males and alkaline phosphatase in females of the repeated dose study were changed by the administration of EELTS and EELTP at the tested doses. Based on the results obtained, *L. tomentosa* extracts do not cause systemic toxicity and are considered safe because of the limit conditions under which they were tested. However, an additional assessment of subchronic or chronic toxicity and other studies is required to establish a complete toxicity profile.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of INSA (National Institute of Semi-arid) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development (Grant number 35/2010-562857/2010-9)).

References

- Alencar, D.B., Melo, A.A., Silva, G.C., Lima, R.L., Cavalcante, K.M.S.P., Carneiro, R.F., Rabelo, A.S., Sousa, O.V., Vieira, R.H.S.F., Viana, F.A., Sampaio, A.H., Sampaio, S.S. 2014. Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid *Palythoa caribaeorum*. *Annals Braz Acad Sci.* 87, 1113-1123, 2015.
- Al-Shehri, A.M. Factors affecting alkaline phosphatase activity of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Biol Sci.* 6, 931-935, 2006.
- Araujo, M.C.P.M., Barcellos, N.M.S., Vieira, P.M.A., Gouveia, T.M., Guerra, M.O., Peters, V.M., Saúde-Guimarães, D.A. 2017. Acute and sub chronic toxicity study of aqueous extract from the leaves and branches of *Campomanesia velutina* (Cambess) O. Berg. *J. Ethnopharmacol.* 201, 17-25.

- Baumann, E., Stoya, G., Volkner, A., Richter, W., Lemke, C., Linss, W. 2000. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochem.* 102, 21-35.
- Bernheimer, A. W. 1988. Assay of hemolytic toxins. *Methods Enzimol.* 165, 213-217.
- Christapher, P.V.; Parasuraman, S.; Asmawi, M.Z.; Murugaiyah, V. 2017. Acute and subchronic toxicity studies of methanol extract of polygonum minus leaves in Sprague Dawley rats. *Regul toxicol pharmacol.* 86, 33-41.
- Dutra, R.C., Campos, M.M, Santos, A.R.S., Calixto, J.B. 2016. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug Discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 112, 4-29.
- Ekor, M. 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol.* 4. 1-10.
- Feitosa, E.A., Xavier, H.S., Randau, K.P. 2012. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Braz J Pharmacogn.* 22, 1181-1186.
- Fernandes, J., Castillo, R.O, Costa, M.R., Souza, W.K., Coelho, K.M.A., Gattas, C.R. 2003. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett.* 2, 165-169.
- Fernandez, N. J., Kidney, B. A. 2007. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol.* 36, 223-233.
- Gandhi, V.M., Cherian, K.M. 2000. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicol. In Vitro.* 14, 513-516.
- Kalita, S., Kumar, G., Karthik, L., Rao, K.V.B. 2011. Phytochemical Composition and In Vitro Hemolytic Activity of *Lantana camara L. (Verbenaceae)* Leaves. *Pharmacol online.* 1, 59-67.

- Melo, M.C.N, Carneiro, N.B., Tolaymat, N., Paes, F.N., Bittencourt C.N, Diniz-Santos, D.R.; Silva, L.R. 2004. Hiperfosfataseia transitória benigna na infância. *Rev Cienc Med Biol.* 3, 108-114.
- Merker, M. P., Levine, L. 1986. A protein from the marine mollusc *Aplysia californica* that is hemolytic and simulates rarchidonic acid metabolism in cultured mammalian cells. *Toxicon.* 24, 5, 451-465.
- Merlin, N., Karling, M., Morales, R.G.F., Oldoni, T.L.C. 2017. Potencial antioxidante e perfil de compostos fenólicos em plantas com indicativo medicinal. *Syn. Scy.UTFPR.* 12, 94-101.
- Miranda, M.M, Gonçalves, J.L, Romanos, M.T., Silva, M.H., Ejzemberg, R., Granja, L.F., Wigg, M.D. 2002. Anti-herpes simplex vírus effect of a seed extract from tropical plant *Licania tomentosa* (Beth) Fritsch (Chrysobalanaceae). *Phytomed.* 9, 641-645.
- OECD,2009. Guideline for Testing of Chemicals: Acute Inhalation Toxicity. Guideline number 423. Adopted: 7 September 2009.
- OECD,2008. Guideline for Testing of Chemicals: Repeated-dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Guideline number 407. Adopted: 3 October 2008.
- Pace, A.E, Osinde, M.E. 1999. Hiperfosfataseia transitoria benigna de la infancia. Una aproximación diagnostica racional. *Arch Argent Pediatr.* 97, 383-390, 1999.
- Pessoa, I.P., Neto, J.J.L., Almeida, T.S., Farias, D.F., Vieira, L. R., Medeiros, J.L. Boligon, A.A., Peijnenburg, A. D, Castelar, I., Carvalho, A.F.F.U. 2016. Polyphenol Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Seeds from Two Underexploited Wild *Licania* Species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. *Mol.* 21, 1-16.
- Ping, K. Y., Darah, I., Chen, Y., Sreeramanan, S., Sasidharan, S. 2013. Acute and Subchronic Toxicity Study of *Euphorbia hirta* L. Methanol Extract in Rats. *BioMed Res Int.* 2013, 1-14.

- Silva, A.R.H., Moreira, L.R., Brum, E. S., Freitas, M. L., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Roman, S. S., Mazzanti, C. M., Brandão, R. 2014. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. J Ethnopharmacol. 153, 908-916.
- Sousa, E.P., Silva, L.M.M., Sousa, F.C., Martins, J.J.A., Gomes, J.P. 2013. Características físicas e físico-química dos frutos de oiti. Tecnol cienc agr. 7, 39-43.
- Stone, M. S., Martyn, L., Weaver, C.M. 2016. Potassium Intake, Bioavailability, Hypertension, and Glucose Control. Nutrients. 8, 444, 1-13.
- Vieira, A.J., Wouk, N. 2015. Potassium disorders: hypokalemia and hyperkalemia. Am Fam Phys. 92, 487-495.
- Voutquenne L, Lavaud C, Massiot G, Men-Olivier LL 2002. Structure-activity relationship of hemolytic saponins. Pharm Biol. 40, 253-262.
- Yam, M. F., Lim, C. P., Ang, L. F., Por, L. Y., Wong, S. T., Asmawi, M. Z., Basir, R., Ahmad, M. 2013. Antioxidant and Toxicity Studies of 50% Methanolic Extract of *Orthosiphon stamineus* Benth. Biomed Res Int. 2013. 1-10.

Table 1. Effects of the repeated dose 28-day oral administration of *Licania tomentosa* pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts on food intake and body weight of male and female rats.

Sex	Sample		
Male	Saline	EELTP	EELTS
Food intake (g)	549.8 ± 12.2	540.4 ± 6.6	504.4 ± 5.6
Body weight (g)	137.2 ± 6.3	144.6 ± 3.0	121.7 ± 5.3
Female			
Food intake (g)	474.0 ± 9.4	453.2 ± 7.7	431.9 ± 13.1
Body weight (g)	84.2 ± 2.0	90.2 ± 6.6	80.9 ± 2.8

Mean ± SD values (n = 5/group/sex); Measurements of food intakes and body weights showed no significant difference ($p > 0.05$, Student's t-test) between test and control groups.

Table 2. Relative organs wet weight of rats after repeated dose 28-day oral treatment with *Licania tomentosa* pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts.

Organ	Saline	Pulp	Seed
Male	(%)	(%)	(%)
Brain	0.96 ± 0.07	0.95 ± 0.01	1.10 ± 0.08
Heart	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.00	0.35 ± 0.02
Liver	4.20 ± 0.14	3.84 ± 0.09	3.81 ± 0.04
Spleen	0.22 ± 0.05	0.26 ± 0.00	0.25 ± 0.01
Thymus	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.26 ± 0.02
Kidney	0.91 ± 0.03	0.85 ± 0.02	0.90 ± 0.02
Adrenal	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Testis	1.33 ± 0.04	1.30 ± 0.01	1.28 ± 0.03
Epididymis	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.14 ± 0.00
Female			
Brain	1.14 ± 0.06	1.08 ± 0.06	1.16 ± 0.03
Heart	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.00	0.33 ± 0.00
Liver	3.41 ± 0.08	3.49 ± 0.13	3.36 ± 0.07
Spleen	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.01
Thymus	0.29 ± 0.00	0.34 ± 0.02	0.29 ± 0.03
Kidney	0.89 ± 0.03	0.87 ± 0.01	0.85 ± 0.02
Adrenal	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Ovary	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Uterus	0.23 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.18 ± 0.00

Mean ± SD values (n = 5/group/sex); Measurements of relative organs wet weight showed no significant difference (p > 0.05, Student's t-test) between test and control groups.

Table 3. Hematological values of rats after repeated dose 28-day oral treatment with *Licania tomentosa* pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts.

Hematological parameters			
Male	Saline	EELTP	EELTS
Hemoglobin (g/dL)	15.04 ± 0.23	14.84 ± 0.18	15.34 ± 0.32
Hematocrit (%)	42.80 ± 0.63	42.70 ± 0.40	43.70 ± 0.87
Total Leukocytes (10 ³ /μL)	11.76 ± 0.98	11.32 ± 0.12	11.50 ± 0.67
Lymphocyte (%)	86.05 ± 0.98	88.10 ± 0.68	84.36 ± 1.52
OTHR (%)	13.95 ± 0.76	11.90 ± 0.68	13.40 ± 1.21
Erythrocytes (10 ³ /μL)	8.05 ± 0.15	7.94 ± 0.04	8.40 ± 0.10
MCV (fL)	53.20 ± 0.66	53.76 ± 0.25	51.96 ± 0.45
MCH (pg)	18.72 ± 0.29	18.70 ± 0.14	18.24 ± 0.21
MCHC (g/dL)	35.14 ± 0.18	34.74 ± 0.16	35.08 ± 0.16
Platelet (10 ³ /μL)	1160.25 ± 40.81	1159 ± 68.30	1316 ± 53.76
MPV (fL)	7.44 ± 0.12	7.64 ± 0.22	7.20 ± 0.10
P-LCR (%)	7.56 ± 0.81	7.73 ± 1.27	6.50 ± 0.18
Female			
Hemoglobin (g/dL)	17.36 ± 0.38	16.56 ± 0.22	17.06 ± 0.16
Hematocrit (%)	41.20 ± 0.68	39.60 ± 0.31	40.66 ± 0.60
Total Leukocytes (10 ³ /μL)	7.80 ± 0.35	6.86 ± 0.12	8.32 ± 1.04
Lymphocyte (%)	86.44 ± 0.64	87.82 ± 1.59	82.58 ± 2.64
OTHR (%)	13.07 ± 0.98	10.65 ± 0.58	15.90 ± 1.96
Erythrocytes (10 ³ /μL)	8.80 ± 0.12	8.46 ± 0.17	8.58 ± 0.17
MCV (fL)	46.80 ± 0.32	47.90 ± 0.45	47.42 ± 0.31
MCH (g/dL)	19.68 ± 0.16	20.04 ± 0.28	19.92 ± 0.24
MCHC (g/dL)	42.11 ± 0.28	41.80 ± 0.25	41.96 ± 0.30
Platelet (10 ³ /μL)	1372.60 ± 54.33	1310.25 ± 58.00	1360 ± 37.18
MPV (fL)	7.28 ± 0.33	7.06 ± 0.17	7.02 ± 0.13
P-LCR (%)	8.24 ± 1.61	7.72 ± 0.80	6.54 ± 0.72

Mean ± SD values (n = 5/group/sex); Measurements of hematological parameters showed no significant difference ($p > 0.05$, Student's t-test) between test and control groups.

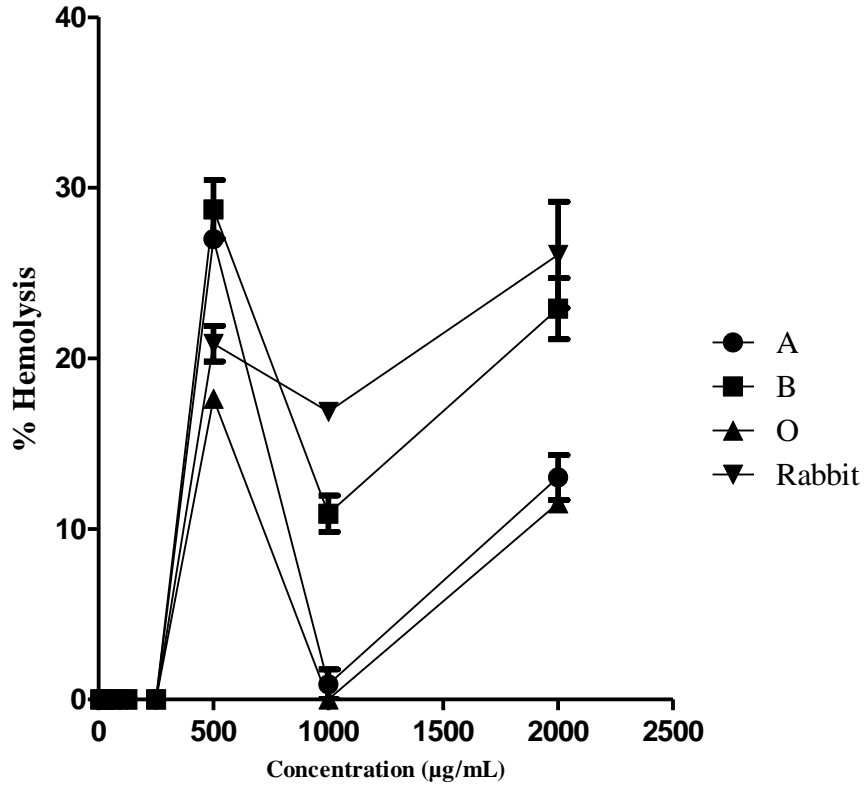
OTHR: Neutrophils, basophils and monocytes from total leukocytes (%), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Mean Cell Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Macrothrombocyte index (MPV), Mean platelet volume (P-LCR).

Table 4. Serum biochemistry values of rats after repeated dose 28-day oral treatment with *Licania tomentosa* pulp (EELTP) and seed (EELTS) ethanolic extracts.

Serum parameters	Saline	EELTP	EELTS
Male			
ALT (U/L)	25.20 ± 1.74	25.2 ± 1.58	22.80 ± 1.53
AST (U/L)	96.00 ± 4.12	93.37 ± 1.09	93.55 ± 3.81
Total bilirubin (mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Direct bilirubin (mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Alkaline phosphatase (U/L)	228.3 ± 12.81	221.80 ± 3.75	205.30 ± 6.06
Total cholesterol (mg/dL)	66.11 ± 1.48	67.68 ± 5.02	70.95 ± 3.89
Triglycerides (mg/dL)	5.69 ± 0.07	5.47 ± 0.14	5.37 ± 0.12
Glycaemia (mg/dL)	96.33 ± 1.76	97.50 ± 7.59	83.25 ± 4.49
Creatinine (mg/dL)	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.00	0.27 ± 0.02
Albumin (g/dL)	3.66 ± 0.02	3.90 ± 0.10	3.80 ± 0.06
Sodium (mmol/L)	116.30 ± 5.14	122.70 ± 8.23	125.40 ± 7.75
Potassium (mmol/L)	3.29 ± 0.07	7.37 ± 0.47*	7.57 ± 0.39*
Female			
ALT (U/L)	23.80 ± 1.93	21.6 ± 1.36	24.20 ± 1.62
AST (U/L)	85.05 ± 4.29	82.64 ± 4.59	91.70 ± 4.13
Total bilirubin (mg/dL)	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.00
Direct bilirubin (mg/dL)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Alkaline phosphatase (U/L)	76.75 ± 1.65	109.30 ± 4.84*	118.30 ± 3.84*
Total cholesterol (mg/dL)	52.13 ± 2.40	51.55 ± 4.04	52.03 ± 3.80
Triglycerides (mg/dL)	2.01 ± 0.02	1.94 ± 0.03	1.92 ± 0.06
Glycaemia (mg/dL)	93.80 ± 11.13	98.60 ± 3.20	110 ± 10.45
Creatinine (mg/dL)	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.04
Albumin (g/dL)	4.26 ± 0.06	4.37 ± 0.07	4.15 ± 0.08
Sodium (mmol/L)	119.10 ± 4.77	116.40 ± 3.83	126.8 ± 4.39
Potassium (mmol/L)	7.38 ± 0.33	9.15 ± 0.54	9.36 ± 0.65

Mean ± SD values (n = 5/group/sex); *Measurements of serum parameters in the same row with significant difference ($p < 0.05$, Student's t-test) between test and control groups.

Figure 1: Hemolytic activity in human and rabbit erythrocytes treated with *Licania tomentosa* seed (EELTS) ethanolic extracts at different concentrations (8 to 2,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$)



There was no significant difference ($p < 0.05$) between the test groups and the control (two-way statistical test). The results are means \pm standard deviation.