



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

**FRANCISCO CIRINEU DAS CHAGAS NETO**

**CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E ASPECTOS FUNCIONAIS DO EXTRATO  
DE JUCÁ (*LIBIDIBIA FERREA*): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTIOXIDANTE**

FORTALEZA

2022

FRANCISCO CIRINEU DAS CHAGAS NETO

CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E ASPECTOS FUNCIONAIS DO EXTRATO DE JUCÁ (*LIBIDIBIA FERREA*): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE

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

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

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

C424c Chagas Neto, Francisco Cirineu das.

Caracterização, toxicidade e aspectos funcionais do extrato de jucá (*Libidibia ferrea*):  
atividades anti-inflamatória e antioxidante / Francisco Cirineu das Chagas Neto. – 2022.  
128 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia  
e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

1. Fabaceae. 2. Compostos fenólicos. 3. Antioxidantes. 4. Agente anti-inflamatório. 5.  
Alimento funcional. I. Título.

CDD 615

---

FRANCISCO CIRINEU DAS CHAGAS NETO

CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E ASPECTOS FUNCIONAIS DO EXTRATO DE JUCÁ (*LIBIDIBIA FERREA*): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE

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

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

---

Antônia Torres Ávila Pimenta

---

Patrícia Maria Pontes Thé

---

Bianca Oliveira Louchard

---

Luciana de Siqueira Oliveira

---

David Fernandes Lima

Aos meus queridos pais, meus melhores orientadores na vida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida, por minha saúde e por colocar no meu caminho tantas pessoas maravilhosas.

Agradeço especialmente aos meus pais, Pedro Aloísio e Lúcia Rios, por sempre acreditarem no meu potencial e me estimularem a seguir o caminho da educação, vocês são os meus heróis.

Agradeço as minhas irmãs Mara Moraes e Conceição Soraya, ao meu irmão Pedro Juan e ao meu sobrinho João Hugo, os quais sempre me ajudaram cada um à sua maneira e me deram o suporte que eu precisava seja com palavras ou ações.

A minha namorada Nadiejda Nobre, por todo amor, pela parceria, conselhos e compreensão durante esses anos.

A Universidade Federal do Ceará – UFC, pela excelência no ensino e na pesquisa e por prover os recursos humanos e materiais necessários ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço a professora Kalyne Leal, pelo exemplo como pesquisadora e líder o qual vou levar comigo para a vida profissional.

Agradeço aos membros da banca pelas contribuições e sugestões valiosas para esta pesquisa.

Agradeço a professora Patrícia Thé, minha primeira orientadora na UFC, a pessoa que me estimulou a dar o pontapé inicial para a vida de pesquisador e ao estudo do jucá.

A todos os professores do curso de farmácia da Universidade Federal do Ceará, mas de forma especial a professora Izabel Mesquita e ao professor Carlos Couto, pelos ensinamentos e por serem uma inspiração como pessoas e como profissionais.

Agradeço a professora Antônia Pimenta, por toda ajuda desde o mestrado com a parte química e com os incentivos ao meu crescimento profissional.

Agradeço aos professores Ramon Bezerra e Márcia Pitombeira pela disponibilidade e ajuda na realização dos estudos de toxicidade *in vivo*.

Agradeço a Embrapa Agroindústria Tropical, em especial ao professor Kirley Canuto e ao Paulo Riceli pelo auxílio na caracterização química do extrato de Jucá.

A empresa Givaudan pela gentileza de disponibilizar material vegetal para a realização de parte dos experimentos.

Agradeço ao Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos - CEFAC, minha segunda casa durante mais de seis anos, aos colegas que fizeram e fazem parte desse laboratório, agradeço pela amizade e pelo ambiente científico leve e tranquilo no qual pude fazer parte.

Aos funcionários do departamento de farmácia, em especial a Elita, Dani, Maxwilliam, Jéssica e Juliana por serem prestativos, por sua amizade e pelo acolhimento.

Além desses, agradeço a todos os amigos e as pessoas que, de forma direta e indireta, contribuíram para o meu crescimento como pessoa, a todos vocês o meu muito obrigado!

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE E ASPECTOS FUNCIONAIS DO EXTRATO DE JUCÁ (*LIBIDIBIA FERREA*): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE

Alimentos funcionais são alimentos que além de nutrir promovem efeito positivo a saúde de quem os consome, parte desses alimentos são derivados de plantas. Existem muitas espécies de plantas que possuem potencial alimentar pouco explorado (PANC) e podem ser utilizadas na alimentação funcional. Espécies como o jucá (*Libidibia ferrea*) apresentam riqueza em compostos funcionais de interesse como polifenóis, compostos com reconhecidas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. No presente estudo avaliamos a segurança e o potencial funcional do extrato seco de *Libidibia ferrea* (ESLF). O extrato foi caracterizado físico-quimicamente. A toxicidade foi investigada em camundongos, segundo metodologias proposta pela OECD. A atividade antioxidante foi avaliada através do sequestro dos radicais hidroxil e superóxido. O efeito anti-inflamatório do ESLF ou metil galato (ativo majoritário da planta) foi investigado através de modelo *in vivo* - edema de pata induzido por carragenina (Cg) em camundongos; e *in vitro* – neutrófilo humano e células microgliais. O ESLF possui 27% de polifenóis, entre eles, três flavonoides (apigenina, orientina e isoorientina) e dois ácidos fenólicos (ácido elágico e metil galato), sendo o metil galato o composto majoritário (38,15 µg/mg). A dose diária do ESLF (30, 100 e 300 mg/kg) durante 28 dias não causou a morte de camundongos nem alterou parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue associados as funções renal, hepática e no metabolismo de carboidratos. Com exceção para a redução do número de plaquetas nas doses 30 e 300 mg/kg em comparação com o controle após 28 dias de tratamento diário com o ESLF. A análise histológica (ESLF doses repetidas) mostrou uma elevação de mitoses celulares no tecido hepático com o aumento da dose administrada. O ESLF mostrou efeito sequestrador dos radicais hidroxil e superóxido. O tratamento dos animais com ESLF (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente o volume do edema de pata induzido por Cg em camundongos, bem como a concentração de MPO, a produção de TNF- $\alpha$ , a peroxidação lipídica, mas não interferiu nas taxas das enzimas antioxidantes (SOD e GSH). O ESLF e o metil galato não foram tóxicos para neutrófilo e micróglia, e mostraram efeito anti-inflamatório, expressos pela redução EROs por quimiluminescência, da atividade MPO, NO e/ou IL-6. O ESLF mostrou efeito antioxidante/anti-inflamatório comparável

ou superior ao extrato chá-verde (antioxidante de referência; teor de fenóis: 15%). O ESLF possui teor de fenóis superior ao chá-verde, apresentou baixa toxicidade e atividades antioxidante e anti-inflamatória promissora. A bioatividade do ESLF está associada pelo menos em parte a presença de metil galato, e está associada a redução da produção de EROs, citocinas e ao acúmulo de células no foco inflamatório. O ESLF mostrou-se um PANC em potencial que poderá auxiliar na prevenção ou controle de doenças inflamatórias de alto impacto social, como as neurodegenerativas.

**Palavras-chave:** Fabaceae; compostos fenólicos, antioxidantes; agente anti-inflamatório; alimento funcional.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION, TOXICITY AND FUNCTIONAL ASPECTS OF JUCÁ EXTRACT (*LIBIDIBIA FERREA*): ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES

Functional foods are foods that, in addition to nourishing, promote a positive effect on the health of those who consume them, part of these foods is derived from plants. There are many plant species that have little explored food potential (PANC) and can be used in functional food. Species such as jucá (*Libidibia ferrea*) are rich in functional compounds of interest such as polyphenols, compounds with recognized antioxidant and anti-inflammatory properties. In the present study, we evaluated the safety and functional potential of *Libidibia ferrea* dry extract (ESLF). The extract was physicochemically characterized. Toxicity was investigated in mice, according to methodologies proposed by the OECD. The antioxidant activity was evaluated through the scavenging of hydroxyl and superoxide radicals. The anti-inflammatory effect of ESLF or methyl gallate (major active of the plant) was investigated through an *in vivo* model - paw edema induced by carrageenan (Cg) in mice; and *in vitro* – human neutrophil and microglial cells. ESLF has 27% polyphenols, including three flavonoids (apigenin, orientin and isoorientin) and two phenolic acids (ellagic acid and methyl gallate), with methyl gallate being the major compound (38.15 µg/mg). The daily dose of ESLF (30, 100 and 300 mg/kg) for 28 days did not cause the death of mice or change hematological and biochemical parameters of the blood associated with renal, hepatic and carbohydrate metabolism functions. Except for the reduction in platelet numbers at doses of 30 and 300 mg/kg compared to control after 28 days of daily treatment with ESLF. Histological analysis (ESLF repeated doses) showed an elevation of cell mitoses in liver tissue with increasing dose administered. ESLF showed a scavenging effect on hydroxyl and superoxide radicals. Treatment of animals with ESLF (200 mg/kg, v.o.) significantly reduced the volume of Cg-induced paw edema in mice, as well as MPO concentration, TNF-α production, lipid peroxidation, but did not interfere in the levels of antioxidant enzymes (SOD and GSH). ESLF and methyl gallate were not toxic to neutrophils and microglia, and showed an anti-inflammatory effect, expressed by the reduction of ROS by chemiluminescence, of MPO, NO and/or IL-6 activity. ESLF showed an antioxidant/anti-inflammatory effect comparable or superior to green tea extract (reference antioxidant; phenol content: 15%). ESLF has a higher phenol content than

green tea, showed low toxicity and promising antioxidant and anti-inflammatory activities. ESLF bioactivity is associated at least in part with the presence of methyl gallate, and is associated with reduced production of ROS, cytokines and accumulation of cells in the inflammatory focus. The ESLF proved to be a potential PANC that could help in the prevention or control of inflammatory diseases with a high social impact, such as neurodegenerative ones.

**Keywords:** Fabaceae; phenolic compounds, antioxidant; anti-inflammatory agents; functional food.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Classificação dos compostos fenólicos.....	25
Figura 2 - <i>Libidibia ferrea</i> (1- Árvore, 2- casca, 3- folhas, 4- vagens).....	26
Figura 3 - Consequências do estresse oxidativo para estruturas celulares .....	38
Figura 4 - Mecanismo enzimático de controle antioxidante.....	39
Figura 5 - Organograma com o panorama geral das etapas de avaliação do extrato seco de <i>Libidibia ferrea</i> . .....	45
Figura 6- Granulometria do extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	60
Figura 7- Curva de calibração do ácido gálico obtida por espectrofotometria UV- VIS a 785 nm .....	61
Figura 8- Cromatograma e espectros de massa de compostos identificados no extrato seco de <i>Libidibia ferrea</i> . Ácido quinico (1), Metil galato (3), orientina (5), ácido elágico (7) e isoorientina (8) .....	63
Figura 9- Curva de calibração do metil galato obtida a partir da área de pico usando método cromatográfico (HPLC-UV/Vis).....	66
Figura 10- Sobreposição do extrato seco de <i>L. ferrea</i> e o padrão metil galato. Espectro de Varredura do metil galato de 190 à 400 nm gerado por CLAE – DAD ..	66
Figura 11- Evolução do peso de camundongos durante período de tratamento diário com o extrato de <i>L. ferrea</i> e o veículo água .....	71
Figura 12 - Fotomicrografias (400x) do rim e fígado de camundongos swiss tratados e não tratados (controle) com extrato de <i>L. ferrea</i> por via oral durante 28 dias .....	76
Figura 13- Atividade do extrato seco de <i>L. ferrea</i> no sequestro do radical hidroxil ...	77
Figura 14- Atividade do extrato seco de <i>L. ferrea</i> no sequestro do radical superóxido .....	78
Figura 15- Volume de edema de pata e atividade da enzima mieloperoxidase no tecido subcutâneo das patas de camundongos swiss induzido por carragenina após pré-tratamento com o extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	79
Figura 16- Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> , metil galato e extrato de <i>C. sinensis</i> na produção de TNF- $\alpha$ no tecido subcutâneo da pata de camundongos estimulado por carragenina .....	82
Figura 17- Teores de malondialdeído e nas enzimas antioxidantes SOD e GSH no tecido subcutâneo de patas de camundongos pré-tratados com extrato de <i>L. ferrea</i> , metil galato, e extrato de <i>C. sinensis</i> .....	84

Figura 18- Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> sobre o metabolismo mitocondrial de neutrófilos humanos (ensaio do MTT).....	85
Figura 19- Efeito do extrato seco de <i>L. ferrea</i> na viabilidade de neutrófilos humanos através da mensuração da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	86
Figura 20- Efeito do metil galato sobre o metabolismo mitocondrial de neutrófilos humanos (ensaio do MTT) .....	87
Figura 21- Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> e metil galato na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos humanos induzida por PMA .....	88
Figura 22- Efeito do extrato seco de <i>L. ferrea</i> na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos estimulados por PMA.....	89
Figura 23- Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> sobre o metabolismo mitocondrial de micróglia BV2 (ensaio do MTT) .....	90
Figura 24- Efeito do metil galato sobre o metabolismo mitocondrial de micróglia BV2 (ensaio do MTT) .....	91
Figura 25- Produção de nitrito em micróglia estimuladas por LPS após pré-tratamento com ESLF e metil galato .....	92
Figura 26- Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de micróglia induzida por LPS .....	93
Figura 27- Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> na produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ em micróglia estimuladas por LPS .....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Constituintes químicos de <i>L. ferrea</i> com destaque para o composto químico, fórmula estrutural, parte da planta encontrada e referências.....	28
Tabela 2- Caracterização química e propriedades biológicas de <i>Libidibia ferrea</i> com destaque para parte da planta, modelo experimental utilizado e referências.....	35
Tabela 3- Programação do tempo de corrida e gradiente da fase móvel utilizados para caracterização do metil galato no extrato seco de <i>L. ferrea</i> via HPLC-DAD. ....	49
Tabela 4- Caracterização física e química do extrato seco de <i>L. ferrea</i> (ESLF) .....	61
Tabela 5- Constituintes químicos detectados no extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	64
Tabela 6- Efeitos do extrato seco de <i>L. ferrea</i> sobre parâmetros hematológicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose única. ....	68
Tabela 7- Contagem diferencial de células sanguíneas (linfócitos e segmentados) de camundongos swiss fêmeas após protocolo de toxicidade dose única com extrato seco de <i>L. ferrea</i> . ....	68
Tabela 8- Efeitos do extrato liofilizado de <i>L. ferrea</i> sobre parâmetros bioquímicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose única. ....	70
Tabela 9- Efeitos do extrato seco de <i>L. ferrea</i> sobre parâmetros hematológicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose repetida. ....	72
Tabela 10 - Contagem diferencial de células sanguíneas (linfócitos e segmentados) de camundongos swiss fêmeas após protocolo de toxicidade dose repetida com extrato seco de <i>L. ferrea</i> . ....	73
Tabela 11- Efeitos do extrato liofilizado de <i>L. ferrea</i> sobre parâmetros bioquímicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose repetida. ....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
AST	Aspartato aminotransferase;
BCA	<i>Bicinchoninic Acid Kit</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase;
CEFAC	Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos;
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa Humana;
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais;
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo;
DMSO -	Dimetilsulfóxido;
DNA	Ácido desoxirribonucleico;
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil;
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético;
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay;</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
E.P.M	Erro Padrão da média;
EROs	Espécies reativas de oxigênio;
GPx	Glutathione peroxidase;
GSH	Glutathione reduzida;
GSSG	Glutathione oxidada;
HDL	Colesterol de alta densidade;
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography;</i>
HGM CoA-redutase	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase;
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta;
IL-6	Interleucina 6;
IL-8	Interleucina 8;
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível;
JAK	Janus quinase;
LDH	Lactato desidrogenase;
LDL	Colesterol de baixa densidade;

LPS	Lipopolissacarídeo;
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio;
MDA	Malondialdeído;
MPO	Mieloperoxidase;
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium];
NBT	<i>Nitroblue</i> Tetrazólio;
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa-B;
NO	Óxido nítrico;
NOS	Óxido nítrico sintase;
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico;
QL	Quimioluminescência;
ORAC	Capacidade De Absorção Do Radical De Oxigênio;
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos;
PBS	Tampão fosfato-salino;
PMA	Forbol Miristato Acetato;
PVDF	Difloreto de polivilidina;
RDC	Resolução da diretoria colegiada;
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> ;
SOD	Superóxido dismutase;
SPE	Extração em fase sólida;
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição;
TLRs	<i>Toll like receptors</i> ;
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> ;
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa;
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> .
UV-VIS	Ultravioleta - visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas;
° C	Graus Celsius;
h.	Horas;
µg/mL	Microgramas por mililitro;
µMolar	Micromolar
µL	Microlitro
µg	Microgramas;
mg	Miligramas
mg/Kg	Miligramas por Quilograma;
min.	Minutos;
nm	Nanômetros;
ppm	Partes por milhão;
rpm	Rotações por minuto
%	Porcentagem.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
1.1 Alimentos funcionais e ingredientes funcionais .....	22
1.2 Plantas medicinais e alimentícias .....	23
1.3 Jucá ( <i>Libidibia ferrea</i> ) L.P. Queiroz.....	25
1.3.1 Aspectos agronômicos e etnofarmacológicos .....	25
1.3.2 Aspectos químicos das folhas .....	26
1.3.3 Atividade biológica .....	34
1.4 Processo inflamatório e estresse oxidativo .....	36
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral: .....	41
3.2 Objetivos Específicos: .....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Aspectos éticos .....	42
4.2 Material de estudo.....	42
4.2.1 Extrato seco de <i>Libidibia ferrea</i> .....	42
4.2.1.1 Coleta .....	42
4.2.1.2 Preparo do extrato .....	42
4.2.2 Outros Materiais.....	43
4.3 Material biológico.....	43
4.4 Animais .....	43
4.5 Equipamentos.....	44
4.6 Estratégia experimental.....	45
4.7 Caracterização do extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	46
4.7.1 Caracterização física do extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	46
4.7.2 Caracterização química do extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	47
4.7.2.1 Determinação do teor de fenóis totais no extrato de <i>L. ferrea</i> por espectrofotometria.....	47

4.7.2.2	Análise cromatográfica do extrato seco de <i>L. ferrea</i> por UPLC-MS .....	48
4.7.2.3	Quantificação de metil galato no extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	49
4.8	Avaliação toxicológica .....	50
4.8.1	Avaliação da toxicidade do extrato seco de <i>L. ferrea</i> administrado em dose única em camundongos swiss .....	50
4.8.2	Avaliação da toxicidade do extrato seco de <i>L. ferrea</i> administrado em dose repetida em camundongos swiss .....	50
4.9	Aspectos funcionais .....	51
4.9.1	Avaliação da atividade sequestradora de radicais hidroxil .....	51
4.9.2	Avaliação da atividade sequestradora de radicais superóxido .....	51
4.9.3	Mensuração do edema de pata de camundongos induzido por carragenina .....	52
4.9.4	Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo das patas de camundongos induzido por carragenina .....	52
4.9.5	Quantificação do teor de TNF- $\alpha$ no tecido subcutâneo das patas de camundongos estimulados por carragenina.....	53
4.9.6	Mensuração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido subcutâneo das patas dos camundongos estimulados por carragenina .....	53
4.9.7	Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no tecido subcutâneo das patas dos camundongos estimulados por carragenina .....	54
4.9.8	Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH) no tecido subcutâneo das patas dos camundongos estimulados por carragenina .....	54
4.9.9	Avaliação da viabilidade celular do extrato seco de <i>L. ferrea</i> e do metil galato através da atividade metabólica de neutrófilos humanos (ensaio MTT).....	55
4.9.10	Avaliação da viabilidade celular do extrato seco de <i>L. ferrea</i> através da quantificação de lactato desidrogenase (LDH) liberada por neutrófilos humanos .....	55
4.9.11	Avaliação da atividade do extrato seco de <i>L. ferrea</i> na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos induzidos por PMA .....	56
4.9.12	Determinação da desgranulação de mieloperoxidase em neutrófilos humanos estimulados por PMA e pré-tratados com o extrato seco de <i>L. ferrea</i> e metil galato .....	57

4.9.13	Avaliação da viabilidade celular do extrato seco de <i>L. ferrea</i> e do metil galato através da atividade metabólica de micróglia (ensaio MTT).....	57
4.9.14	Mensuração da produção de NO em micróglia estimuladas por LPS e pré-tratadas com o extrato seco de <i>L. ferrea</i> e metil galato .....	58
4.9.15	Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de micróglia estimuladas por LPS e pré-tratadas com o extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	58
4.9.16	Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em micróglia estimuladas por LPS e pré-tratadas com o extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	59
4.10	Análise estatística .....	59
5.	RESULTADOS .....	60
5.1	Caracterização do extrato seco de <i>L. ferrea</i> .....	60
5.1.1	Caracterização física .....	60
5.1.2	Caracterização química.....	61
5.1.2.1	Quantificação de fenóis totais no extrato seco de <i>L. ferrea</i> por espectrofotometria .....	61
5.1.2.2	Caracterização do extrato seco de <i>L. ferrea</i> por UPLC-MS.....	62
5.1.2.3	Quantificação de metil galato no extrato seco de <i>L. ferrea</i> por CLAE-DAD .....	65
5.2	Avaliação Toxicológica do extrato de <i>L. ferrea</i> .....	67
5.2.1	Avaliação da toxicidade em dose única .....	67
5.2.2	Parâmetros hematológicos.....	67
5.2.3	Parâmetros bioquímicos .....	68
5.2.4	Avaliação da toxicidade em dose repetida .....	70
5.2.5	Parâmetros hematológicos.....	71
5.2.6	Parâmetros bioquímicos .....	73
5.2.7	Avaliação histopatológica .....	74
5.3	Aspectos funcionais: atividades antioxidante e anti-inflamatória .....	77
5.3.1	Atividade sequestradora do radical hidroxil.....	77
5.3.2	Atividade sequestradora do ânion superóxido .....	78

5.3.3 Atividade antiedematogênica e efeito redutor da migração neutrofílica do ESLF no modelo de edema de pata induzido por carragenina .....	78
5.3.4 Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> , metil galato e <i>C. sinensis</i> sobre os níveis da interleucina TNF- $\alpha$ no tecido subcutâneo das patas de camundongos induzido por carragenina .....	80
5.3.5 Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> no controle da lipoperoxidação e modulação das enzimas antioxidantes SOD e GSH utilizando o tecido subcutâneo das patas dos camundongos induzido por carragenina.....	82
5.3.6 Extrato seco de <i>L. ferrea</i> não altera o metabolismo de neutrófilos através do ensaio do MTT .....	85
5.3.7 Extrato seco de <i>L. ferrea</i> não interfere na atividade da enzima LDH .....	85
5.3.8 Efeito do metil galato no metabolismo de neutrófilos através do ensaio do MTT ..	86
5.3.9 Efeito do extrato seco de <i>L. ferrea</i> e metil galato na redução da degranulação da enzima MPO de neutrófilos humanos estimulados por PMA .....	87
5.3.10 Atividade do extrato de <i>L. ferrea</i> na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos estimulados por PMA.....	89
5.3.11 Extrato seco de <i>L. ferrea</i> não altera o metabolismo de micróglia através do ensaio do MTT .....	90
5.3.12 Efeito do metil galato no metabolismo de micróglia através do ensaio do MTT .	90
5.3.13 Efeito do extrato seco de <i>L. ferrea</i> e metil galato na redução da produção de nitrito por micróglia estimuladas por LPS.....	91
5.3.14 Extrato de <i>L. ferrea</i> não interfere na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em micróglia estimuladas por LPS .....	93
5.3.15 Efeito do extrato de <i>L. ferrea</i> sobre os níveis das interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ em micróglia BV2 estimulados por LPS .....	93
6 DISCUSSÃO .....	96
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	110
8. CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS .....	112

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Alimentos funcionais e ingredientes funcionais

A busca por hábitos saudáveis vem crescendo no mundo, parte desse crescimento foi impulsionado por uma maior preocupação com os cuidados com a saúde. Estimulada por esse cuidado, foi observado um crescimento na procura de alimentos saudáveis. Nesse sentido, é observado uma tendência na expansão no setor de alimentos que além de nutrir, ainda proporcionam algum benefício, os alimentos funcionais (KHALAF et al., 2021).

Essa tendência iniciou-se em meados de 1980 através de pesquisas apoiadas pelo governo japonês em parceria com pesquisadores dos campos das ciências alimentares, nutricionais, farmacêuticas e médicas que levou à criação da primeira política mundial para legalização da comercialização de alimentos com funções específicas de promoção da saúde, os “Foods for Specified Health Use” (SHIMIZU, 2014). Esse conceito evoluiu durante os anos e desde 1993 os alimentos que além de nutrir ainda exercem um impacto positivo na saúde, performance física ou estado mental de um indivíduo são conhecidos como alimentos funcionais (SWINBANKS; O'BRIEN, 1993). É necessário salientar, no entanto, que os benefícios desses alimentos só serão atingidos desde que associados a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudável.

No Brasil, a legislação sobre alimentos funcionais e produtos bioativos é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através das RDC 16, 17, 18 e 19/1999 (BRASIL 1999) e pela RDC 243/2018 (BRASIL, 2018). A Resolução 16 regulamenta os procedimentos para registro de novos alimentos e/ou novos ingredientes, a RDC 17 aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos (BRASIL, 1999). As alegações de propriedade funcional e as alegações de propriedade de saúde são regulamentadas pela RDC 18, que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação dessas alegações e RDC 19 determina os procedimentos para registro de alimentos com tais alegações (BRASIL, 1999). A regulamentação de produtos bioativos é determinada pela RDC 243 de 2018 da ANVISA e dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, avaliação da segurança e rotulagem de produtos bioativos (BRASIL, 2018).

O mercado mundial de alimentos funcionais movimentou em torno de 281 bilhões de dólares em 2021. Projeções apontam um crescimento anual composto de cerca de 9,5% entre 2021 e 2028 e há uma estimativa de arrecadação de mais de meio trilhão de dólares para 2028 (STATISTA, 2021).

Parte desses alimentos funcionais são compostos por plantas. Os índices do mercado de alimentos baseados em plantas preveem um faturamento de 44 bilhões de dólares no mundo em 2022 com expectativa de arrecadação em torno de 78 bilhões em 2025 (STATISTA, 2021).

## 1.2 Plantas medicinais e alimentícias

Plantas medicinais são espécies vegetais cultivadas ou não, utilizadas com propósito terapêutico (BRASIL, 2013). Várias espécies vegetais têm contribuído na prevenção de doenças crônicas na qual a inflamação e o estresse oxidativo têm um papel importante. *Camellia sinensis*, por exemplo, é uma espécie muito estudada devido ao potencial antioxidante e como neuroprotetor, propriedades advindas da riqueza dessa espécie em compostos fenólicos como epicatequina e epigallocatequina galato (ZHAO et al., 2014; BITU-PINTO et al., 2015; MARTINS et al., 2017). *Camellia sinensis* possui ainda valor nutricional em relação a proteínas e minerais como zinco e manganês (CZERNICKA et al., 2017), o que faz dela uma espécie também como opção como uma planta alimentícia.

Entre as espécies vegetais com alto potencial como alimento funcional estão as plantas alimentares não convencionais (PANCs). Espécies de plantas silvestres ou cultivadas, muitas vezes subvalorizadas ou pouco consumidas pela população, mas que podem ser opções alimentares fontes de macro e micronutrientes essenciais como proteínas e vitaminas. Espécies como a *Moringa oleifera*, *Jatropha curcas L.*, *Bambusa vulgaris* e *Pereskia aculeata Miller* ainda são pouco exploradas, porém são ricas em proteínas, que podem estar presentes em diversas partes da planta como nas folhas e sementes. Os teores proteicos dessas espécies podem variar de 20 a 37%, tendo um grande potencial para serem exploradas pela indústria de alimentos (LEÓN-VILLANUEVA et al., 2018; CHEN et al., 2019; GARCIA et al., 2019; WANG et al., 2020).

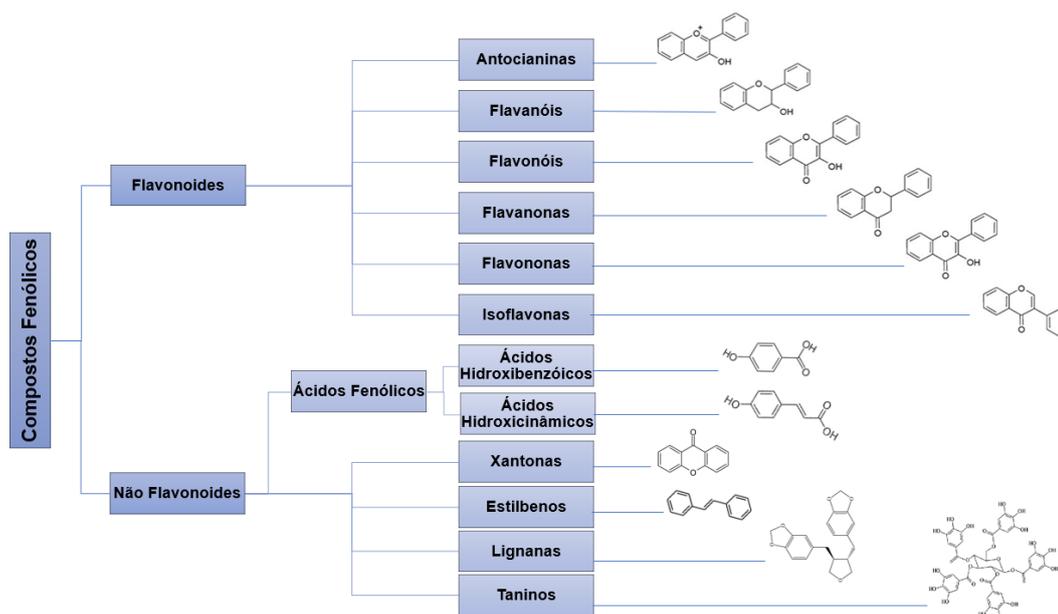
Algumas plantas alimentícias, além de nutrir, possuem propriedades de interesse para a prevenção de determinadas enfermidades (FERREIRA JÚNIOR;

CAMPOS; MEDEIROS, 2021). A *Curcuma longa*, por exemplo, vem ganhando destaque devido a efeitos biológicos como a atividade antioxidante, metabolismo lipídico e supressão da inflamação, atividades associadas a presença de compostos como a curcumina (HOSEN et al., 2017; KIM, CLIFTON, 2018).

Nos últimos anos espécies vegetais tiveram suas propriedades avaliadas quanto ao potencial nutricional, sendo por vezes processadas e incorporados na formulação de outros alimentos como pães e biscoitos. Os alimentos incorporados com ingredientes funcionais passaram a possuir propriedades associadas ao benefício trazido pelo ingrediente. O extrato de *Camellia sinensis*, por exemplo, foi incorporado a farinha de trigo para a preparação de pães integrais e foi observado que os pães tiveram uma melhora significativa nas características físicas, tempo de estabilidade e aumentou a atividade antioxidante em 18,5% quando usada a quantidade de 1g do extrato seco/100g de farinha, observando ainda uma tendência a elevação da atividade antioxidante com o aumento da proporção de extrato de *Camellia sinensis* (NING et al., 2017). A presença de compostos fenólicos pode explicar parte desse efeito da espécie.

A grande família de compostos fenólicos caracteriza-se por possuir um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila. Existem diferentes classificações para os polifenóis, a mais adotada classifica esses compostos em dois grupos: flavonoides e não flavonoides (DURAZZO et al., 2019) (Figura 1). O grupo dos flavonoides são subclassificados em antocianinas, flavanóis, flavanonas, flavonóis, flavononas e isoflavonas. Esse grupo é caracterizado por possuírem um núcleo fenilbenzopirano e em sua maioria apresenta três ou mais grupos hidroxila ligados a estrutura principal, podendo ocorrer na forma de agliconas ou conjugados com açúcares. Por sua vez, o grupo dos não flavonoides são subclassificados em ácidos fenólicos, xantonas, estilbenos, lignanas e taninos. Esse grupo apresenta uma variedade maior em relação a estrutura química, possuindo desde estruturas simples com um anel aromático como no caso do ácido gálico (ácido fenólico) até polímeros (DURAZZO et al., 2019).

Figura 1- Classificação dos compostos fenólicos



Fonte: autor

No Nordeste uma das espécies vegetais, extensivamente utilizada pela medicina tradicional, e que tem se mostrado como uma fonte rica de compostos fenólicos com base em estudos anteriores do nosso laboratório e de outros pesquisadores (PORT´S et al., 2013; MACÊDO et al., 2020) é o jucá, *Libidibia ferrea*.

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

#### 1.3.1 Aspectos agrônômicos e etnofarmacológicos

*Libidibia ferrea* var. *glabrescens* (Benth.) L.P. Queiroz (Figura 2), é conhecido popularmente como jucá, pau ferro e jucaína. Essa árvore possui madeira resistente, com tronco liso e branco com manchas. Pode atingir de 10-15 metros, seus frutos são vagens achatadas de casca dura marrom-escura, suas folhas são bipinadas, com inflorescência paniculada e legume indeiscente. A espécie ocorre naturalmente no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (LORENZI, 2002; LEWIS 2012). Pode ser encontrada em quase todo o Ceará, sendo mais frequente na Serra do Araripe, Serra do Apodi, parte leste, oeste e sul do estado (MAIA, 2004).

Figura 2 - *Libidibia ferrea* (1- Árvore, 2- casca, 3- folhas, 4- vagens)



Fonte: autor.

As vagens estão presentes na árvore nos meses de agosto e setembro, diferentemente das folhas, perenes, e, portanto, estão presentes durante todo ano.

As partes constituintes de *L. ferrea* (cascas, folhas e frutos) são utilizadas na medicina popular na forma de infusões, decocções e xaropes para o tratamento de diabetes, cicatrizante, anti-inflamatório, homeostático e gastrite (MACÊDO et al., 2020).

### 1.3.2 Aspectos químicos das folhas

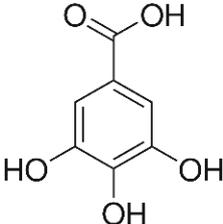
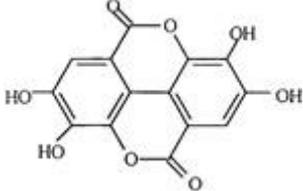
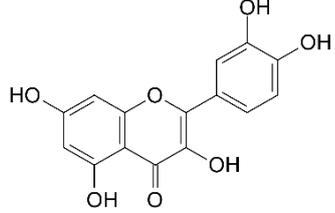
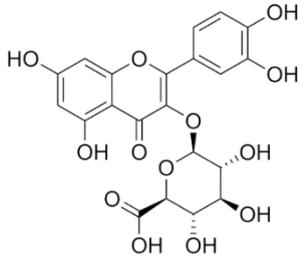
*Libidibia ferrea* apresenta rica produção de compostos secundários, com destaque para os polifenóis. As folhas de jucá destacam-se pela rica produção desses compostos. As subclasses identificadas incluem representantes das subfamílias dos flavonoides, dos ácidos fenólicos e taninos. Nosso grupo de pesquisa identificou dois flavonoides glicosilados (quercetina-3-O- glicosídeo e campferol-3-O-glicosídeo) e um ácido fenólico (ácido gálico) (CHAGAS-NETO, 2018), outros autores também identificaram esses constituintes em extratos da mesma espécie vegetal (PORT'S et al. 2013, HASSAN et al., 2015) (Tabela 1).

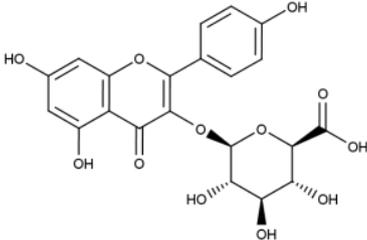
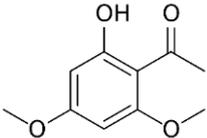
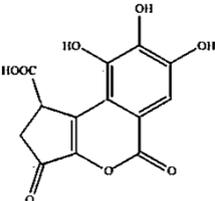
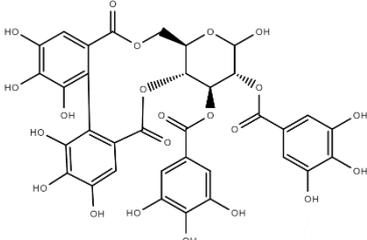
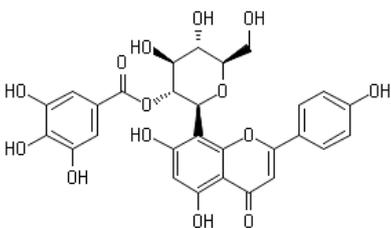
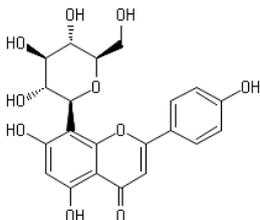
Nawwar et al., (2014, 2015) identificaram 12 polifenóis nas folhas de jucá através de dados de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e por técnica de espectrometria de massa de alta resolução. Entre os polifenóis identificados estavam compostos de baixo peso molecular como brevifolina, agliconas como ácido elágico e compostos ligados a açúcares como Isovitexina 2-O-β-[xilopyranosil-(1 → 2)-O-β-xilopiranosil. Compostos ligados a grupos galoil como 2"-O-galoilvitexina e 2"-O-galoilorientina também foram observados.

Além disso, outras partes da espécie também produzem compostos fenólicos como as cascas, por exemplo, nas quais foi identificado representantes dessa classe como cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos (GONZALEZ et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2011; ARAÚJO et al., 2014).

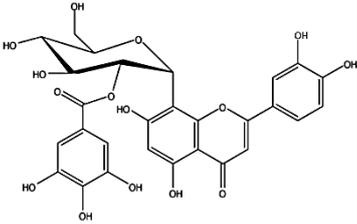
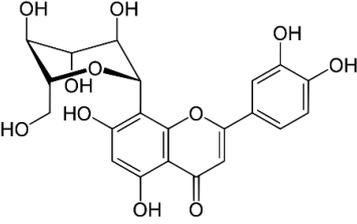
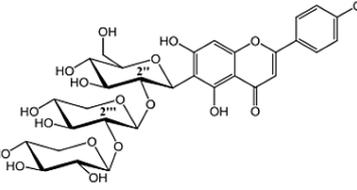
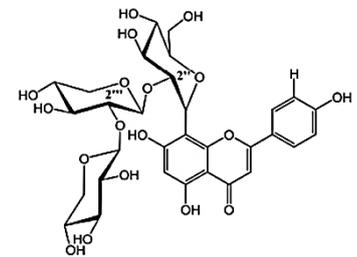
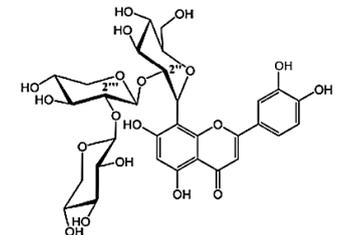
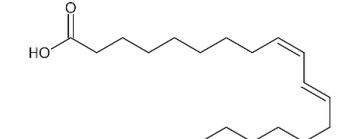
Os frutos de *L. ferrea* são ricos em ácidos graxos. Dias et al. (2013), através de extração dos frutos de jucá por fluido supercrítico usando CO<sub>2</sub> e caracterização por cromatografia gasosa identificaram ácidos graxos saturados e insaturados como ácido linoleico, ácido palmítico, ácido elágico, gama-sitosterol, ácido esteárico e lupenona.

Tabela 1- Constituintes químicos de *L. ferrea* com destaque para o composto químico, fórmula estrutural, parte da planta encontrada e referências.

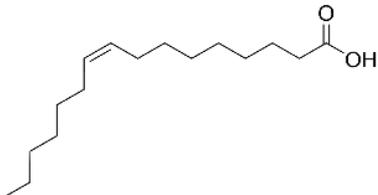
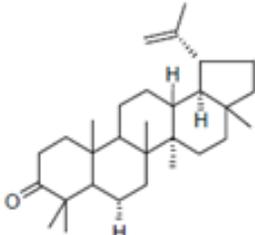
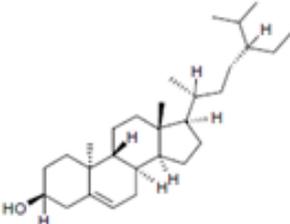
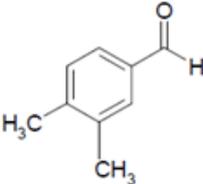
COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE	REFERÊNCIA
Ácido gálico		Fruto, Folhas e casca	NAKAMURA et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2011; PORT'S et al., 2013; SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2014; NAWWAR et al., 2015; CHAGAS-NETO, 2018; FALCÃO et al., 2019.
Continua			
Ácido elágico		Fruto, Folhas e casca	UEDA et al., 2002; 2004; DA COSTA et al., 2015; NAWWAR et al. 2015; FALCÃO et al., 2019.
Quercetina		Folhas	PORT'S et al., 2013.
Quercetina-3-O-glicosídeo		Folhas	CHAGAS-NETO, 2018
Continua			

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE	REFERÊNCIA
Campferol-3-O-glicosídeo		Folhas	CHAGAS-NETO, 2018
Brevifolina		Folhas	NAWWAR et al. 2015
Brevifolina ácido carboxílico		Folhas	NAWWAR et al. 2015
Tellimagrandina-I		Folhas	NAWWAR et al. 2015
2''-O-galloylvitexina		Folhas	NAWWAR et al. 2015
Vitexina		Folhas	NAWWAR et al. 2015

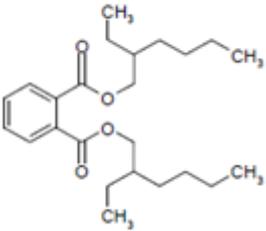
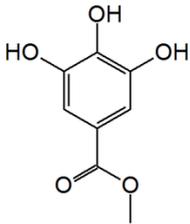
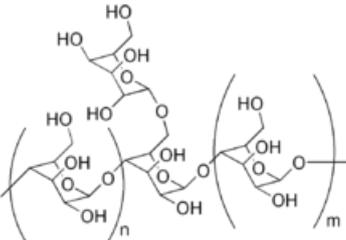
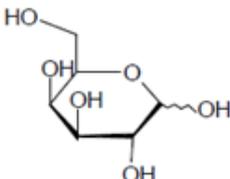
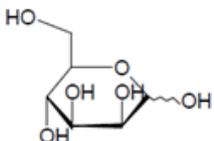
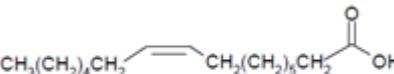
Continua

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE	REFERÊNCIA
2''-O-galloylorientina		Folhas	Nawwar et al. 2015
Orientina		Folhas	NAWWAR et al. 2015.
Isovitexina 2-O-β-[xilopyranosil-(1→2)-O-β-xilopyranosil		Folhas	NAWWAR et al. 2014
Vitexina 2-O-β-[xilopyranosil-(1→2)-O-β-xilopyranosil		Folhas	NAWWAR et al. 2014
Orientina 2-O-β-[xilopyranosyl-(1→2)-O-β-xilopyranosil		Folhas	NAWWAR et al. 2014
Ácido Linoléico		Fruto; Semente	DIAS et al., 2013; SAWADA et al., 2014

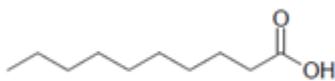
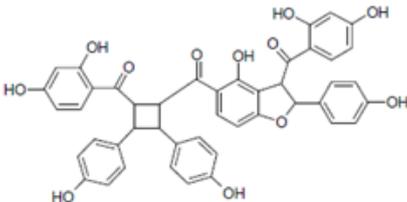
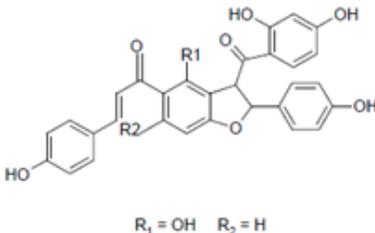
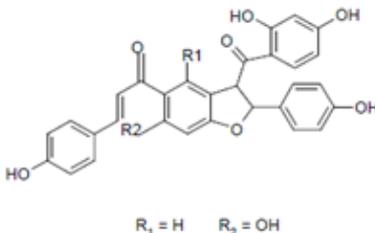
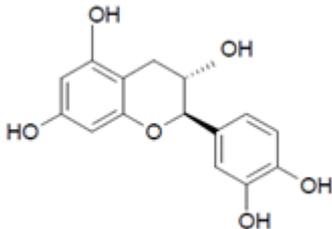
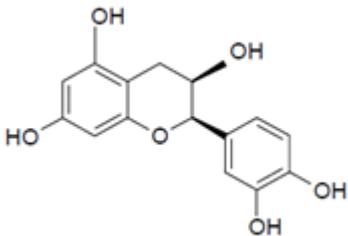
Continua

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE	REFERÊNCIA
Ácido palmítico		Fruto; Semente	DIAS et al., 2013; SAWADA et al., 2014
Ácido esteárico		Fruto; Semente	DIAS et al., 2013; SAWADA et al., 2014
Ácido elaídico		Fruto	DIAS et al., 2013
Lupenona		Fruto	DIAS et al., 2013
Gama-sitosterol		Fruto	DIAS et al., 2013
3,4-dimetil-benzaldeído		Fruto	DIAS et al., 2013

Continua

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE	REFERÊNCIA
di-2- etilhexilfitalat o		Fruto	DIAS et al., 2013
Metil galato		Fruto	NAKAMURA et al., 2002; SILVA et al., 2013.
Galactomana na		Fruto	SOUZA et al., 2010.
D-galactose		Semente	LOPES et al., 2013
D-manose		Semente	LOPES et al., 2013
Ácido linolenico		Semente	SAWADA et al., 2014.
Ácido palmitolênico		Semente	SAWADA et al., 2014.

Continua

COMPOSTO	ESTRUTURA	PARTE	REFERÊNCIA
Ácido cáprico		Semente	SAWADA et al., 2014.
Paufferol A		Casca e Entrecasca	NOZAKI et al., 2007
Paufferol B	 R <sub>1</sub> = OH R <sub>2</sub> = H	Casca e Entrecasca	OHIRA et al., 2013.
Paufferol C	 R <sub>1</sub> = H R <sub>2</sub> = OH	Casca e Entrecasca	OHIRA et al., 2013.
Catequina		Casca e Entrecasca	VASCONCELOS ET AL., 2011; ARAÚJO et al., 2014.
Epicatequina		Casca e Entrecasca	VASCONCELOS et al., 2011.

Em relação aos micronutrientes, as folhas de jucá apresentam altas concentrações de minerais como ferro, manganês e zinco em relação aos valores de ingestão diária recomendada (CHAGAS-NETO, 2018). Além disso, esses nutrientes mostraram ser biodisponíveis e apresentaram concentrações superiores aos de outras plantas medicinais como *Cymbopogon citratus*, *Melissa officinalis*, *Alpinia zerumbet* e *Malvaviscus arboreus*, por exemplo (SILVA et al., 2010).

### **1.3.3 Atividade biológica**

As pesquisas relacionadas aos potenciais terapêuticos do jucá são baseadas no conhecimento tradicional do uso de partes da árvore e mostram uma variedade de propriedades de partes dessa espécie (Tabela 2). As cascas do caule possuem propriedades hipoglicemiantes que atuam regulando a captação de glicose no fígado e músculos por meio da ativação da proteína quinase B (VASCONCELOS et al., 2011). Foi relatada ainda que as cascas possuem propriedades anti-ulcerativas de lesões induzidas por ácido acético em ratos que mimetizam as lesões gástricas humanas e esta propriedade está associada a redução do volume da secreção gástrica e as propriedades cicatrizantes dos taninos presentes na planta (BACCHI et al., 1994).

Os frutos de jucá possuem atividade antibiofilme contra *Streptococcus* sp., *Candida albicans*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus epidermidis* (SAMPAIO et al., 2009; TRENTIN et al., 2011). Modelos *in vivo* de indução de edema de pata e teste de placa quente utilizando ratos wistar mostraram atividade anti-inflamatória e analgésicas dos frutos (CARVALHO et al., 1996).

As folhas de *L. ferrea* destacam-se pelo potencial antioxidante. No estudo desenvolvido pelo nosso grupo utilizou-se um extrato seco padronizado das folhas de jucá e verificou-se que esse extrato foi sequestrador do radical DPPH, um radical livre produzido quimicamente. O potencial antioxidante dessa espécie também foi verificado por outros autores (PORT'S et al. 2013; HASSAN et al., 2015). Experimentos *in vivo* utilizando modelo de indução de diabetes por estreptozotocina em ratos mostraram que o extrato das folhas de *L. ferrea* reduziu significativamente a glicose sérica e elevou os níveis de insulina na circulação. Além disso, o tratamento resultou em um aumento acentuado da glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e redução da glutathione, e diminuição dos níveis de peroxidação

lipídica no fígado e pâncreas de ratos diabéticos, confirmando as propriedades antioxidante das folhas de jucá (HASSAN et al., 2015).

O extrato das folhas de jucá mostrou ainda propriedades hipolipidêmicas. Nawwar et al. (2015) utilizando grupos de ratos alimentados com dieta rica em gordura avaliou a ação do extrato das folhas de jucá no perfil lipídico. Os autores observaram que o extrato das folhas reduziu significativamente as taxas de colesterol total, triglicerídeos, LDL e lipídeos totais e elevou a taxa de HDL comparado ao grupo controle. A pesquisa sugeriu que um dos mecanismos associados ao potencial hipolipidêmico do extrato é através da inibição da HMG CoA-redutase, enzima envolvida na biossíntese de colesterol.

Tabela 2- Caracterização química e propriedades biológicas de *Libidibia ferrea* com destaque para parte da planta, modelo experimental utilizado e referências.

Parte da planta	Fitoquímica	Efeitos biológicos	Modelo experimental	Referência
<b>Folhas</b>	Ácido gálico, quercetina, brevifolina, Ácido elágico, Isovitexina, galloylvitexina e 2"-O-galloylorientina, quercetina-3-O-glicosídeo e campferol-3-O-glicosídeo	Antioxidante, hipogliceminante, hipolipidêmico.	Radical DPPH, Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico; Diabetes induzida por estreptozotocina em ratos wistar; modelo de alimentação com dieta rica em gordura utilizando ratos wistar.	PORT'S et al. 2013; NAWWAR ET AL. (2015); HASSAN et al., (2015), CHAGAS-NETO (2018).
<b>Casca</b>	-	Hipoglicemiante, anti-ulcerativo, cicatrizante.	Diabetes induzida por estreptozotocina em ratos wistar e lesão aguda do estômago em ratos wistar.	BACCHI et al., (1994); VASCONCEL OS et al., (2011).
<b>Fruto</b>	-	Atividade anti-inflamatória e analgésica.	Edema de pata e teste de placa quente.	CARVALHO et al., (1996).

Em vista da riqueza em compostos fenólicos associados as propriedades terapêuticas descritas na espécie, pode-se avaliar o uso de *L. ferrea* como um bioativo para o tratamento complementar de doenças associadas a inflamação e o estresse oxidativo,

#### **1.4 Processo inflamatório e estresse oxidativo**

O ritmo de vida cada vez mais acelerado da população traz consigo a falta de tempo para o cuidado com a saúde. Com o passar do tempo a preferência por uma alimentação mais rápida, porém, muitas vezes, com menor valor nutricional e a falta de atividade e exercícios físicos podem favorecer o desenvolvimento de um estado metabólico inflamatório e propiciar a gênese de doenças como o acidente vascular cerebral (AVC), diabetes *mellitus*, câncer e doenças neurodegenerativas, as quais representam mais de 50% das causas de mortes no mundo (GBD, 2018).

A inflamação, apesar de ser uma das causas associadas a patogenia de doenças como as doenças neuroinflamatórias é uma resposta fisiológica normal do sistema imunológico desencadeada por fatores como patógenos, lesões celulares e substâncias tóxicas e tem como objetivo a defesa contra um invasor (ZHAO et al., 2021).

A inflamação é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou pelos padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs). Após esse reconhecimento, haverá a ativação de vias de sinalização intracelular, como a via da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), fator nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) e Janus quinase (JAK) transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT). Essas vias promovem a síntese de elementos como citocinas e quimiocinas que favorecem o recrutamento de células de defesa como os neutrófilos (CHEN et al., 2017).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio inflamatório. A transposição dessas células para o tecido inflamado é estimulada por alterações microvasculares, como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. No sítio inflamatório os neutrófilos fagocitam os patógenos, os quais são neutralizados por substâncias oxidantes geradas a partir da conversão do peróxido de hidrogênio e íons de halogênios em ácidos inorgânicos como o ácido hipocloroso.

Essa reação é catalisada pela enzima mieloperoxidase (MPO) (ROSALES et al., 2016; MORTAZ et al., 2018).

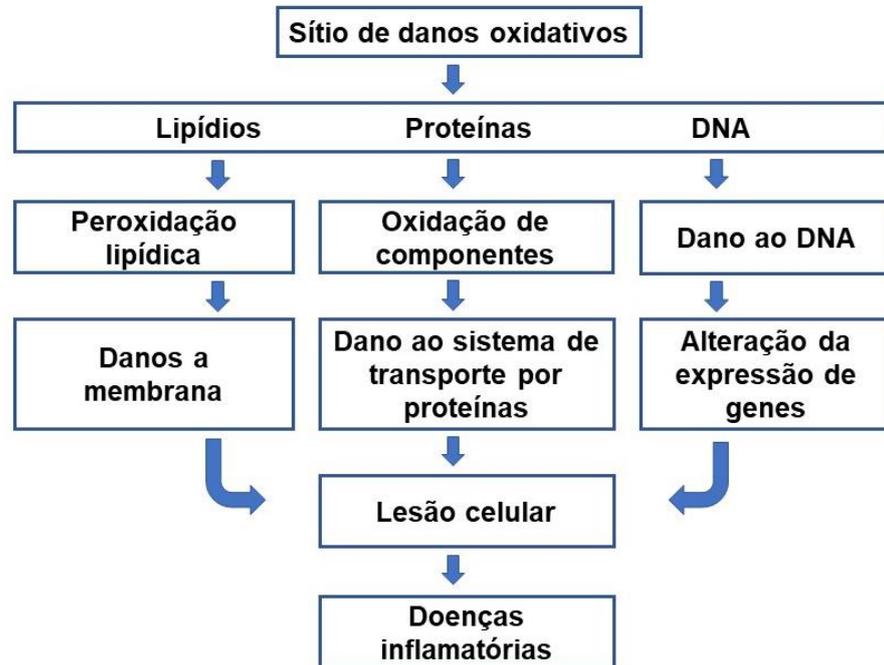
Da mesma forma, no sistema nervoso central a resposta inflamatória é desencadeada por estímulos tóxicos, a presença de padrões moleculares associados a patógenos e isquemia, os quais causam a ativação de células da glia como micróglia, primeira linha de defesa do sistema nervoso central. As micróglia estão presentes tanto na inflamação aguda como na crônica e ao serem ativadas liberam mediadores inflamatórios como as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e espécies reativas de oxigênio (KÖLLIKER-FRERS et al., 2021).

Como mencionado, a inflamação aguda acontece fisiologicamente e atua com o objetivo de defender o organismo contra a invasão de um patógeno, no entanto quando esse invasor não é eliminado, um novo estágio de proteção será iniciado. A inflamação crônica é caracterizada pela resposta inflamatória persistente e é uma das causas associadas a patogênese de doenças como o AVC e doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (BISWASS, 2016, ZHAO et al., 2021).

O desenvolvimento dessas doenças é também promovido por agentes oxidantes, espécies químicas (átomos, moléculas ou íons) que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada de valência e caracterizam-se pela instabilidade e alta reatividade química (DI MEO; VENDITTI, 2020).

Assim como na inflamação, a participação dos oxidantes é indispensável para diversas funções fisiológicas, como respiração celular, eliminação de patógenos, sinalização de processos metabólicos e controle do tônus muscular (POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Porém, quando produzidos em excesso, os oxidantes podem gerar um desequilíbrio redox e assim ocasionar um estado de estresse oxidativo (PISOSCHI; POP, 2015), o qual, quando não controlado, pode provocar danos em componentes celulares vitais como lipídios, proteínas e DNA (Figura 3) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; KOHEN; NYSKA, 2002).

Figura 3 - Consequências do estresse oxidativo para estruturas celulares



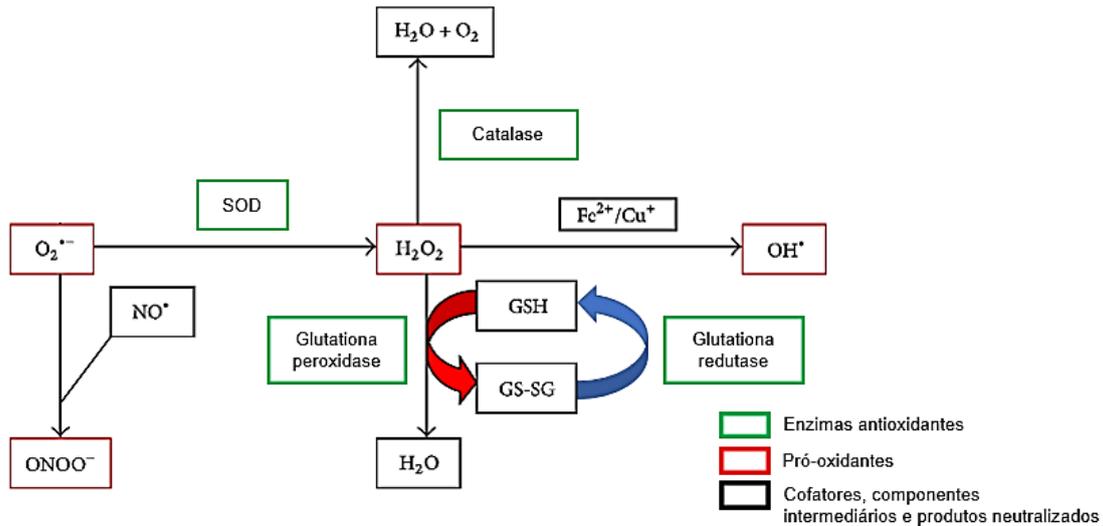
Fonte: autor.

O estresse oxidativo pode induzir a lipoperoxidação, o que pode gerar danos irreversíveis em estruturas vitais como em membranas celulares e em lipoproteínas. Esses danos irão ocasionar a síntese de malondialdeído (MDA) e composto dieno conjugado, ambos citotóxicos e mutagênicos. As proteínas também podem ser danificadas, sofrendo modificações estruturais que podem comprometer sua atividade enzimática. Além dessas estruturas, o DNA também pode sofrer algum tipo de comprometimento de sua estrutura pelo estresse oxidativo. Lesões estruturais originadas por ação do excesso de oxidantes poderão causar falhas estruturais irreversíveis, como a formação de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), responsável por mutagênese (PIZZINO et al., 2017).

A regulação do excesso de espécies oxidantes é realizada por constituintes antioxidantes, representados por enzimas antioxidantes endógenas (Figura 4) e por fontes exógenas consumidos na dieta. As três principais classes de enzimas antioxidantes endógenas são: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). A CAT, primeira enzima antioxidante caracterizada (RAMZAN et al., 2021), está presente no peroxissomo das células aeróbicas e atua catalisando a conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio. A GPx catalisa a oxidação da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG), nessa reação ocorre a

conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , posteriormente, outra enzima, glutatona redutase, catalisa a reação inversa de conversão da glutatona oxidada em glutatona reduzida, iniciando mais uma vez o ciclo. O papel da SOD é catalisar a dismutação do ânion superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com posterior neutralização pela catalase ou glutatona peroxidase (KURUTAS, 2015; ADWAS et al., 2019).

Figura 4 - Mecanismo enzimático de controle antioxidante.



Fonte: adaptado de Biswas, 2016.

As fontes exógenas de antioxidantes estão presentes principalmente na alimentação. Entre os principais componentes bioativos destacam-se as vitaminas (C, E), os carotenoides e os polifenóis (NAYAK et al., 2021).

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A incidência de doenças crônicas vem aumentando nos últimos anos, e dentro desse cenário é essencial perceber e investir no desenvolvimento de alimentos que possam auxiliar na prevenção e no resgate da saúde. Nesse sentido, percebe-se o aumento no consumo de alimentos com propriedades funcionais que visam a prevenção contra doenças. Os alimentos funcionais a base de plantas vêm sendo muito procurados e se tornaram um nicho de mercado com alta perspectiva de crescimento com movimentação de bilhões de dólares a cada ano.

Destaca-se assim, a pesquisa por novas fontes alimentares a partir de fontes vegetais com potencial em se tornar um novo alimento ou ingrediente funcional. *Camellia sinensis*, por exemplo, é uma espécie consumida em todo mundo que possui reconhecidas atividade antioxidante e neuroprotetora. Essas propriedades são provenientes da riqueza dessa espécie em compostos fenólicos como epicatequina e epigallocatequina galato.

O Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos – CEFAC tem se dedicado a pesquisa de espécies vegetais nordestinas, elucidando quimicamente a sua composição e avaliando propriedades de interesse para o desenvolvimento de opções terapêuticas. Entre as espécies estudadas pelo CEFAC está *Libidibia ferrea*.

*Libidibia ferrea* var. *glabrescens* (Benth.) L.P. Queiroz, conhecida popularmente como jucá, é uma árvore comum na região nordeste do Brasil. *L. ferrea* é utilizada popularmente como anti-inflamatório e no tratamento de diabetes *mellitus*. Diferente das vagens que aparecem durante os meses de agosto e setembro, as folhas dessa árvore estão presente durante todo o ano. Entre os constituintes químicos identificados nas folhas estão os compostos fenólicos como ácidos fenólico e flavonoides.

Em pesquisa realizada no nosso laboratório foi desenvolvido um extrato seco padronizado com as folhas de *L. ferrea*, o qual demonstrou potencial antioxidante e anti-inflamatório. Sendo assim, estamos dando seguimento ao estudo com o extrato seco desenvolvido visando sua utilização como uma opção de ingrediente funcional com propriedades de interesse para a prevenção de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo e a inflamação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a segurança e o potencial antioxidante e anti-inflamatório de um extrato seco padronizado de folhas de *Libidibia ferrea* para uso como um produto bioativo.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar o extrato seco de *Libidibia ferrea* (ESLF) quanto a característica física do pó e química por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massa (UPLC-MS);
- Investigar a toxicidade, dose única e doses repetidas, do ESLF em camundongos;
- Investigar o efeito antioxidante do ESLF empregando como alvos radicais livres e enzimas de interesse no desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a glutatona reduzida e superóxido dismutase;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do ESLF no modelo de edema de pata induzida por carragenina em camundongos, incluindo análises de marcadores como citocinas, mieloperoxidase (MPO) e produtos do estresse oxidativo;
- Investigar a ação do ESLF e do metil galato sobre a liberação MPO e produção de EROs induzida por forbol miristato acetato (PMA) em neutrófilos humano;
- Investigar as atividades anti-inflamatória e antioxidante, e possível mecanismo de ação do ESLF e constituinte bioativo majoritário (metil galato) em células do sistema imune inato periférico e central, neutrófilo e micróglia;
- Investigar o efeito do ESLF e do metil-galato sobre a produção de nitrito e citocinas, bem como sobre a expressão iNOS por *western blotting*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o parecer nº 4951300919. A pesquisa foi também submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP), da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer nº 4.143.370. CAAE 33230620.3.0000.5054

### **4.2 Material de estudo**

#### **4.2.1 Extrato seco de *Libidibia ferrea***

##### **4.2.1.1 Coleta**

As folhas de Jucá (*Libidibia ferrea* var. *glabrescens* (Benth.) L.P. Queiroz, foram coletadas no horto de plantas medicinais, localizado no Campus do Pici – UFC, município de Fortaleza-Ceará. A exsicata da espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará com o número 61761 e possui o código de registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SinGen) - A0C462C.

##### **4.2.1.2 Preparo do extrato**

As folhas de *L. ferrea* foram lavadas, secas em estufa com circulação de ar a 38° C por 24 horas, trituradas em moinho de facas e em seguida determinada a granulometria por tamisação. Para a preparação do extrato foi empregado o pó moderadamente grosso.

O extrato hidrometanólico das folhas de jucá foi produzido segundo método desenvolvido anteriormente no nosso laboratório (CHAGAS NETO, 2018). O extrato foi obtido utilizando 30% de droga vegetal em metanol 50% em água v/v, e como técnica de extração utilizou-se a turbólise (10 minutos) precedida por 24h de maceração. O extrato líquido obtido foi concentrado a temperatura ambiente em

estufa, e após eliminação do metanol, o extrato foi liofilizado. O extrato seco produzido teve rendimento médio de  $13,0 \pm 1,0$  %.

#### **4.2.2 Outros Materiais**

Extrato seco comercial de *Camellia sinensis* (chá-verde). Foi empregado para fins de comparação com o ESLF (material de estudo). O extrato de chá-verde foi selecionado como material de referência por tratar-se de um dos insumos farmacêuticos e alimentício mais explorado/comercializado tanto pela indústria de alimentos quanto farmacêutica em função de suas propriedades biológicas, incluindo atividades anti-inflamatória, antioxidante, que estão associadas à presença de fenóis na planta (ZHAO et al., 2014; BITU-PINTO et al., 2015; MARTINS et al., 2017). O material foi gentilmente cedido pela indústria Givaudan LTDA.

#### **4.3 Material biológico**

Na presente pesquisa foram utilizadas células microgлияis BV2 e neutrófilos humanos. As micrógлияs foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, Brasil.

O sangue rico em leucócitos humanos de adultos saudáveis foi coletado no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas – UFC após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará. Neutrófilos com viabilidade de  $90 \pm 2,0$ % estabelecida pela exclusão com *Trypan Blue*, foram isolados de acordo com Lucisano e Mantovani (1984) e posteriormente modificados por Kabeya et al. (2002)

#### **4.4 Animais**

Os experimentos *in vivo* foram realizados utilizando Camundongos *Swiss* fêmeas e machos (25 - 32g), entre 6 e 8 semanas de idade, obtidos através do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em estantes biológicas sob refrigeração a uma temperatura de  $22 \pm 2$ °C, em ciclo de 12/12 horas de claro e escuro, e com água e comida *ad libitum*. Seguindo as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

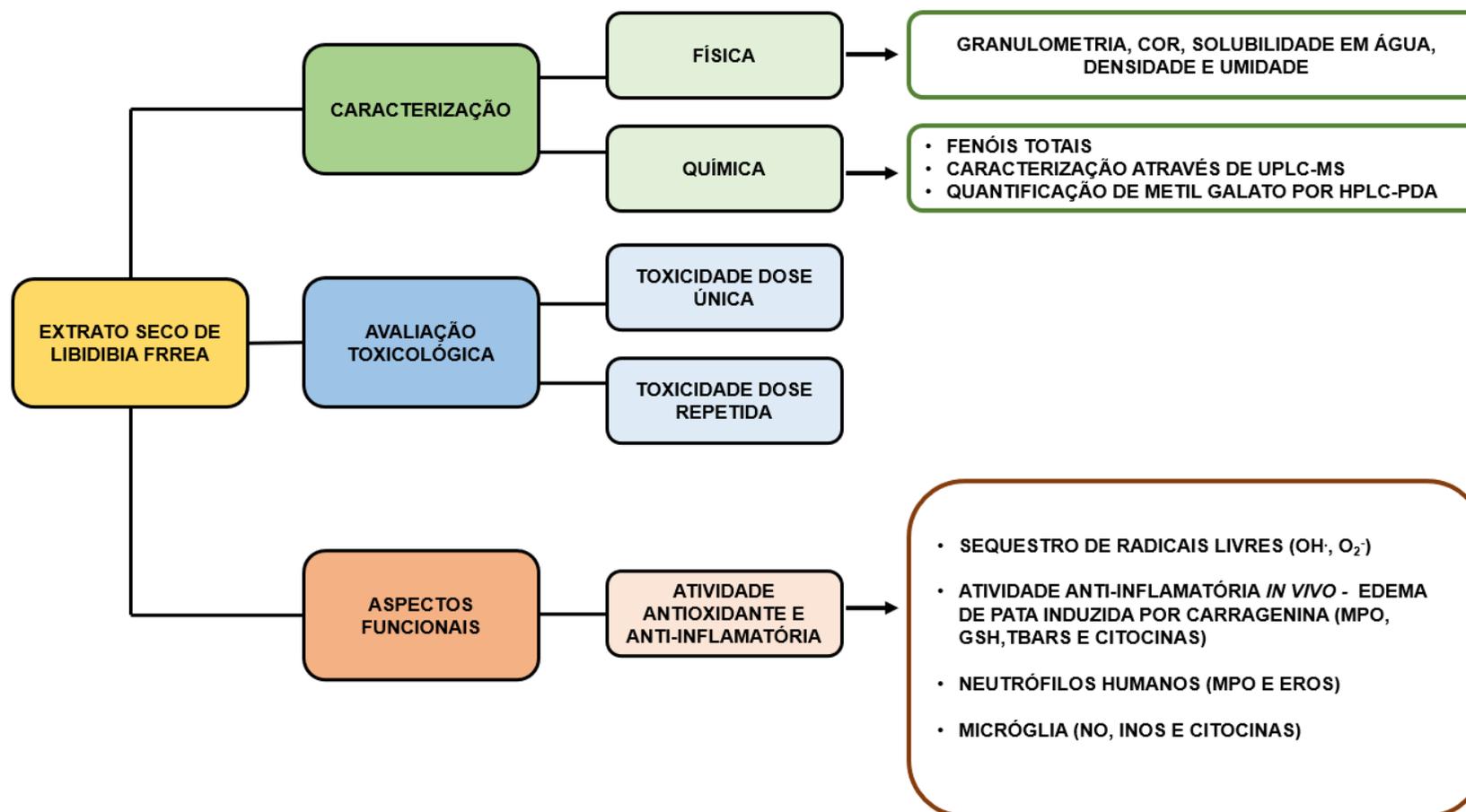
#### 4.5 Equipamentos

Balança acoplada a sistema de secagem por irradiação infravermelha (Marte Brasil); balança analítica com precisão de 0,1 mg (Shimadzu – AUW220D); cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Waters) acoplado a espectrômetro de massa (Waters); espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível (Thermo Scientific Genesys 10S); estufa com renovação e circulação de ar (Tecnal); estufa de secagem (Olidex, Linea); sistema espectrofotométrico de microplacas (Synergy HT, Biosystems); moinho de facas (MA 048, Marconi, Brasil); pHmetro (HI 221, Hanna instruments, EUA); purificador de água milli-Q (Millipore, EUA); sistema de filtração a vácuo (Millipore, EUA); sonicador (Unique, Brasil); tamisador (Granulotest, Brasil). liofilizador (Eyela FDU-1200, Japão) hidrolestímetro (Insight, Brasil) ultraturrax (IKA, China).

## 4.6 Estratégia experimental

A pesquisa se baseia na avaliação do extrato seco de *L. ferrea* seguindo o organograma apresentado na figura 5.

Figura 5 - Organograma com o panorama geral das etapas de avaliação do extrato seco de *Libidibia ferrea*.



## **4.7 Caracterização do extrato seco de *L. ferrea***

### **4.7.1 Caracterização física do extrato seco de *L. ferrea***

A caracterização física do pó foi realizada através das análises de granulometria do material, cor, caráter hidrocópico, solubilidade em água, densidade aparente, densidade após compactação e umidade do pó.

A análise granulométrica foi realizada segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). A granulometria foi determinada com o auxílio de cinco tamises com aberturas 500, 425, 355, 300, 250  $\mu\text{m}$  previamente pesados. O ESLF foi colocado nos tamises com maior abertura de malha e através de vibração mecânica automatizada por 15 minutos, o material foi separado por tamanho de partícula. Os tamises foram pesados com o pó que ficou retido e posteriormente foi calculado o percentual de pó em cada tamis.

A cor do material foi comparada com padrões de coloração segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). O material foi verificado quanto ao seu caráter higroscópico e solubilidade em água.

A umidade do ESLF foi determinada através do método de perda por dessecação de extratos descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). Três cadinhos secos foram pesados previamente e a eles foi adicionado 1g do ESLF. O material foi colocado em estufa a 105 °C durante 3h, o material foi colocado em dessecador com sílica anidra por 15 minutos e em seguida pesado. O percentual de umidade residual do sólido foi calculado a partir da diferença das massas antes e após a secagem do ESLF.

A densidade do ESLF foi calculada através do método descrito por Ansel, (2007). Um valor de massa conhecido do ESLF foi vertido cuidadosamente em uma proveta graduada. Anotou-se o volume ocupado pelo pó, volume aparente ( $V_a$ ). A seguir submeteu-se a amostra a cerca de 30 quedas e novamente anotou-se o volume, denominado volume de compactação ( $V_c$ ).

As densidades aparente e de compactação foram obtidas através das equações 1 e 2 a seguir:

Densidade aparente:

$$d_a = m/v_a$$

Onde:  $d_a$  = densidade aparente;  $m$  = massa da amostra e  $v_a$  = volume aparente.

Densidade após compactação:

$$d_c = m/v_c$$

Onde:  $d_c$  = densidade após compactação;  $m$  = massa da amostra e  $v_c$  = volume de compactação.

De posse dos resultados de densidade relativa e densidade de compactação, foi calculado o fator de Hausner (1967), o qual exprime a compactabilidade e compressibilidade de um pó. Esse fator foi calculado segundo a equação a seguir:

Fator de Hausner:

$$F. Hausner = d_c/d_a$$

Onde: F. Hausner = fator de Hausner;  $d_c$  = densidade após compactação e  $d_a$  = densidade aparente.

#### **4.7.2 Caracterização química do extrato seco de *L. ferrea***

##### **4.7.2.1 Determinação do teor de fenóis totais no extrato de *L. ferrea* por espectrofotometria**

A dosagem de fenóis totais foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, composto por dois ácidos, o fosfotúngstico e o fosfomolibdico, cujo tungstênio e molibdênio apresentam estado de oxidação 6+. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, a média do estado de oxidação desses íons encontra-se entre 5 e 6, formando os chamados tungstênio molibdênio de coloração azul, cuja intensidade é medida por espectrofotometria. Foram transferidos 100  $\mu$ L das soluções amostra de *L. ferrea* (diluição 1:25) e padrão ácido gálico para balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 250  $\mu$ l do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N e 4 mL de água ultrapura. Após alcalinizar o meio (3 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10%) o volume foi completado com água ultrapura. Decorrido 15 min, à temperatura ambiente, realizou-se a leitura espectrofotométrica (785 nm) no UV-VIS. Os compostos fenólicos totais foram expressos como miligramas equivalentes de

ácido gálico por grama (mg EAG/g) (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

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

**Construção da curva de calibração:** A curva de calibração de ácido gálico foi construída com o emprego de cinco concentrações de ácido gálico, com faixa de trabalho entre 2 e 6 µg/mL, preparadas por meio de diluições de alíquotas de uma solução estoque (400 µg/mL). Para cada ponto da curva foram utilizadas três réplicas.

#### **4.7.2.2 Análise cromatográfica do extrato seco de *L. ferrea* por UPLC-MS**

A análise qualitativa foi realizada em um sistema UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. A amostra do ESLF passou por um processo de Clean up utilizando a técnica de extração em fase sólida, na qual um cartucho com sílica de fase reversa C18 foi condicionada com metanol. A fração metanólica (90%) foi retirada e injetada no cromatógrafo.

A corrida cromatográfica foi realizada em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µ), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (9 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL.

Em relação ao detector, o modo ESI<sup>-</sup> foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI<sup>+</sup> foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS<sup>E</sup>. Os compostos foram tentativamente

caracterizados através de fórmula molecular fornecida pelo software MassLynx 4.1 a partir de suas massas precisas (erro <5 ppm), padrões isotópicos (i-fit) e padrão de fragmentação de MS, bem como uma pesquisa quimiotaxonômica. Além disso, os compostos foram atribuídos por comparação com os padrões de referência, quando disponíveis.

#### **4.7.2.3 Quantificação de metil galato no extrato seco de *L. ferrea***

ESLF (25mg) passou inicialmente por uma etapa de limpeza utilizando extração em fase sólida (SPE), na qual o cartucho foi condicionado com metanol e água e logo após a amostra do extrato foi eluída com 5 mL de água, 5 mL de metanol mais água (9:1) e 5 mL de metanol. A fração metanol mais água (9:1) foi rotaevaporada para retirada do metanol e liofilizada. Na etapa seguinte procedeu a quantificação de metil galato através de técnica de cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), na qual o metil galato foi quantificado segundo metodologia de Ferreira et al. (2016). Como fase estacionária foi usada uma coluna C18 (250 x 4,6 milímetros, 5  $\mu$ ), temperatura fixa de 24 °C, fases móveis água com 0,05% de ácido trifluoroacético (A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (B), corrida do tipo gradiente segundo a programação mostrada na tabela 3, tempo de corrida de 33 min, fluxo de 0,8 mL/min e volume de injeção de 20  $\mu$ l. A detecção através do detector DAD foi realizada em uma faixa de comprimento de onda de 290 a 400 nm.

Tabela 3- Programação do tempo de corrida e gradiente da fase móvel utilizados para caracterização do metil galato no extrato seco de *L. ferrea* via HPLC-DAD.

<b>Tempo (Min.)</b>	<b>Metanol (%)</b>	<b>Água (%)</b>
0-10	12,5 – 25	87,5 – 75
10-15	25 – 40	75 – 60
15-25	40 – 75	60 – 25
25-30	75 – 75	25 – 25
30-33	75 – 12,5	25 – 87,5

## **4.8 Avaliação toxicológica**

### **4.8.1 Avaliação da toxicidade do extrato seco de *L. ferrea* administrado em dose única em camundongos swiss**

A avaliação da toxicidade foi realizada conforme o protocolo 423 da OECD. Quatro grupos de três camundongos swiss fêmeas cada foram tratados com o veículo (água) e o extrato das folhas de jucá (300, 1000 e 2000 mg/kg), por via oral durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. São escassos os estudos que avaliam a toxicidade das folhas de *L. ferrea* por via oral utilizando camundongos, assim as doses foram escolhidas seguindo as recomendações da OECD e através de pesquisas anteriores que avaliaram a toxicidade de outras partes da espécie (BACCHI et al., 1995; FREITAS et al., 2012). Os animais foram observados durante todo o período de tratamento quanto à ocorrência de algum sinal tóxico, inclusive com registro do seu peso corporal semanalmente no decorrer do tratamento. Ao final, os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado e submetido a exames hematológicos (quantidade de hemácias, leucócitos e plaquetas) e bioquímicos (glicose, colesterol total, triglicerídeos, HDL, Ureia, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)). Os exames bioquímicos foram determinados através de kits comerciais baseados em métodos enzimáticos e colorimétricos, seguindo as orientações do fabricante.

### **4.8.2 Avaliação da toxicidade do extrato seco de *L. ferrea* administrado em dose repetida em camundongos swiss**

A avaliação da toxicidade foi realizada conforme o protocolo 407 da OECD. Quatro grupos com seis camundongos swiss (três fêmeas e três machos) foram tratados com o veículo (água) e o extrato das folhas de jucá (30, 100 e 300 mg/kg), diariamente por via oral durante 28 dias. Como comentado anteriormente, são escassos os estudos que avaliam a toxicidade das folhas de *L. ferrea*, por isso, a escolha das doses se baseou nas recomendações da OECD e em estudos anteriores que avaliaram a toxicidade de outras partes da espécie como vagens e cascas (BACCHI et al., 1995; FREITAS et al., 2012). Os animais foram observados durante todo o período de tratamento quanto à ocorrência de algum sinal tóxico,

inclusive com registro do seu peso corporal semanalmente no decorrer do tratamento.

Ao final, os animais foram eutanasiados e realizou-se a retirada do coração, rins, fígado e estômago. Após a coleta, os órgãos foram separados em potes contendo uma solução de formol a 10 % neutro tamponado. Os órgãos foram submetidos ao processador automático de tecidos para serem incluídos posteriormente na parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 4µm. Assim, os cortes obtidos foram colocados em lâminas. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.). As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas sob foco fixo e clareza de campo com aumento final de 100 a 400x.

O sangue dos animais, também coletado, foi submetido a exames hematológicos (quantidade de hemácias, leucócitos e plaquetas) e bioquímicos (glicose, colesterol total, triglicerídeos, HDL e Ureia). Os exames bioquímicos foram determinados através de kits comerciais baseados em métodos enzimáticos e colorimétricos, seguindo as orientações do fabricante.

## **4.9 Aspectos funcionais**

### **4.9.1 Avaliação da atividade sequestradora de radicais hidroxil**

A atividade de sequestro foi medida de acordo com o método descrito por Zhao et al. (2006) modificado. Inicialmente, 20 µL do extrato de *L. ferrea* (25, 50, 100 µg/mL) foram adicionados a 20 µL de EDTA 1 mM, 20 µL de FeCl<sub>3</sub> 1 mM, 20 µL de desoxirribose 36 mM, 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM e 20 µL de ascorbato 1 mM em placa de 96 poços. Após 1 hora, 200 µL de ácido tricloroacético (10%) e 200 µL de ácido tiobarbitúrico (1% em NaOH 50 mM) foram adicionados e incubados a 85 °C por 15 minutos. A absorvância foi medida a 532 nm em leitora de microplacas. As amostras foram analisadas em triplicata.

### **4.9.2 Avaliação da atividade sequestradora de radicais superóxido**

A produção de ânion superóxido foi determinada pela medição da redução enzimática do nitroblue tetrazólio (NBT) a formazan (DE GAULEJAC et al.,

1999). O extrato de *L. ferrea* (50 µg/mL e 100 µg/mL) foi incubado com hipoxantina e xantina oxidase (5 mM e 1,67 µg/mL, respectivamente) por 30 minutos e a absorbância foi medida a 650 nm. O ácido gálico (100 µg/mL) foi usado como um composto antioxidante padrão. A quantidade de ânion superóxido residual foi calculada pela Equação:

$$\% \text{ Ânion superóxido residual} = (P2 - P0) / (P1 - P0)$$

P0 = absorvância do branco; P1 = absorvância do controle positivo para produção de superóxido; P2 = absorvância na presença do extrato de *L. ferrea* ou ácido gálico.

#### **4.9.3 Mensuração do edema de pata de camundongos induzido por carragenina**

A atividade anti-inflamatória do extrato das folhas de jucá foi verificada através do teste do edema de pata utilizando camundongos swiss. Os animais foram divididos em cinco grupos (10 animais/grupo). Dois grupos de animais foram tratado com água (grupo controle e grupo estimulado), dois grupos foram tratados com o ESLF (200 e 400 mg/kg), um grupo foi tratado com o padrão indometacina (10 mg/kg como controle positivo). O edema de pata foi induzido por carragenina intraplantar em quatro grupos e em um dos grupos de animais tratados com o veículo foi injetado salina. O volume basal das patas traseiras foi determinado antes da administração de qualquer droga. As doses do extrato foram administradas uma hora antes da injeção intraplantar de carragenina a 1% na pata traseira direita. O volume da pata foi registrado em 1, 2, 3, 4 h com um hidropletismômetro elétrico (SARKHEL, 2016).

#### **4.9.4 Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo das patas de camundongos induzido por carragenina**

A avaliação da atividade da MPO foi baseada na técnica previamente descrita por Bradley et al. (1982). Amostras de tecido subcutâneo das patas foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em um homogeneizador com solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e o material foi centrifugado a 1500x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi submetido ao choque térmico em 3

estágios de congelamento (- 20 °C) e descongelamento durante 10 minutos cada. O sobrenadante foi novamente centrifugado (1500 x g, 15 minutos, 4 °C). Em seguida, as amostras foram plaqueadas em placas de 96 poços e adicionada a solução de leitura (tampão fosfato 0,017%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina (18,4 mM). Após 3 minutos, a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4M). A leitura da absorbância foi obtida a 450nm em leitor de microplacas e o resultado foi expresso em atividade da mieloperoxidase.

#### **4.9.5 Quantificação do teor de TNF- $\alpha$ no tecido subcutâneo das patas de camundongos estimulados por carragenina**

Para a realização da quantificação da produção de citocinas foi utilizado o tecido subcutâneo das patas dos camundongos coletadas após o protocolo de medida da mensuração do edema de pata induzido por carragenina. As amostras foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em um homogeneizador com solução de tampão fosfato-salino (PBS) + inibidor de protease 1% e o material foi centrifugado a 1500x g por 15 minutos a 4 °C. Os níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante foram determinados usando kit de ELISA (BD Bioscience Pharmingen, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A absorvância foi medida a 450 nm.

#### **4.9.6 Mensuração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido subcutâneo das patas dos camundongos estimulados por carragenina**

A inibição da peroxidação lipídica pelo ESLF foi determinada pela quantificação da formação do malondialdeído (MDA) (DRAPER; HADLEY, 1990). O tecido subcutâneo das patas de camundongos que receberam as doses 200mg/Kg do ESLF, metil galato 7 mg/Kg (dose correspondente a quantidade de metil galato presente no ESLF na concentração de 200mg/Kg), extrato de *C. sinensis* (100mg/Kg) e indometacina (5mg/Kg) foi homogeneizado em solução de KCl 1,15%. O homogenato (10%) foi centrifugado por 10 min (5000 rpm, 4 °C). Adicionou-se 750  $\mu$ L de ácido fosfórico 1%, 250  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 0,6% e 125  $\mu$ L do homogenato em eppendorfs. A mistura foi aquecida em banho maria (100 °C) por 45 min. Após resfriar por 20 minutos, foram adicionados 333  $\mu$ L de N-butanol, agitou-se por 40s e centrifugou-se por 10 min (2000 rpm, 4 °C). O sobrenadante (200  $\mu$ L) foi adicionado em placa de 96 poços e por fim foi realizada a leitura a 535 nm.

#### **4.9.7 Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no tecido subcutâneo das patas dos camundongos estimulados por carragenina**

A superóxido dismutase é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Avaliamos a atividade da SOD através da metodologia descrita por Beauchamp e Fridovich, (1971). Esse método se baseia na redução fotoquímica da riboflavina com geração do ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual irá reagir com o azul de nitro-tetrazólio (NBT) gerando formazan, espécie de coloração púrpura. A avaliação da atividade de SOD é determinada pela sua capacidade de inibir a redução de NBT a formazan pelo ânion superóxido.

As amostras de tecido subcutâneo das patas de camundongos que receberam as doses 200mg/Kg do ESLF, metil galato 7 mg/Kg (dose correspondente a quantidade de metil galato presente no ESLF na concentração de 200mg/Kg), extrato de *C. sinensis* (100mg/Kg) e indometacina (5mg/Kg) foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em homogeneizador com solução de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) e centrifugadas (12000 x g, 20 min, 4° C). Do sobrenadante obtido, 50 µL foram adicionados a 1 mL do meio de reação (tampão fosfato 50 mM, EDTA 0,1 mM, metionina 19,5 mM), 300 µL de riboflavina 5 µM e 150 µL de NBT 750 µM em uma câmara fria escura. O material foi exposto à luz fluorescente (15 W) por 15 min e após esta etapa as amostras foram plaqueadas para leitura da absorbância em leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades da enzima (U). Para o cálculo de unidades de SOD, considerou-se uma unidade como a quantidade necessária para inibir a redução do NBT em 50%.

#### **4.9.8 Determinação da concentração da glutatona reduzida (GSH) no tecido subcutâneo das patas dos camundongos estimulados por carragenina**

A concentração da glutatona reduzida foi obtida através do método descrito por Jollow et al. (1974). Ao homogenato do tecido (65,57µL) foi adicionado 52,45 µL de água destilada e 13,11 µL de TCA 50%. A mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante (65,57 µL) foi recolhido e adicionado a 131,14 µL de Tris HCl 0,4M + EDTA 0,05M, e 3,27 µL de ácido 2-nitrobenzóico

(DTNB) 0,01 M. GSH reage com DTNB e produz um complexo de cor amarela. A absorvância foi medida a 412 nm.

#### ***4.9.9 Avaliação da viabilidade celular do extrato seco de *L. ferrea* e do metil galato através da atividade metabólica de neutrófilos humanos (ensaio MTT)***

Neutrófilos ( $5,0 \times 10^6$  células/mL) foram incubados em quadruplicata por 30 minutos a 37 °C com ESLF (12,5 – 25 – 50 – 100 µg/mL), metil galato (4 – 8 – 16 – 32 – 64 µg/mL), controle (veículo do extrato (água) – DMSO 1%), Hanks (células não-tratadas) e Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico) em placa de 96 poços. Após o período de incubação a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT a placa de 96 poços, seguido de incubação por 3h a 37 °C. Passado o período de incubação realizou-se uma segunda centrifugação, nas mesmas condições da primeira, o sobrenadante foi descartado e a placa mantida em estufa a 37 °C por 48h. Por fim, foram adicionados 150 µL de DMSO para a solubilização do sal de formazan. A placa passou por agitação durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas e a absorvância foi então medida em leitor de microplacas a 570 nm (MOSMANN, 1983). O ensaio foi realizado em três dias diferentes, com células de três doadores diferentes.

#### ***4.9.10 Avaliação da viabilidade celular do extrato seco de *L. ferrea* através da quantificação de lactato desidrogenase (LDH) liberada por neutrófilos humanos***

Neutrófilos ( $2,5 \times 10^6$  células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37 °C na presença do ESLF (12,5 – 25 – 50 – 100 µg/mL), controle (veículo da substância –água), HBSS (células não-tratadas) e Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico) em placa de 96 poços. A seguir, a placa de 96 poços contendo os grupos em estudo, foi centrifugada a 755 g, por 10 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos em quadruplicata para outra placa de 96 poços e a determinação da atividade da enzima LDH realizada.

O ensaio foi realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform). O sobrenadante foi colocado em contato com o substrato da enzima LDH e imediatamente realizada a

leitura da absorbância em 340 nm nos tempos de 1 e 3 minutos, a 37 °C, em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A1 - A2) / 2] \times 25601,64$$

Onde:

A= atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1= absorbância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A2= absorbância final (3 minutos) em 340 nm;

25601,64= fator estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

O ensaio foi realizado em três dias diferentes, com células provenientes de doadores diferentes.

#### ***4.9.11 Avaliação da atividade do extrato seco de *L. ferrea* na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos induzidos por PMA***

O experimento foi realizado utilizando neutrófilos. A quimioluminescência (QL) é amplamente utilizada como um método para quantificar a capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (KUDOH et al., 1999). Com o auxílio de marcadores luminescentes (sondas) é possível quantificá-las e diferenciá-las. As sondas são utilizadas para aumentar a quantidade de luz emitida durante a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox, que geram intermediários eletronicamente excitados que, retornando a um estágio basal emitem fótons, os quais podem ser quantificados como quimiluminescência.

A sonda utilizada foi o luminol, utilizado para detecção da somatória de diversos metabólitos intracelulares produzidos pela ação da mieloperoxidase. Células foram incubadas com o ESLF (12,5 – 25 – 50 – 100 µg/mL) por 30 minutos e em seguida na presença do luminol (280 µM) a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram dispostas em placa de 24 poços e transportados para o luminômetro e a ela foi adicionado o estímulo (PMA) e, imediatamente, acompanhou-se a produção de quimiluminescência em cfm (contagem de fótons por

minuto) durante 20 minutos a 37 °C. Em todos os ensaios realizados foi mensurada a produção espontânea de Qlum das células na ausência de estímulo. Os resultados foram expressos através da emissão de quimiluminescência (KHAN et al., 2014).

#### ***4.9.12 Determinação da desgranulação de mieloperoxidase em neutrófilos humanos estimulados por PMA e pré-tratados com o extrato seco de *L. ferrea* e metil galato***

A suspensão de neutrófilos humanos ( $5,0 \times 10^6$  células / mL) foi pré-tratada a 37 °C por 15 min com o ESLF (12,5 – 25 – 50 e 100 µg/mL), metil galato (4 - 8 - 16 µg/mL), indometacina (10 µg/mL) ou HBSS (solução salina equilibrada de Hank) (células não tratadas). As células foram estimuladas pela adição de PMA (0,1 µM) por 15 min a 37 °C. O material foi centrifugado por 10 min a 4 °C. Alíquota (50 µL) de sobrenadantes foi adicionado PBS (100 µL), seguido de tampão fosfato (50 µL, pH 7,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,017%). Após 5 min a 37 °C, TMB (1,84 mM, 20 µL) foi adicionado e a reação foi então interrompida após 3 min com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 M, 30 µL). Os valores de absorvância foram medidos a 450 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade da MPO (CUNHA et al., 2008).

#### ***4.9.13 Avaliação da viabilidade celular do extrato seco de *L. ferrea* e do metil galato através da atividade metabólica de micróglia (ensaio MTT)***

O ensaio MTT foi realizado segundo metodologia proposta por Mosmann (1983). As micróglia foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para o teste, as micróglia foram plaqueadas a uma densidade final de  $1 \times 10^5$  células / mL por poço.

As células foram expostas a ESLF (1 - 5 - 10 – 25 - 50 -100 µg/mL) ou metil galato (1,9 – 5 – 10 – 15 – 20 µg/mL) por 24 h e o MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado. Após 1 h, as células foram centrifugadas (130 x g, 5 min), 180 µL do sobrenadante do meio foram retirados e 150 µL de DMSO puro foram adicionados. A absorvância foi medida 15 minutos depois a 570 nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do controle (amostras sem ESLF).

#### **4.9.14 Mensuração da produção de NO em micróglias estimuladas por LPS e pré-tratadas com o extrato seco de *L. ferrea* e metil galato**

A avaliação da concentração de nitrito no meio celular foi realizada conforme descrito por Green, Tannenbaum e Goldman (1981). O extrato seco das folhas de *L. ferrea* (5 – 10 – 25 – 50 – 100 µg/mL em água) ou metil galato (1,9 – 5 – 10 – 15 – 20 µg/mL em água) foi adicionado ao meio de células microgliciais BV2 (1 x 10<sup>6</sup> células /mL) e 1 h depois LPS (0,5 µg/mL) foi adicionado em uma placa de 96 poços. 100 µL de meio de cultura foram coletados e adicionados a 100 µL de reagente de Griess. A absorvância foi medida a 540 nm e interpolada em uma curva padrão de nitrito de sódio para determinar a concentração de nitrito no meio celular. O procedimento foi realizado em triplicata.

#### **4.9.15 Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de micróglias estimuladas por LPS e pré-tratadas com o extrato seco de *L. ferrea***

A expressão de iNOS foi determinada usando análise de Western blot. Células microgliciais BV2 (1 x 10<sup>6</sup> células/mL) foram pré-tratadas com o extrato de *L. ferrea* (50 e 100 µg/mL) ou DMSO 0,1% (veículo de droga) por 1h. As células foram estimuladas por 24 h com LPS (0,5 µg/ml). Proteínas celulares foram extraídas usando o tampão RIPA, para lise celular. A concentração de proteína foi definida com o kit BCA usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão e normalizada para a mesma concentração de proteína total com tampão de Laemmli. Quantidades iguais de proteína de cada amostra foram submetidas a 7,5-10% SDS-PAGE e transferidas para membranas de difloreto de polivilidina (PVDF). Após o bloqueio à temperatura ambiente com 5% de leite em pó desnatado por 1h, as membranas bloqueadas foram incubadas por 1h com anticorpos primários contra iNOS (1: 1000, Abcam Cambridge, UK), β-actina (1: 5000) (Abcam Cambridge, UK) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase, anti-coelho (1: 5000) (SAB3700956) ou anti-camundongo (1: 5000) (# 170-6516) foram adicionados às membranas de acordo com as recomendações. Finalmente, os blots foram revelados usando reagente de quimioluminescência (Bio Rad, EUA) no fotodocumentador, e os níveis de proteína

foram analisados usando o software ImageStudio Light 4 e normalizados para controle (LPS 0,5 µg/mL) para iNOS ou para níveis de β-actina para iNOS.

#### **4.9.16 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em micróglia estimuladas por LPS e pré-tratadas com o extrato seco de *L. ferrea***

As células BV2 foram pré-tratadas com o extrato seco de *L. ferrea* (50 µg/mL) ou DMSO 0,1% (veículo do fármaco) por 1 h, depois estimuladas com LPS (0,5 µg/mL) por 24 h. Os níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α no sobrenadante da cultura foram determinados usando kits de ELISA (BD Bioscience Pharmingen, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A absorvância foi medida a 450 nm.

#### **4.10 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As médias foram comparadas utilizando o teste *t* de student, para comparação entre dois grupos, ou a análise de variância (ANOVA) para 3 ou mais grupos e pós teste de Bonferroni. O critério de significância foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização do extrato seco de *L. ferrea*

#### 5.1.1 Caracterização física

O perfil granulométrico do ESLF está apresentado na figura 6. Cerca de 60% do pó ficou retido entre os tamises com abertura abaixo de 300  $\mu\text{m}$ . Através do percentual de retenção do extrato nos tamises e segundo a farmacopeia brasileira, verificou-se que o ESLF se enquadra na categoria de pó semifino.

Outras propriedades físicas do ESLF estão apresentadas na tabela 4. O produto estudado mostrou-se um pó de cor amarelo escuro, higroscópico, dissolveu-se facilmente em água e apresentou umidade em conformidade com os parâmetros considerados satisfatórios para extratos vegetais segundo a farmacopeia brasileira (umidade até 14%). Através das densidades aparente e após compactação foi possível calcular o fator de Hausner, o valor calculado segundo a farmacopeia americana (2007) indica que o ESLF apresenta propriedades de fluxo razoável.

Figura 6- Granulometria do extrato seco de *L. ferrea*

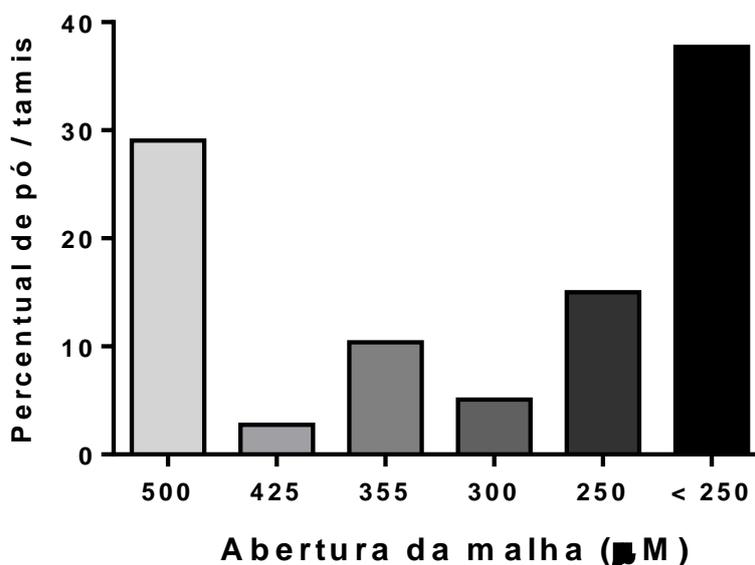


Tabela 4- Caracterização física e química do extrato seco de *L. ferrea* (ESLF)

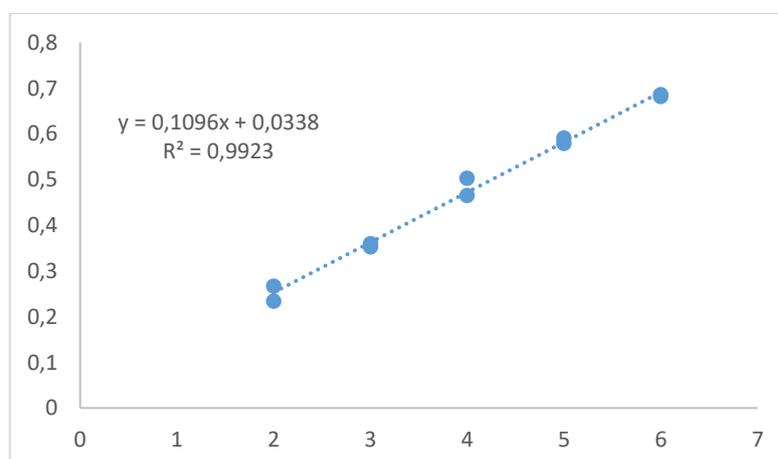
Propriedades	ESLF
Cor	Amarelo
Caráter	Higroscópico
Solubilidade em água (%)	100%
Umidade (%)	9,54 ± 0,002
Densidade aparente (g/mL)	0,433 ± 0,004
Densidade após compactação (g/mL)	0,534 ± 0,005
Fator de Hausner	1,233
Fenóis totais (mg EAG/g)	272,2 ± 0,002

### 5.1.2 Caracterização química

#### 5.1.2.1 Quantificação de fenóis totais no extrato seco de *L. ferrea* por espectrofotometria

A quantificação de substâncias fenólicas no extrato liofilizado de folhas de *L. ferrea* foi realizada utilizando extrato com concentração de 1 mg/mL. A linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração (Figura 7). Os valores da média da absorvância da amostra de extrato ( $0,484 \pm 0,007$ ) foram interpolados na curva de calibração, obtendo assim a concentração de  $272,2 \pm 0,002$  mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato.

Figura 7- Curva de calibração do ácido gálico obtida por espectrofotometria UV- VIS a 785 nm



### 5.1.2.2 Caracterização do extrato seco de *L. ferrea* por UPLC-MS

Análise do ESLF por UPLC-MS permitiu identificar 18 compostos através de fórmula molecular fornecida pelo software MassLynx 4.1 (Figura 8). Esses dados foram obtidos a partir de suas massas precisas (erro <5 ppm), padrões isotópicos (i-fit) e padrão de fragmentação de massa, bem como através de pesquisa quimiotaxonômica. Entre as classes de compostos secundários identificados compreenderam ácidos fenólicos (ácido quínico, metil galato e ácido elágico), flavonoides (orientina, apigenina e apigenina-C-galoil-glicosídeo) (Tabela 5) e ácidos graxos hidroxilados (Ácido trihidroxi-octadecadienóico, ácido trihidroxi octadecaenoico e ácido dihidroxihexadecanóico).

O pico 1 tem um íon precursor de  $m/z$  191,0511 ( $C_7H_{12}O_6$ ) com um íon produto de  $m/z$  127,0388 correspondendo à perda de duas moléculas de água e HCOOH e foi identificado como ácido quínico por comparação com um padrão analítico. O pico 3 é um íon precursor de  $m/z$  183,0204 ( $C_8H_8O_5$ ) e íons de fragmento de  $m/z$  168.0008  $[M-H-metil]^-$  e 124,0120  $[M-H-metil-CO_2]$  correspondendo a metil galato. O pico 7 apresentou um íon precursor de  $m/z$  300.9911 ( $C_{14}H_6O_8$ ) e íon produto de  $m/z$  169,0102 (ácido gálico), portanto foi identificado como ácido elágico por comparação com um padrão analítico autêntico.

Da mesma forma, os picos 4, 6, 10 e 11 de  $m/z$  1133 (4 e 6) e  $m/z$  483 (10 e 11) foram identificados como derivados do ácido elágico devido aos mesmos padrões de fragmentação encontrados para o ácido elágico. Ambos os picos 5 e 8 mostraram um íon desprotonado de  $m/z$  447,0 ( $C_{21}H_{20}O_{11}$ ), que era compatível com orientina/isoorientina. A discriminação foi alcançada com base nos íons de fragmento  $m/z$  429, encontrado apenas para isoorientina (pico 8) e pode ser usado para distinguir flavonoides 6-C-glicosídicos de flavonoides 8-C-glicosídicos.

O pico 9 de  $m/z$  583,1088 ( $C_{28}H_{24}O_{14}$ ) exibiu perda de galoil e glicosídeo de  $m/z$  431,0969 e 269,0436 (apigenina), foi identificado como apigenina galoil glicosídeo. Os picos 13, 15 e 16 foram identificados como ácidos graxos. Os picos 13 e 15 mostraram um íon precursor de  $m/z$  327,2180 ( $C_{18}H_{32}O_5$ ) e 329,2324 ( $C_{18}H_{34}O_5$ ), respectivamente, indicando a existência de uma ligação dupla extra. Eles foram identificados como ácido tri-hidroxi octadecadienóico, ácido tri-hidroxi octadecaenoico e ácido di-hidroxihexadecanóico, respectivamente.

O composto majoritário identificado foi o metil galato. Realizamos a quantificação desse componente a fim de verificar sua ação em ensaios posteriores e comparar os resultados aos do ESLF e elucidar a possível influência do composto majoritário nas propriedades do extrato.

Figura 8- Cromatograma e espectros de massa de compostos identificados no extrato seco de *Libidibia ferrea*. Ácido quinico (1), Metil galato (3), orientina (5), ácido elágico (7) e isoorientina (8)

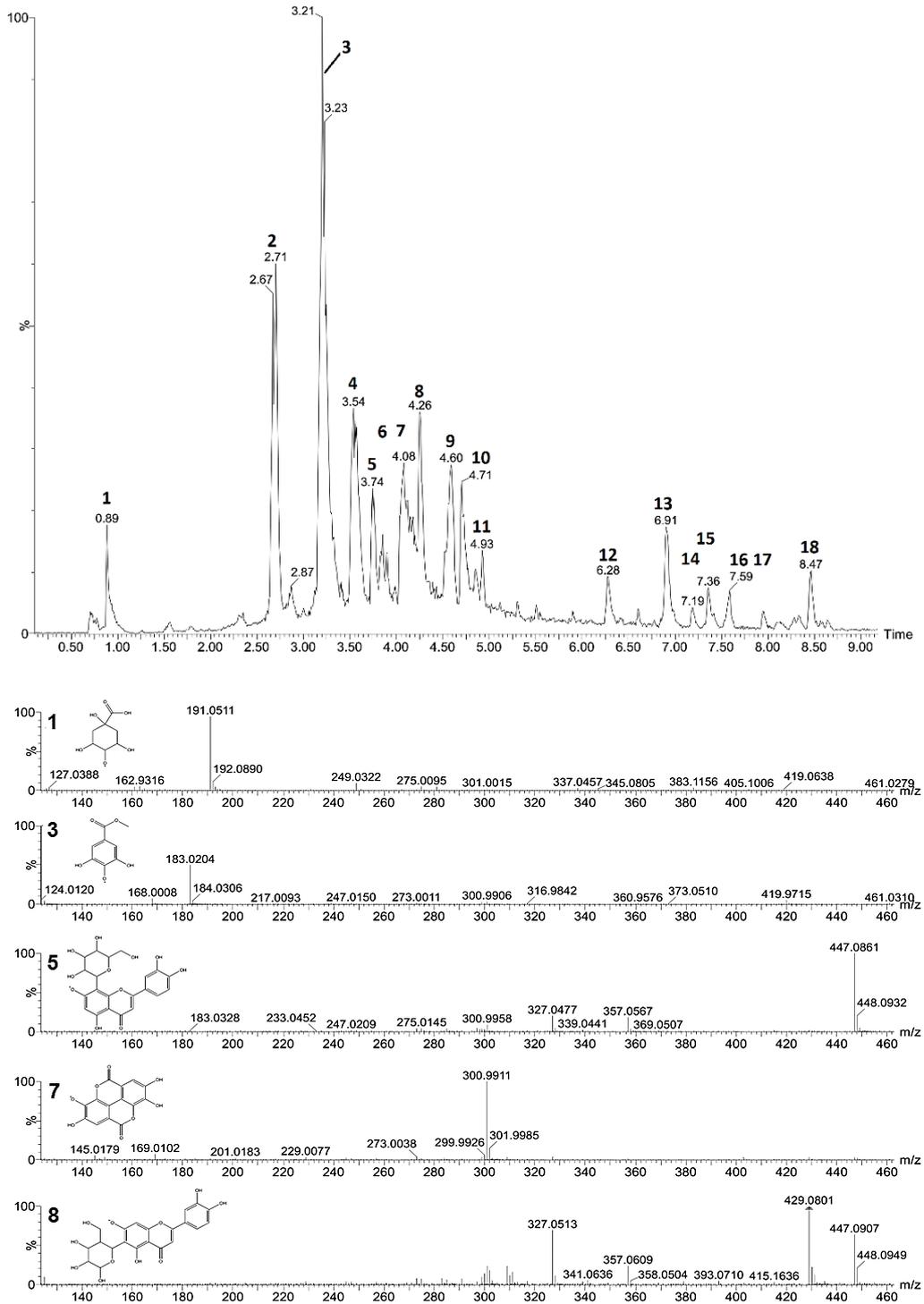


Tabela 5- Constituintes químicos detectados no extrato seco de *L. ferrea*

Pico	TR Min	[M-H] <sup>-</sup> calculada	Íons do produto (MS/MS)	Fórmula molecular	Nome do composto	Referências
1	0.89	191.0556	127.0390 (5%)	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Ác. quínico	
2	2.71	232.1198	146.0805 (5%)	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	Desconhecido	-
3	3.21	183.0293	168.0015 (8%), 124.0138 (100%)	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Metil galato	(Farag et al., 2015)
4	3.56	1133.0802	300.9979 (5%), 169.0084 (3%)	C <sub>45</sub> H <sub>34</sub> O <sub>35</sub>	Derivado do ácido elágico	-
5	3.74	447.0927	357.0575 (15%), 327.0485 (15%)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Orientina	(Krasteva and Nikolov, 2008)
6	3.86	1133.0802	300.9961(8%), 169.0119 (5%)	C <sub>45</sub> H <sub>34</sub> O <sub>35</sub>	Derivado do ácido elágico	-
7	4.15	300.9984	169.0134 (5%)	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	Ácido elágico	-
8	4.26	447.0927	429.0794 (100%), 357.0584 (30%), 327.0474 (60%)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Isoorientina	(Krasteva and Nikolov, 2008)
9	4.60	583.1088	431.0969 (50%), 269.0436 (1%), 169.0106 (58%)	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub>	Apigenina galoil glicosídeo	(Li et al., 2016)
10	4.71	483.0200	300.9938 (60%), 169.0173 (5%)	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	Derivado do ácido elágico	-
11	4.93	483.0200	300.9953 (30%), 169.0073 (5%)	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	Derivado do ácido elágico	-
12	6.28	401.1812	373.1488 (40%), 227.1261 (38%), 145.0119 (100%)	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	Desconhecido	-
13	6.91	327.2171	229.1413 (18%), 211.1318 (20%), 171.1018 (10%)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Ác. trihidroxiocetadec adienoico	(Aguiar Galvão et al., 2018)
14	7.19	227.1283	183.1362 (100%), 165.1269 (15%)	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Desconhecido	-
15	7.36	329.2328	229.1414 (22%), 211.1315 (28%), 171.1000 (13%)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Ác. Trihidroxi octadecaenoico	(Aguiar Galvão et al., 2018)
16	7.59	287.2222	269.2026 (5%)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	Ác. Dihidroxihexade canoico	(Aguiar Galvão et al., 2018)
17	7.95	691.3541	609.2628 (5%), 415.1458 (45%), 171.1038 (5%)	C <sub>33</sub> H <sub>56</sub> O <sub>15</sub>	Desconhecido	-
18	8.47	596.2657	-	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>17</sub>	Desconhecido	-

### **5.1.2.3 Quantificação de metil galato no extrato seco de *L. ferrea* por CLAE-DAD**

A concentração do metil galato foi obtida a partir de uma curva de calibração construída com seis concentrações crescentes de um padrão conhecido (Figura 9).

Inicialmente foi confirmada a presença do padrão metil galato no ESLF através da comparação dos tempos de retenção e os espectros UV-Vis característico da substância (Figura 10). Um software avalia a pureza do pico e através da análise dos espectros de absorção no pico indica quando dois ou mais compostos estão presentes. Um pico é considerado puro se seu “purity angle” for menor que “purity threshold” (WATERS CORPORATION, 1998). A pureza do pico cromatográfico foi determinada após varredura espectrofotométrica do padrão metil galato empregando detector de fotodiodo (DAD). Verificou-se que o pico de metil galato passou nos critérios de pureza do pico.

A linearidade é um parâmetro que demonstra a capacidade de se obter resultados analíticos (variável dependente Y) proporcionais a concentração de uma amostra (variável independente X). A linearidade deve ser determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes e o coeficiente de correlação linear (r) deve ser de, no mínimo, 0,99. Quanto mais próximo a 1,00 maior o grau de confiabilidade na proporcionalidade entre as variáveis (CALLEGARI-JAQUES, 2003). A construção da curva de calibração foi feita utilizando seis concentrações de metil galato e o coeficiente de correlação linear foi de 0,9903, portanto passando nos critérios de confiabilidade da curva.

Após interpolação do valor da área do pico de metil galato presente no extrato com os dados da curva de calibração verificou-se que a concentração do metil galato foi de 38 µg/mg de extrato seco.

Figura 9- Curva de calibração do metil galato obtida a partir da área de pico usando método cromatográfico (HPLC-UV/Vis)

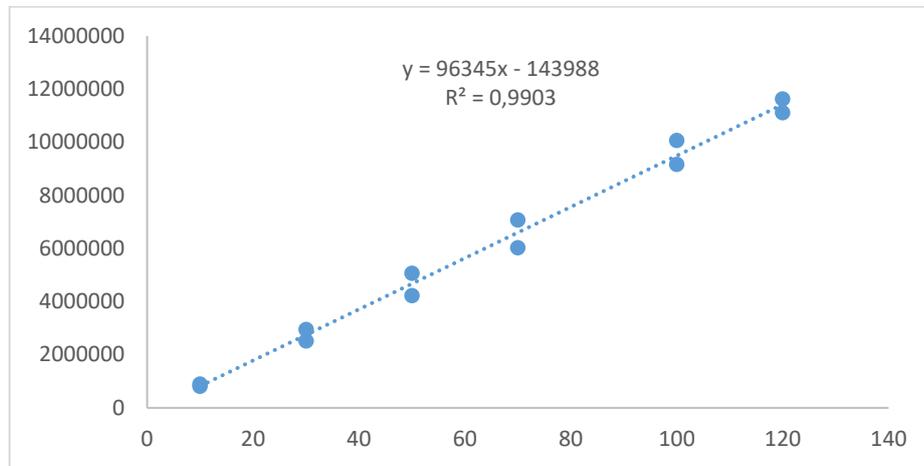
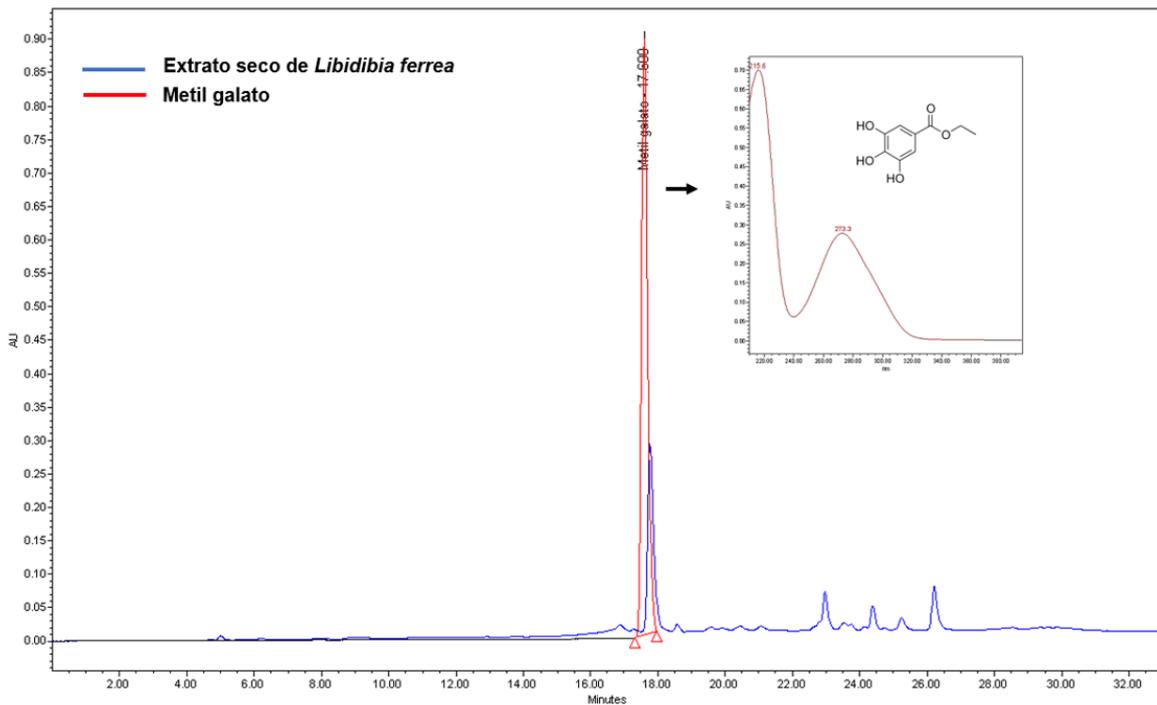


Figura 10- Sobreposição do extrato seco de *L. ferrea* e o padrão metil galato. Espectro de Varredura do metil galato de 190 à 400 nm gerado por CLAE – DAD



## **5.2 Avaliação Toxicológica do extrato de *L. ferrea***

### **5.2.1 Avaliação da toxicidade em dose única**

As doses avaliadas do ESLF (300, 1000 e 2000 mg/Kg, v.o.) não causaram a morte de nenhum animal assim como o grupo controle. Quanto a avaliação comportamental, não foram observadas alterações dos animais após o tratamento em relação aos mesmos antes do tratamento (dia zero). Porém, detectamos um estado de agitação após a administração de todas as doses do extrato, normalizado após uma hora.

### **5.2.2 Parâmetros hematológicos**

Os animais tratados em dose única com o ESLF nas concentrações 300, 1000 e 2000 mg/kg não apresentaram alterações significativas na contagem de leucócitos ( $p = 0,73$ ) e plaquetas ( $p = 0,38$ ) após 14 dias do tratamento quando comparado ao grupo controle após o mesmo intervalo de tempo (Tabela 6), Observou-se uma redução significativa na contagem de hemácias em todos os grupos de animais que receberam as doses do ESLF (300, 1000 e 2000 mg/kg) quando comparado ao grupo controle após 14 dias ( $p = 0,0082$ ). No entanto, quando compara-se a quantidade de hemácias após os 14 dias do experimento com a quantidade obtida do sangue coletado antes do início do tratamento não é observado uma significativa mudança estatística em nenhuma dose administrada nos animais ( $p > 0,05$ ) Ademais, a contagem diferencial de leucócitos revelou uma elevação na quantidade de segmentados nas doses 1000 e 2000 mg/kg e redução significativa de linfócitos nas concentrações 1000 e 2000 mg/kg após o período do estudo em comparação com o grupo de animais que receberam apenas o veículo do extrato (Tabela 7). Quando os valores de segmentados e linfócitos são comparados a quantidade obtida no início do tratamento, não são observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ )

Tabela 6- Efeitos do extrato seco de *L. ferrea* sobre parâmetros hematológicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose única.

Parâmetros	Período	Controle	ESLF 300 mg/Kg	ESLF 1000mg/Kg	ESLF 2000mg/Kg
<b>Hemácias (quant./uL)</b>	Dia 0	4, ± 0,27	4,6 ± 0,77	3,78 ± 0,89	4,00 ± 0,48
	Dia 14	6,8 ± 0,88	3,3 ± 0,20*	4,30 ± 0,79*	3,52 ± 0,35*
<b>Leucócitos (milhões/<math>\mu</math>L)</b>	Dia 0	7,9 ± 0,26	8,1 ± 0,19	8,26 ± 0,12	8,14 ± 0,09
	Dia 14	8,4 ± 0,13	7,8 ± 0,31	7,94 ± 0,50	8,06 ± 0,16
<b>Plaquetas (x1000)</b>	Dia 0	651,7 ± 30,61	697,4 ± 78,40	755,40 ± 50,56	851,20 ± 43,90
	Dia 14	1058,0 ± 51,48	1002,8 ± 47,34	942,80 ± 40,79	965,40 ± 37,14

ESLF: extrato seco de *L. ferrea* Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. dos grupos com 5 camundongos swiss fêmeas cada.

\*  $p < 0,05$  vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Tabela 7- Contagem diferencial de células sanguíneas (linfócitos e segmentados) de camundongos swiss fêmeas após protocolo de toxicidade dose única com extrato seco de *L. ferrea*.

Parâmetros	Período	Controle	ESLF 300 mg/Kg	ESLF 1000mg/Kg	ESLF 2000mg/Kg
<b>Segm.</b>	Dia 0	8,0 ± 2,0	13,33 ± 1,45	17,0 ± 2,08	15,3 ± 1,45
	Dia 14	6,0 ± 3,0	14,33 ± 2,02	16,0 ± 2,30*	18,0 ± 0,57*
<b>Linfócitos</b>	Dia 0	92,0 ± 2,0	86,67 ± 1,45	83,0 ± 2,08	84,6 ± 1,45
	Dia 14	94,0 ± 3,0	85,33 ± 1,76	84,0 ± 2,30*	82,0 ± 0,57*

ESLF: extrato seco de *L. ferrea* Segm: segmentados. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. dos grupos com 5 camundongos swiss fêmeas cada. \*  $p < 0,05$  vs controle dia 15 (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

### 5.2.3 Parâmetros bioquímicos

A tabela 8 apresenta os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos swiss fêmeas submetidos aos ensaios toxicológicos

pré-clínicos em dose única, por via oral. De modo geral evidenciou-se que os parâmetros não foram significativamente alterados após a administração das doses 300, 1000 e 2000 mg/Kg do ESLF em relação ao grupo controle após o período de tratamento.

As taxas de colesterol foram elevadas após o período do estudo em todas as concentrações do ESLF, no entanto esses valores não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle ( $p = 0,77$ ). Verificou-se ainda um aumento de aproximadamente três vezes no teor de HDL em relação aos valores iniciais desse parâmetro em todas as concentrações do extrato e no grupo controle.

O doseamento de glicose, parâmetro que avalia o metabolismo de carboidratos, não revelou alterações significativas nas três concentrações avaliadas do ESLF em relação ao grupo controle. As taxas desse biomarcador nos grupos de animais que receberam o ESLF foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle ( $p = 0,78$ ).

A avaliação da função renal e hepática é indispensável para a avaliação toxicológica de um novo produto. Verificamos que após 14 dias a taxa de ureia no soro dos grupos de animais tratados com o ESLF foi menor em relação ao grupo controle, no entanto os valores permaneceram estatisticamente semelhantes entre os grupos ( $p = 0,24$ ).

O doseamento dos parâmetros de função hepática, alanina aminotransferase (ALT) revelou uma redução em todos os grupos em relação ao tempo inicial do experimento, a dose 1000 mg/kg elevou as taxas da enzima aspartato aminotransferase (AST) em relação ao grupo controle. Porém, os valores obtidos desses biomarcadores nos grupos de animais que foram submetidos a administração de ESLF permaneceram próximas ao valor do controle (ALT –  $p = 0,65$ ; AST –  $p = 0,38$ ).

Tabela 8- Efeitos do extrato liofilizado de *L. ferrea* sobre parâmetros bioquímicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose única.

<b>Parâmetros</b>	<b>Período</b>	<b>Controle</b>	<b>ESLF 300 mg/Kg</b>	<b>ESLF 1000mg/Kg</b>	<b>ESLF 2000mg/Kg</b>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	Dia 0	76,5 ± 4,50	107 ± 1,00	92,0 ± 7,00	83,0 ± 9,00
	Dia 14	139,5 ± 19,50	140 ± 7,20	127,0 ± 11,70	126,5 ± 6,50
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	Dia 0	220,5 ± 51,50	210 ± 3,10	144,3 ± 10,10	222,5 ± 130,50
	Dia 14	257,0 ± 39,00	206 ± 0,50	148,0 ± 17,01	142,0 ± 18,00
<b>HDL (mg/dL)</b>	Dia 0	46,0 ± 8,00	48 ± 3,00	45,0 ± 2,60	42,0 ± 1,00
	Dia 14	119,5 ± 44,50	112 ± 1,70	127,3 ± 39,80	137,5 ± 13,50
<b>Glicose (mg/dL)</b>	Dia 0	147,0 ± 10,00	257,0 ± 2,70	146,0 ± 2,00	133,0 ± 14,00
	Dia 14	170,0 ± 2,00	159,0 ± 3,00	170,5 ± 17,50	158,0 ± 8,00
<b>Ureia (mg/dL)</b>	Dia 0	47,5 ± 6,50	30,0 ± 3,80	47,5 ± 1,50	42,0 ± 0,00
	Dia 14	88,5 ± 16,50	42,0 ± 10,60	68,0 ± 12,00	52,5 ± 2,50
<b>ALT (U/L)</b>	Dia 0	8,0 ± 7,00	10,0 ± 8,50	13,5 ± 2,50	16,5 ± 4,50
	Dia 14	3,4 ± 1,75	3,5 ± 0,60	1,7 ± 0,00	1,75 ± 1,70
<b>AST (U/L)</b>	Dia 0	2,0 ± 1,00	13,0 ± 0,90	3,0 ± 2,00	1,5 ± 0,50
	Dia 14	1,7 ± 1,70	1,7 ± 0,40	6,05 ± 4,35	0 ± 0,00

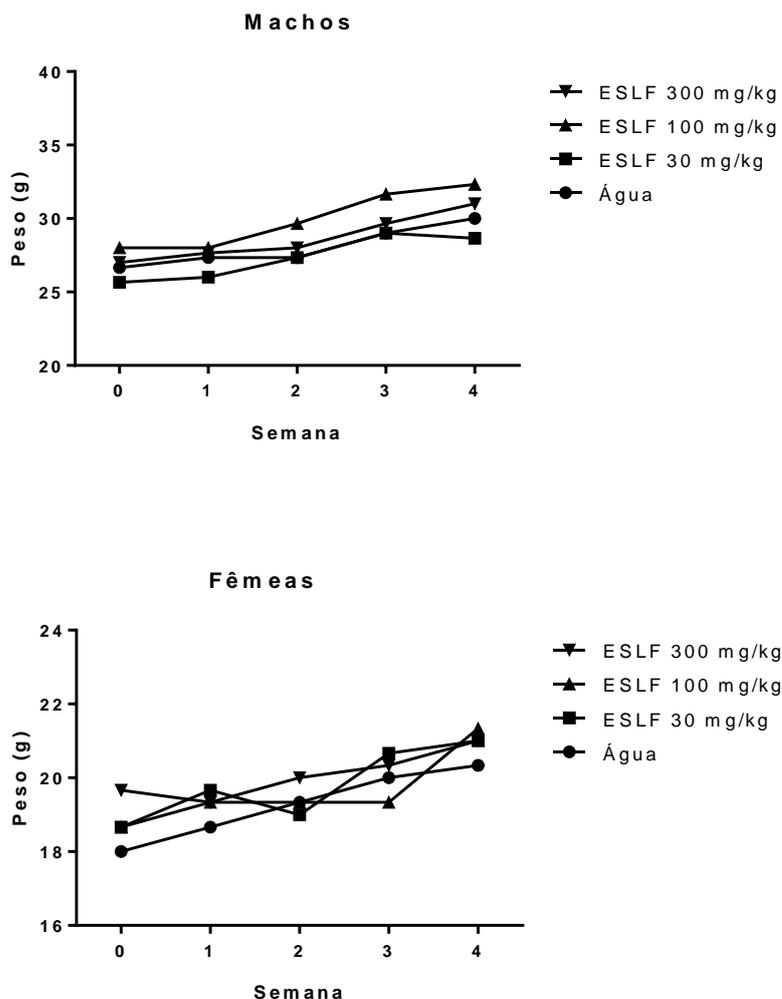
ESLF: extrato seco de *L. ferrea*. Valores expressos como média ± E.P.M. \* p < 0,05 vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

#### **5.2.4 Avaliação da toxicidade em dose repetida**

Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade em dose repetida do ESLF complementaram os achados do estudo de toxicidade em dose única (Tabelas 6, 7 e 8). As concentrações avaliadas do ESLF (30, 100 e 300 mg/Kg) não causaram a morte de nenhum animal. Não foram observadas alterações na ingestão de ração, de água e a evolução do peso dos animais não apresentou variações anormais

(Figura 11). Em relação a sinais clínicos, os animais não apresentaram agitação, piloereção e nem diarreia durante o período de estudo.

Figura 11- Evolução do peso de camundongos durante período de tratamento diário com o extrato de *L. ferrea* e o veículo água



ESLF: extrato seco de *L. ferrea*.

### 5.2.5 Parâmetros hematológicos

Os valores dos parâmetros hematológicos estão expressos na tabela 9. As taxas de hemácias em todas as concentrações permaneceram próximas as taxas quantificadas no grupo de animais que receberam o veículo do extrato ( $p= 0,6622$ ). A dose 300 mg/Kg do ESLF reduziu pela metade a quantidade de leucócitos em comparação ao grupo controle, no entanto, essa dose não diferiu significativamente

do valor de leucócitos obtidos no início do tratamento ( $p = 0,6669$ ). A número de plaquetas foi significativamente reduzido nas doses 30, 100 e 300 mg/Kg em comparação ao grupo controle ( $p = 0,0015$ ), porém, não há diferença estatística em relação a quantidade de plaquetas do início do tratamento em todas as doses administradas do ESLF ( $p > 0,05$ ).

Na contagem diferencial dos leucócitos (tabela 10), verificou-se redução na quantidade de neutrófilos segmentados após os 28 dias de tratamento em todas as doses do extrato administrada em relação ao grupo controle ( $p = 0,0046$ ). Ressalta-se que na contagem de segmentados não foi evidenciada diferença estatística nas doses 100 e 300 mg/kg após o período do estudo em relação ao início do experimento ( $p > 0,05$ ). Além disso, não foi observada diferença estatística nos valores de linfócitos em relação ao grupo de animais controle ( $p = 0,2740$ ).

Tabela 9- Efeitos do extrato seco de *L. ferrea* sobre parâmetros hematológicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose repetida.

Parâmetros	Período	Controle	ESLF 30 mg/Kg	ESLF 100mg/Kg	ESLF 300mg/Kg
<b>Hemácias (quant./uL)</b>	Dia 0	7,0 ± 0,81	8,13 ± 0,30	7,685 ± 0,44	8,25 ± 0,15
	Dia 28	7,8 ± 0,52	6,75 ± 1,35	7,363 ± 1,09	8,28 ± 0,17
<b>Leucócitos (milhões/<math>\mu</math>L)</b>	Dia 0	3,81 ± 0,85	3,96 ± 0,61	4,575 ± 0,69	3,76 ± 0,23
	Dia 28	6,00 ± 0,31	4,44 ± 0,88	4,100 ± 0,87	3,16 ± 0,18*
<b>Plaquetas (x1000)</b>	Dia 0	810,70 ± 97,63	320,40 ± 72,72*	540,5 ± 147,80*	594,50 ± 133,40
	Dia 28	1023,00 ± 52,20	324,60 ± 82,39*	683,3 ± 179,20*	526,50 ± 142,40*

ESLF: extrato seco de *L. ferrea*. Valores expressos como média ± E.P.M. dos grupos com 6 camundongos swiss machos e fêmeas. \*  $p < 0,05$  vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Tabela 10 - Contagem diferencial de células sanguíneas (linfócitos e segmentados) de camundongos swiss fêmeas após protocolo de toxicidade dose repetida com extrato seco de *L. ferrea*.

Parâmetros	Período	Controle	ESLF 30 mg/Kg	ESLF 100mg/Kg	ESLF 300mg/Kg
<b>Segm.</b>	Dia 0	14,67 ± 1,80	9,20 ± 0,96	5,75 ± 1,10	6,66 ± 0,88
	Dia 28	10,33 ± 0,55	4,75 ± 1,31*	4,00 ± 1,47*	5,167 ± 1,37*
<b>Linfócitos</b>	Dia 0	84,17 ± 1,93	86,60 ± 2,67	89,75 ± 1,54	94,00 ± 2,16
	Dia 28	85,50 ± 1,54	82,60 ± 9,46	94,00 ± 1,47	93,17 ± 1,07

ESLF: extrato seco de *L. ferrea* Segm: segmentados. Valores expressos como média ± E.P.M. dos grupos com 6 camundongos swiss machos e fêmeas. \* p < 0,05 vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

### 5.2.6 Parâmetros bioquímicos

Os resultados dos parâmetros bioquímicos antes e após a administração do ESLF (30, 100 e 300 mg/Kg) estão apresentados na tabela 11. A avaliação do perfil lipídico mostrou valores de colesterol total e triglicerídeos equivalentes estatisticamente aos valores doseados no grupo controle (colesterol - p = 0,4062; triglicerídeos – p = 0,1537). No entanto, foi observado uma redução de cerca de 70% do parâmetro HDL em relação ao grupo controle.

A avaliação do metabolismo de carboidratos, medido através do doseamento de glicose sérica revelou que nenhuma dose do ESLF alterou os valores desse parâmetro em relação ao grupo controle de animais (p = 0,1673).

E por último, a análise do doseamento sérico de ureia, biomarcador usado para avaliação da função hepática e renal não revelou grandes alterações nos valores desse parâmetro após o uso diário durante 28 dias das doses do ESLF em relação aos animais que receberam o veículo do extrato (p = 0,2696).

Tabela 11- Efeitos do extrato liofilizado de *L. ferrea* sobre parâmetros bioquímicos de camundongos swiss fêmeas em protocolo de toxicidade em dose repetida.

Parâmetros	Período	Controle	ESLF 30 mg/Kg	ESLF 100mg/Kg	ESLF 300mg/Kg
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	Dia 0	100,80 ± 2,79	135,90 ± 7,54	137,70 ± 8,79	146,40 ± 15,62
	Dia 28	111,90 ± 2,48	128,90 ± 10,33	130,60 ± 4,90	136,30 ± 6,03
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	Dia 0	188,00 ± 3,39	141,50 ± 8,37	138,60 ± 6,11	129,00 ± 2,90
	Dia 28	197,20 ± 2,28	184,00 ± 41,42	147,70 ± 4,29	143,40 ± 4,64
<b>HDL (mg/dL)</b>	Dia 0	48,67 ± 2,65	10,30 ± 0,64	11,06 ± 0,99	10,94 ± 0,59
	Dia 28	70,50 ± 5,49	20,02 ± 8,94*	21,38 ± 10,05*	22,11 ± 10,97*
<b>Glicose (mg/dL)</b>	Dia 0	185,50 ± 8,48	200,40 ± 5,89	216,00 ± 15,97	176,0 ± 15,24
	Dia 28	166,20 ± 5,61	218,50 ± 19,74	188,80 ± 10,80	181,3 ± 11,89
<b>Ureia (mg/dL)</b>	Dia 0	42,50 ± 2,70	39,35 ± 3,07	41,45 ± 3,65	39,24 ± 3,30
	Dia 28	45,75 ± 2,62	40,23 ± 0,44	40,90 ± 2,92	43,66 ± 1,88

ESLF: extrato seco de *L. ferrea* Segm: segmentados. Valores expressos como média ± E.P.M. dos grupos com 5 camundongos swiss fêmeas cada. \* p < 0,05 vs controle (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

### 5.2.7 Avaliação histopatológica

Foram avaliados o fígado, rins, coração e estômago dos camundongos swiss que receberam o veículo água e o ESLF por via oral (Figura 12).

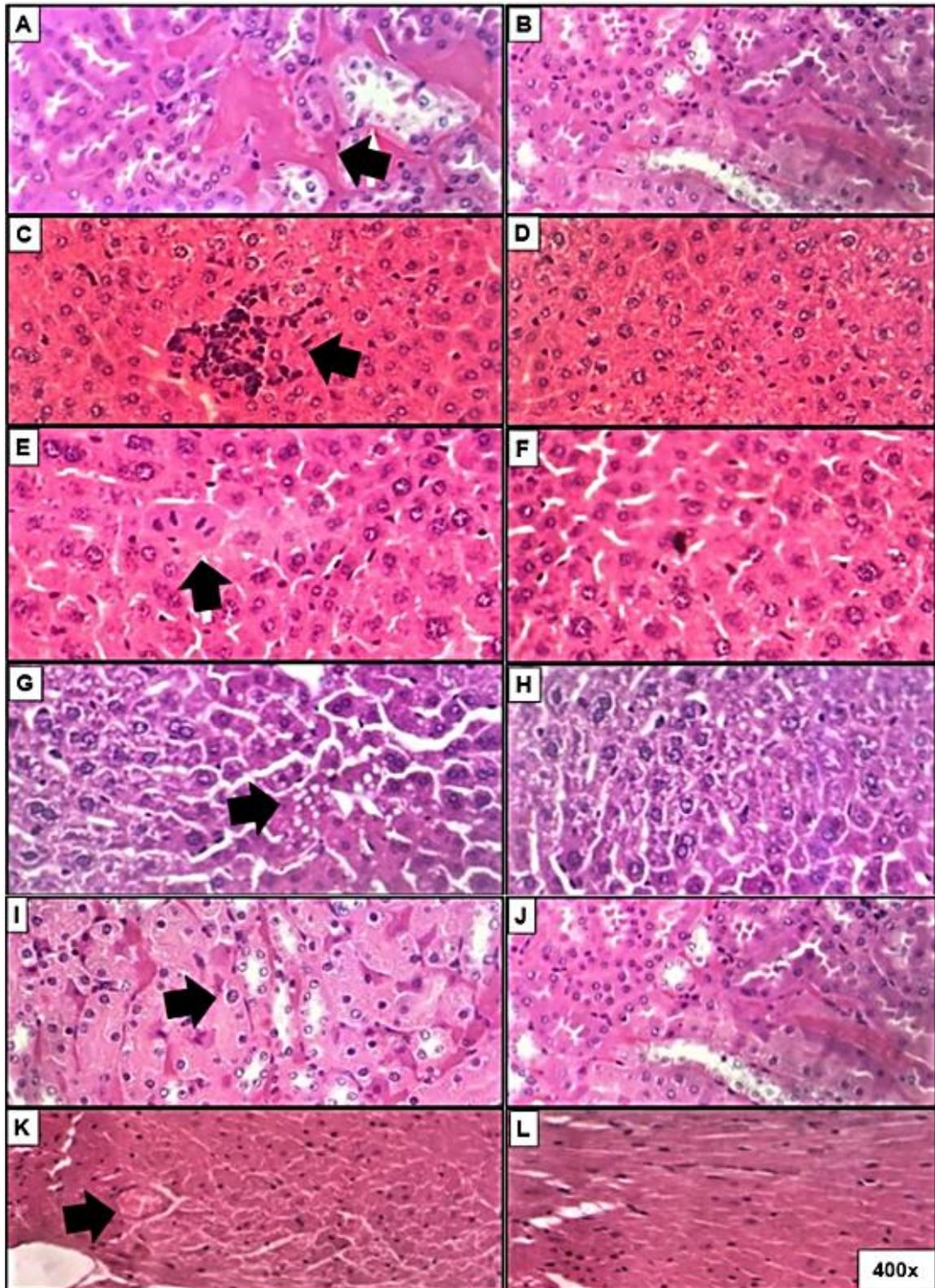
Em todos os grupos, inclusive no grupo controle foram observados focos de congestão (Figura 12 A). Em relação ao grupo que recebeu o ESLF 30 mg/Kg, os principais achados no fígado foram focos de edema, neutrófilos e linfócitos. Essas alterações também foram encontradas no grupo controle. No entanto observou-se a presença mais frequente de mitoses no fígado em relação ao grupo controle e raras binucleações. Nos rins dos animais que receberam a dose 30 mg/Kg foi observado edema e focos de cardiomiólise no coração, esses achados não foram observados no grupo controle. O estômago dos animais do grupo 30 mg/Kg não apresentou

alterações da normalidade. Ademais, não foram identificadas fibroses, hemorragias, inflamação ou necroses em nenhum órgão.

No grupo que recebeu a dose 100 mg/Kg foram identificados focos de edema no fígado e a presença de neutrófilos e linfócitos, nesse grupo foi possível observar ainda microgotas de esteatose, porém esse achado também foi constatado no grupo controle. Salienta-se mais uma vez a presença de mitoses frequentes e núcleos grandes nesse órgão, diferentemente do grupo controle. Nos rins verificou-se a presença de edema superficial. No coração, houve a identificação de cardiomiólise, sendo ainda observado focos de esteatose e perda de estriação em alguns campos, o que diferiu dos achados do grupo controle. O estômago dos animais desse grupo não apresentou atipias e não foi observado nos órgãos de nenhum dos animais a presença de hemorragia, fibrose, inflamação e necrose extensa.

Por fim, no grupo que recebeu a dose 300 mg/Kg foi possível identificar focos de edema intracelular no fígado, microgotas mais frequentes de esteatose (Figura 12 G) do que nos grupos que receberam as doses mais baixas do ESLF, e a presença de neutrófilos e linfócitos (Figura 12 C). No fígado, foram detectados focos de mitoses frequentes (Figura 12 E) e a presença de núcleos grandes. Nos rins constatou-se a presença de edema superficial (12 I), achado também no grupo controle. No coração verificou-se microgotas de esteatose, cardiomiólise e perda da estriação em alguns campos (12 K), o que diferiu do observado no grupo de animais controle. Na avaliação histológica do estômago dos animais desse grupo não foram observadas alterações significativas em relação ao grupo controle. Além disso, em nenhuma lâmina houve a detecção de hemorragia, fibrose e inflamação.

Figura 12 - Fotomicrografias (400x) do rim e fígado de camundongos swiss tratados e não tratados (controle) com extrato de *L. ferrea* por via oral durante 28 dias



Grupo controle sem atipias (direita) e histologia de órgãos com atipias de grupos de camundongos que receberam o ESLF (300 mg/kg) marcadas com setas (esquerda). A – Congestão no epitélio

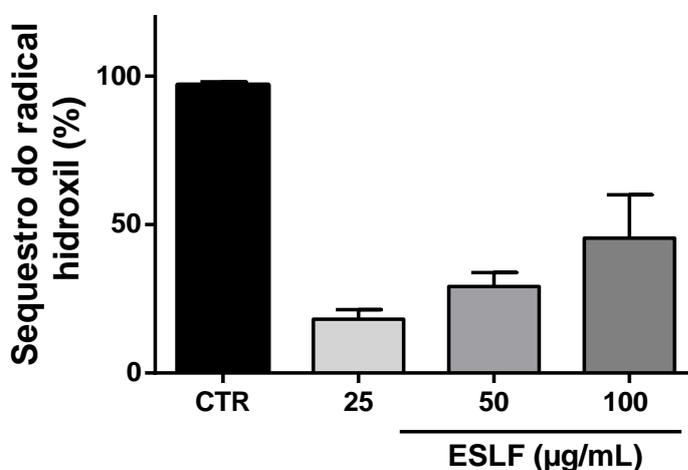
renal. Evidencia-se uma coloração rosa com tonalidade mais clara comparada a do citoplasma celular (seta). B – Epitélio renal sem atipias. C – Presença de neutrófilos e linfócitos no epitélio hepático. Aglomeração de células com núcleo de coloração preta com tonalidade mais escura do que o núcleo de células adjacentes (seta). D – Epitélio hepático sem atipias. E – Mitose e presença de núcleos grandes no epitélio hepático. Verificação de múltiplos fragmentos nucleares (seta) e núcleos celulares de tamanho elevado em relação aos adjacentes (seta). F – Epitélio hepático com apenas um núcleo e sem atipias. G – Microgotas/esteatose no tecido hepático. Observam-se círculos descoloridos na porção inferior (seta). H – Epitélio hepático sem a presença de microgotas/esteatose. I - Edema e perda de nucleação no tecido renal. Citoplasma com tonalidade rosa claro, tamanho entre bordas superior ao controle e ausência de núcleos em algumas células (seta). J – Epitélio renal com volume citoplasmático típico. K- Perda de estriação no tecido cardíaco (seta). L – Epitélio cardíaco com estriações. Coloração: Hematoxilina- eosina (HE), aumento de 400x

### 5.3 Aspectos funcionais: atividades antioxidante e anti-inflamatória

#### 5.3.1 Atividade sequestradora do radical hidroxil

O extrato seco das folhas de *L. ferrea* possui potencial sequestrador do radical hidroxil (Figura 13). A concentração 100 µg/mL sequestrou  $45 \pm 7,27\%$  dos radicais hidroxil, o maior sequestro entre as demais concentrações, 25 µg/mL ( $18,14 \pm 1,59\%$ ), 50 µg/mL ( $29,16 \pm 2,32\%$ ). Os resultados indicam uma tendência para efeito dose dependente. Além disso, não foi evidenciada diferença significativa entre as concentrações 50 e 100 µg/mL ( $p = 0,122$ ).

Figura 13- Atividade do extrato seco de *L. ferrea* no sequestro do radical hidroxil

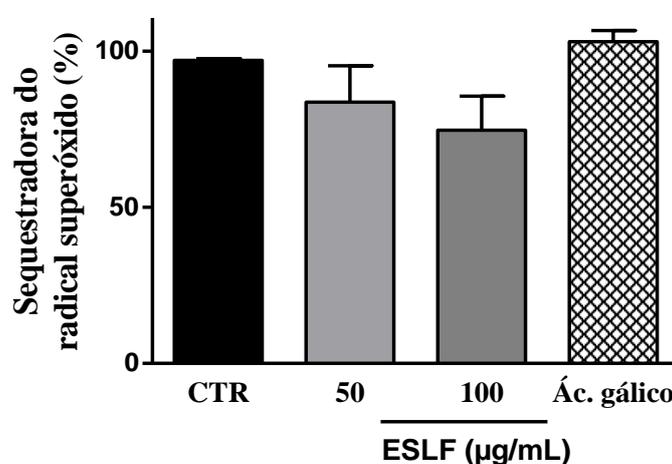


ESLF: Extrato seco das folhas de *Libidibia ferrea*. CTR: controle positivo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média.  $n = 3$  / grupo.

### 5.3.2 Atividade sequestradora do ânion superóxido

O extrato seco de *L. ferrea* apresentou atividade sequestradora de ânions superóxido (Figura 14). A maior média percentual de sequestro foi observado na concentração 50 µg/mL ( $83,67 \pm 11,67\%$ ). As concentrações 50 e 100 µg/mL não diferiram entre si e apresentaram atividade sequestradora do ânion superóxido comparável ao padrão ácido gálico (100 µg/mL) ( $p = 0,17$ ).

Figura 14- Atividade do extrato seco de *L. ferrea* no sequestro do radical superóxido



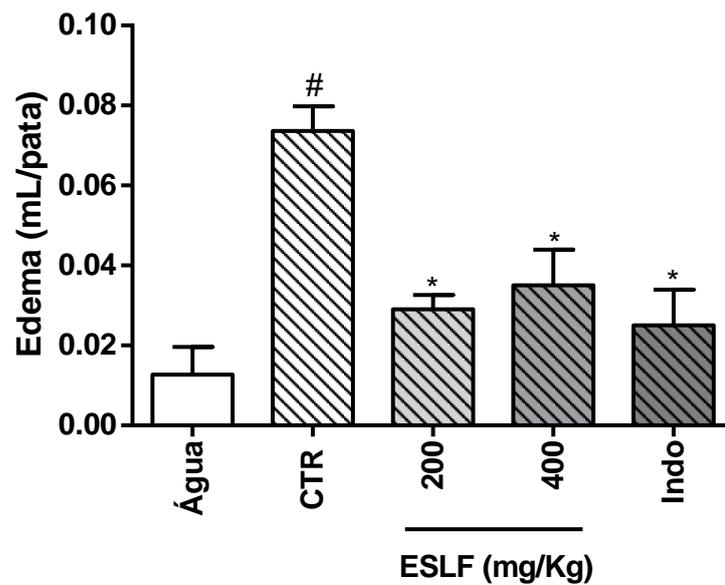
ESLF: Extrato liofilizado das folhas de *Libidibia ferrea*. CTR: controle positivo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média.  $n = 3$  / grupo.

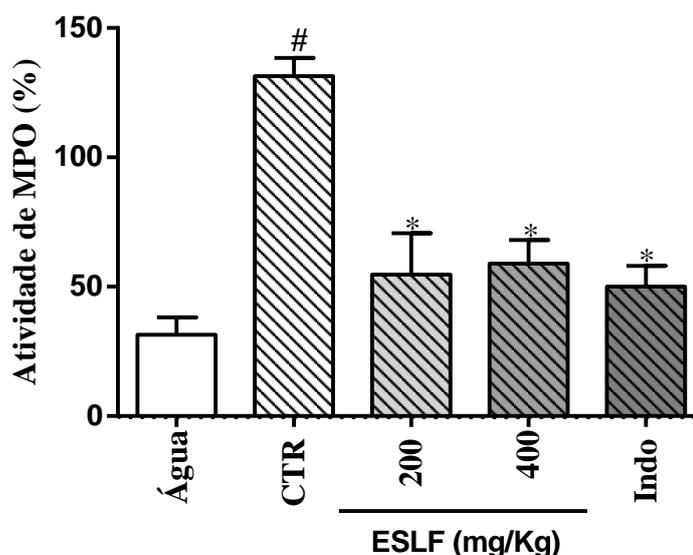
### 5.3.3 Atividade antiedematogênica e efeito redutor da migração neutrofílica do ESLF no modelo de edema de pata induzido por carragenina

A determinação do volume do edema de pata induzido por carragenina é um método amplamente empregado para investigar e avaliar a ação anti-inflamatória de novas drogas. Inicialmente foi observado uma elevação significativa do grupo tratado com LPS ( $0,07 \pm 0,006$  mL/pata) em relação ao grupo não tratado ( $0,01 \pm 0,006$  mL/pata), mostrando a eficiência do modelo. As concentrações 200 e 400 mg/kg do extrato de *L. ferrea* reduziram significativamente ( $p = 0,0145$ ) o edema nas patas dos animais ( $0,02 \pm 0,003$  mL/pata e  $0,03 \pm 0,008$  mL/pata, respectivamente) comparado ao grupo controle ( $0,07 \pm 0,006$  mL/pata) (Figura 15). Além disso, observou-se um efeito comparável entre os grupos tratados com jucá (200 e 400 mg/kg) e o padrão indometacina 5 mg/kg ( $0,02 \pm 0,008$  mL/pata) ( $p = 0,6539$ ).

O tecido subcutâneo foi coletado das patas dos animais e a partir desse material foi possível investigar indiretamente a migração leucocitária através da medida da atividade da enzima mieloperoxidase. O grupo controle estimulado por carragenina elevou em aproximadamente quatro vezes a atividade de MPO ( $131,4 \pm 15,79\%$ ) em relação ao grupo não tratado ( $31,42 \pm 15,25\%$ ), validando assim o modelo escolhido para essa investigação. O ESLF reduziu de forma significativa a atividade dessa enzima em relação ao grupo estimulado ( $p < 0,00001$ ), sendo as concentrações 200 mg/Kg ( $54,71 \pm 16,03\%$ ), 400 mg/Kg ( $58,94 \pm 9,07\%$ ) e o padrão indometacina 5 mg/kg ( $50,05 \pm 8,07\%$ ) estatisticamente equivalentes ( $p = 0,7707$ ).

Figura 15- Volume de edema de pata e atividade da enzima mieloperoxidase no tecido subcutâneo das patas de camundongos swiss induzido por carragenina após pré-tratamento com o extrato seco de *L. ferrea*





CTR: controle; VEIC: veículo; ESLF: Extrato seco das folhas de *Libidibia ferrea*; MPO: mieloperoxidase; indo: indometacina. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. #  $p < 0,0001$  em relação ao controle. \*  $p < 0,0001$  em relação ao controle estimulado; ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni;  $n = 3$  / grupo.

Diante dos resultados promissores do ESLF (27,2% de fenóis totais), e percebendo esse como ingrediente bioativo alimentício em potencial, os estudos prosseguiram no sentido de comparar o mesmo com o extrato de *C. sinensis*. Isso por tratar-se de um ingrediente bioativo extensivamente explorado por indústrias do setor alimentício, e que possui atividades anti-inflamatória e antioxidantes comprovadas associadas à presença de fenóis (15,75% de fenóis totais).

#### **5.3.4 Efeito do extrato de *L. ferrea*, metil galato e *C. sinensis* sobre os níveis da interleucina $TNF-\alpha$ no tecido subcutâneo das patas de camundongos induzido por carragenina**

A avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de *L. ferrea* foi investigada através da inibição da produção da citocina pró-inflamatória  $TNF-\alpha$  (Figura 16). Além disso, comparou-se o efeito da dose do extrato com os melhores resultados de atividade anti-inflamatória (200 mg/kg) com o do seu componente majoritário, metil galato (7 mg/kg). Essa dose escolhida de metil galato foi baseada na quantidade do ativo presente na dose de 200mg/kg do extrato. O extrato de *C. sinensis* na dose 100 mg/kg possui evidência científica relacionada a redução da

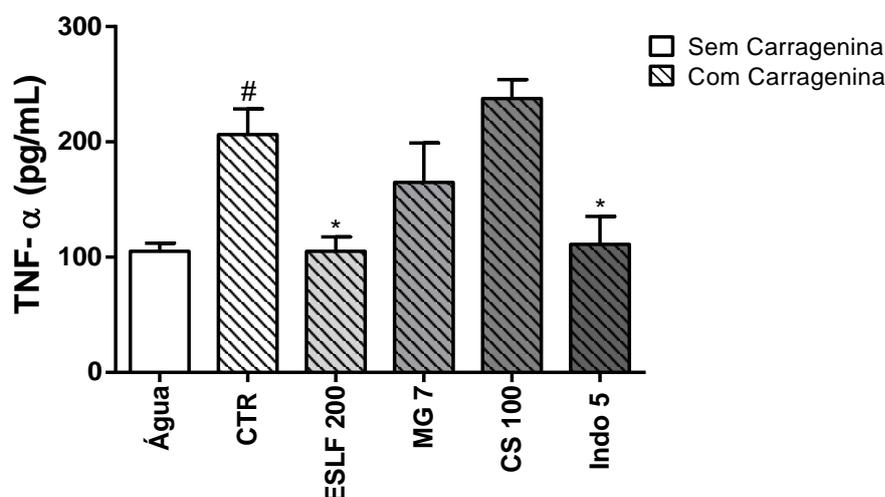
produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  (CHEN et al., 2012) e por isso foi adicionado como um grupo de referência no ensaio.

Verificou-se que o grupo estimulado por carragenina elevou em cerca de duas vezes a produção de TNF- $\alpha$  ( $206,4 \pm 22,16$  pg/mL) comparado ao grupo controle ( $105,2 \pm 6,96$  pg/mL), validando assim o ensaio. Em relação ao grupo apenas estimulado por carragenina, houve uma redução significativa de aproximadamente 50% de TNF- $\alpha$  comparado ao grupo de animais que receberam a dose 200 mg/kg do ESLF ( $105,2 \pm 12,29\%$ ). Observa-se que os níveis de redução da produção de TNF- $\alpha$  pelo extrato foram tão eficientes que reduziram essa citocina até valores considerados basais.

O grupo metil galato reduziu a produção de TNF- $\alpha$  em cerca de 20% ( $164,9 \pm 34,32$  pg/mL) em relação ao grupo estimulado por carragenina ( $206,4 \pm 22,16$  pg/mL). Comparativamente, é possível verificar que o efeito do extrato de *L. ferrea* foi superior em 29% ao do seu ativo majoritário. Esse efeito pode ter relação com presença de outros polifenóis na composição do extrato (Figura 8 e Tabela 5). Além disso, em relação ao extrato de *C. sinensis*, não foi verificada redução da produção de TNF- $\alpha$  ( $237,7 \pm 16,42$  pg/mL) em relação ao grupo estimulado por carragenina.

O experimento permitiu observar que o melhor efeito redutor da produção de TNF- $\alpha$  foi observado no grupo tratado com o extrato de *L. ferrea*, essa redução foi comparável ao grupo controle indometacina ( $111,2 \pm 24,17$  pg/mL) ( $p = 0,95$ ).

Figura 16- Efeito do extrato de *L. ferrea*, metil galato e extrato de *C. sinensis* na produção de TNF- $\alpha$  no tecido subcutâneo da pata de camundongos estimulado por carragenina



CTR: controle; VEIC: veículo; ESLF: extrato seco de *Libidibia ferrea*; MG: Metil galato; CS: *Camellia sinensis*; Indo: Indometacina. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. #  $p < 0,0001$  em relação ao controle. \*  $p < 0,0001$  em relação ao controle estimulado; ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni;  $n = 3$  / grupo.

### 5.3.5 Efeito do extrato de *L. ferrea* no controle da lipoperoxidação e modulação das enzimas antioxidantes SOD e GSH utilizando o tecido subcutâneo das patas dos camundongos induzido por carragenina

A atividade antioxidante *in vivo* do extrato foi investigada através da avaliação do efeito redutor da produção de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, mensurado no tecido subcutâneo das patas de camundongos em modelo de inflamação induzido por carragenina. Verificou-se ainda a influência do componente majoritário do extrato e do extrato de *C. sinensis*, usado como referência (Figura 17).

A carragenina elevou significativamente a produção de MDA ( $41,02 \pm 2,08$  nMol/mL) em relação ao grupo controle sem a indução ( $24,55 \pm 1,72$  nMol/mL). Por sua vez, o grupo tratado com o ESLF (200 mg/kg) reduziu significativamente a formação de malondialdeído ( $31,41 \pm 6,49$  nMol/mL) em relação ao grupo induzido por carragenina ( $41,02 \pm 2,08$  nMol/mL) ( $p = 0,0001$ ).

O grupo de animais que receberam a dose de metil galato 7 mg/kg apresentaram valores de redução ( $29,52 \pm 1,54$  nMol/mL) estatisticamente comparáveis ao ESLF 200 mg/kg ( $p = 0,59$ ). Salienta-se que a dose de 7 mg/kg de

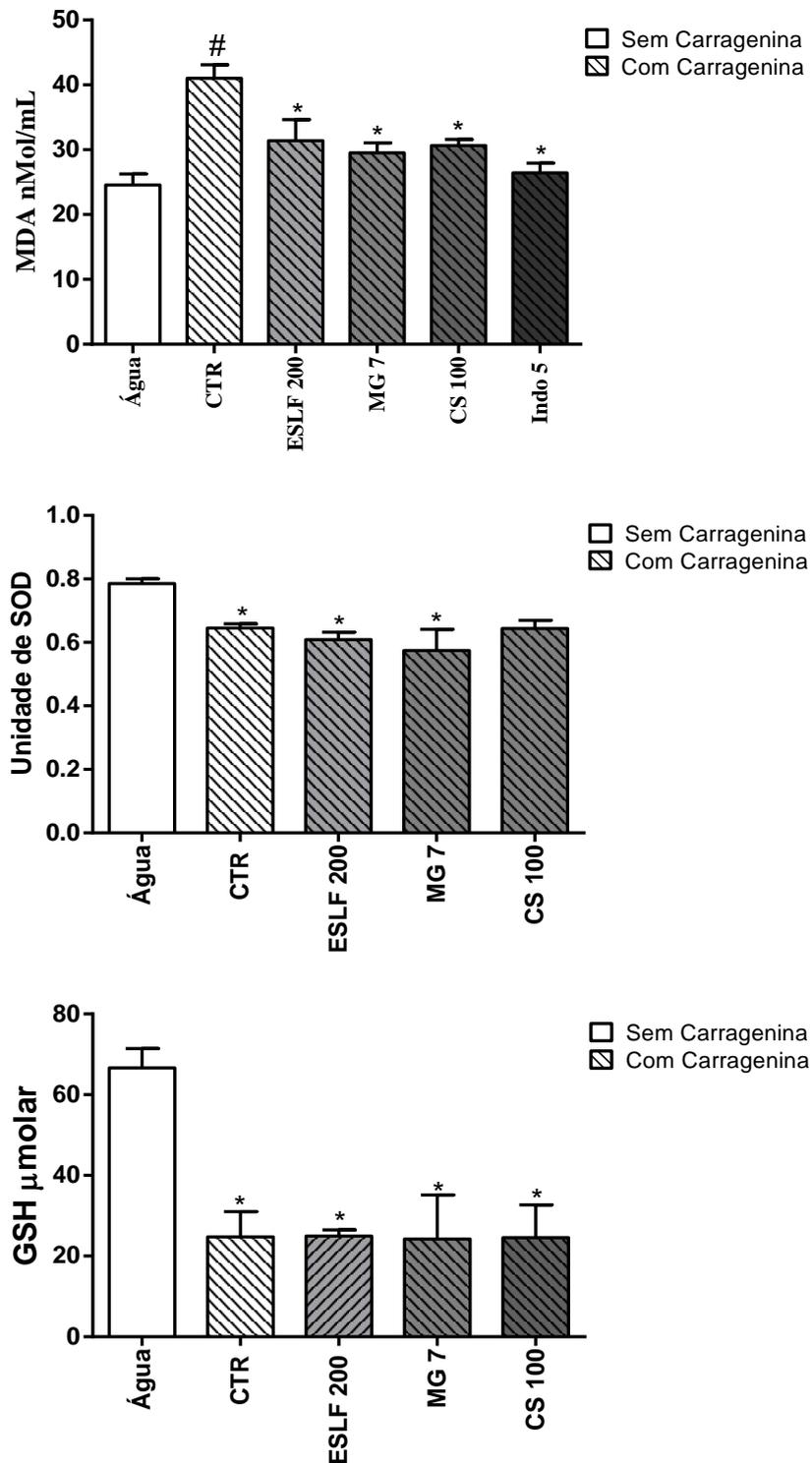
metil galato corresponde a quantidade do ativo presente em 200mg/kg do ESLF. Verificou-se ainda que o grupo *C. sinensis* 100 mg/kg apresentou valor de redução de MDA ( $30,66 \pm 0,95$  nMol/mL) comparável ao extrato de *L. ferrea* ( $p = 0,83$ ). Ademais, os grupos ESLF, metil galato e *C. sinensis* foram estatisticamente comparáveis ao padrão indometacina 5 mg/kg ( $26,45 \pm 1,50$  nMol/mL) ( $p = 0,30$ ).

Dando continuidade a avaliação *in vivo* da atividade antioxidante, verificou-se o potencial do ESLF (200 mg/kg), metil galato e o extrato de *C. sinensis* na modulação das enzimas antioxidantes SOD e GSH no tecido subcutâneo das patas de camundongos induzido por carragenina.

O grupo sem estímulo apresentou níveis de SOD ( $0,785 \pm 0,03$  Un. de SOD) superiores ao grupo estimulado por carragenina. ( $0,645 \pm 0,01$  Un. De SOD). Além disso, os grupos tratados com jucá 200 mg/kg e metil galato 7 mg/kg apresentaram equivalência estatística entre si ( $p = 0,64$ ) e foram significativamente diferentes do grupo controle sem estímulo ( $p = 0,0083$ ). O extrato de *C. sinensis* apresentou níveis mais elevados de SOD ( $0,64 \pm 0,02$  unidades de SOD).

Em relação a atividade da enzima GSH, observou-se algo semelhante aos achados do extrato, metil galato e do extrato de *C. sinensis* na atividade de SOD. Os níveis da enzima foram superiores no grupo controle ( $66,65 \pm 4,81$   $\mu$ Molar) em relação ao grupo induzido por carragenina ( $24,78 \pm 6,25$   $\mu$ Molar). O ESLF 200 mg/kg, metil galato 7 mg/kg e o extrato de *C. sinensis* apresentaram valores próximos entre si ( $24,96 \pm 1,50$   $\mu$ Molar,  $24,23 \pm 10,91$   $\mu$ Molar e  $24,60 \pm 8,13$   $\mu$ Molar, respectivamente) e apresentaram equivalência estatística com o grupo veículo induzido por carragenina ( $p = 0,99$ ).

Figura 17- Teores de malondialdeído e nas enzimas antioxidantes SOD e GSH no tecido subcutâneo de patas de camundondos pré-tratados com extrato de *L. ferrea*, metil galato, e extrato de *C. sinensis*.

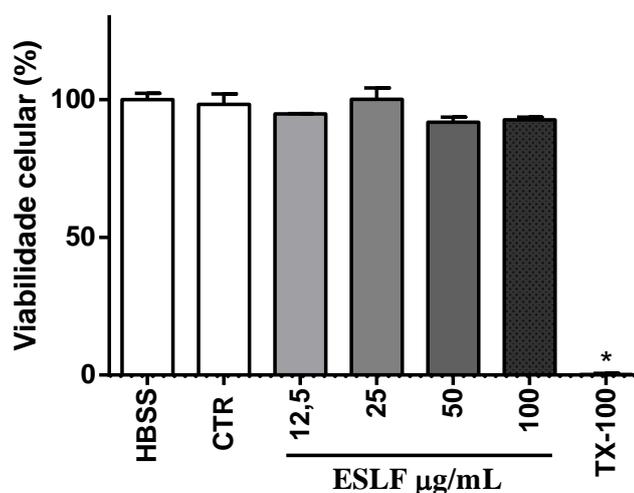


MDA: malondialdeído, CTR: controle; VEIC: veículo; ESLF: Extrato seco das folhas de *Libidibia ferrea*; metil galato; CS: *Camellia sinensis*; indo: indometacina. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. # p < 0,0001 em relação ao controle. \* p < 0,0001 em relação ao controle estimulado; ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni; n = 3 / grupo.

### 5.3.6 Extrato seco de *L. ferrea* não altera o metabolismo de neutrófilos através do ensaio do MTT

A figura 18 mostra o percentual de viabilidade celular de neutrófilos pré-tratados com o ESLF através da avaliação desse extrato no metabolismo mitocondrial. O valor da média do grupo HBSS ( $100 \pm 2,33\%$ ) ficou próximo ao grupo controle água ( $98,29 \pm 3,81\%$ ), além disso, todas as doses testadas do extrato não difeririam estatisticamente entre si e quando comparado aos grupos controle e HBSS ( $p = 0,1519$ ). Todas as doses avaliadas do extrato de *L. ferrea* apresentaram diferença estatística quando comparadas ao padrão citotóxico Triton X-100 ( $0,25 \pm 0,38\%$ ) ( $p = 0,0001$ ).

Figura 18- Efeito do extrato de *L. ferrea* sobre o metabolismo mitocondrial de neutrófilos humanos (ensaio do MTT)



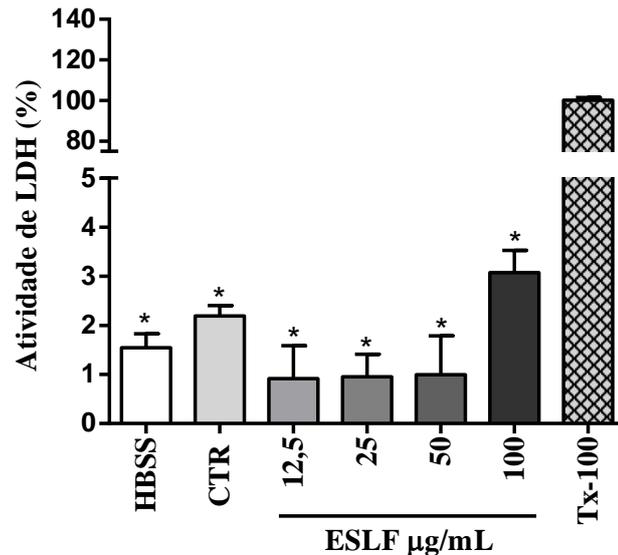
HBSS: solução salina equilibrada de Hank; CTR: Controle; ESLF: Extrato seco de *Libidibia ferrea*; TX-100: Triton x-100. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs HBSS ( $p < 0,0001$ , ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni)  $n = 3$  / grupo.

### 5.3.7 Extrato seco de *L. ferrea* não interfere na atividade da enzima LDH

A figura 19 mostra o efeito do ESLF sobre a viabilidade de neutrófilos humanos, os quais foram mensurados através da atividade da enzima LDH. O grupo controle água ( $2,19 \pm 0,21\%$ ) não alterou a atividade da enzima em relação ao grupo HBSS ( $1,54 \pm 0,28\%$ ). O pré-tratamento com as doses de ESLF permaneceu com

valores próximos ao controle água. O grupo citotóxico Triton X-100 elevou de forma significativa a atividade da LDH ( $100 \pm 1,31\%$ ) em relação aos demais grupos ( $p = 0,00001$ ).

Figura 19- Efeito do extrato seco de *L. ferrea* na viabilidade de neutrófilos humanos através da mensuração da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

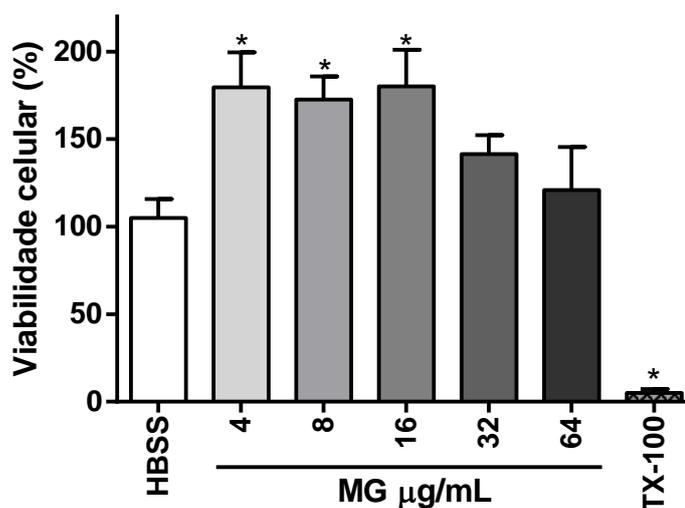


ESLF: Extrato seco de *Libidibia ferrea*; CTR: Controle. TX-100: Triton X-100, HBSS: Solução salina balanceada de Hank. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs Triton X-100 ( $p < 0,0001$ , ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni)  $n = 3$  / grupo.

### 5.3.8 Efeito do metil galato no metabolismo de neutrófilos através do ensaio do MTT

A figura 20 mostra o percentual de viabilidade celular de neutrófilos pré-tratados com o componente majoritário do ESLF, metil galato, através da avaliação desse extrato no metabolismo mitocondrial. Os neutrófilos não tiveram suas viabilidades reduzidas após pré-tratamento com as doses 4, 8, 16, 32 e 64  $\mu\text{g/mL}$  do metil galato. Comparativamente, o grupo citotóxico tratado com Triton X-100 ( $5,04 \pm 2,17\%$ ) foi significativamente diferente dos demais grupos avaliados ( $p = 0,00001$ ).

Figura 20- Efeito do metil galato sobre o metabolismo mitocondrial de neutrófilos humanos (ensaio do MTT)



MG: metil galato; TX-100: Triton X-100; HBSS: Solução salina balanceada de Hank. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs HBSS ( $p < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni)  $n = 3$  / grupo.

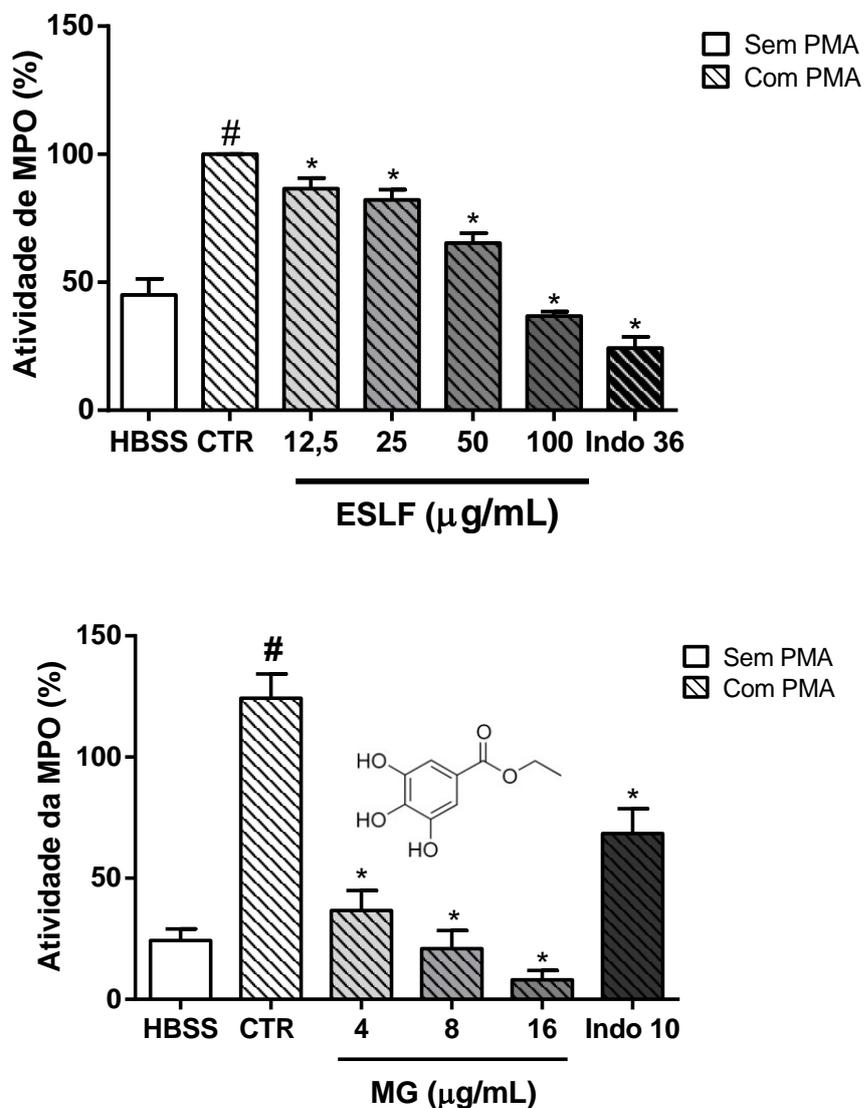
### 5.3.9 Efeito do extrato seco de *L. ferrea* e metil galato na redução da degranulação da enzima MPO de neutrófilos humanos estimulados por PMA

O potencial anti-inflamatório do ESLF foi avaliada através de sua influência na atividade da enzima mieloperoxidase de neutrófilos humanos estimulados por PMA (Figura 21). A atividade da MPO do grupo de células tratados com PMA ( $100 \pm 0,004\%$ ) foi elevada em aproximadamente duas vezes em comparação com a atividade da enzima no grupo controle ( $45,05 \pm 6,31\%$ ) ( $p < 0,0001$ ). A concentração  $100 \mu\text{g/mL}$  reduziu a atividade de MPO em  $62,91 \pm 3,03\%$ . Além disso, a concentração  $100 \mu\text{g/mL}$  foi estatisticamente comparável com o padrão indometacina ( $36 \mu\text{g/mL}$ ) ( $p = 0,0592$ ).

A partir dos resultados do ESLF, foi possível verificar que o componente majoritário do extrato, metil galato, pode ter influenciado na atividade da MPO. A concentração  $4 \mu\text{g/mL}$  é correspondente a quantidade de metil galato presente em  $100 \mu\text{g/mL}$  ESLF, concentração que mostrou o melhor resultado de redução da atividade de MPO. As demais concentrações crescentes de metil galato usadas no experimento foram escolhidas para investigação se o efeito na redução da atividade de MPO poderia ser dependente da dose de metil galato. Observou-se que a

atividade da MPO do grupo de células tratados com PMA foi elevada em cerca de cinco vezes em comparação com a atividade da enzima no grupo controle ( $p < 0,0001$ ). A concentração 4  $\mu\text{g/mL}$  reduziu  $70,5 \pm 8,28\%$  a atividade da enzima comparado ao grupo estimulado. A maior redução foi observada na concentração 16  $\mu\text{g/mL}$  ( $93,5 \pm 3,87\%$ ). É importante destacar que todas as concentrações avaliadas de metil galato reduziram a atividade de MPO de forma mais eficiente do que o padrão indometacina 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 21- Efeito do extrato de *L. ferrea* e metil galato na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos humanos induzida por PMA



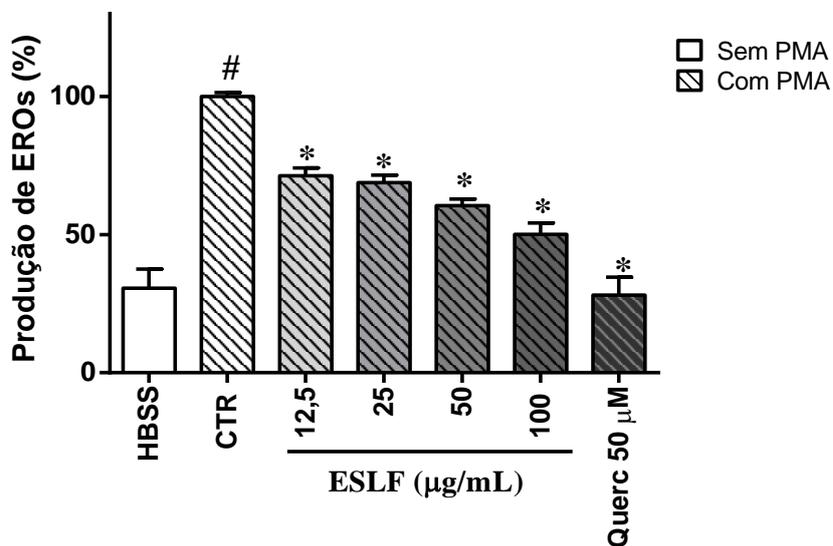
MPO: Mieloperoxidase, CTR: controle, HBSS: solução salina balanceada de Hank; ESLF: extrato seco de *Libidibia ferrea*; MG: Metil galato; Indo: Indometacina. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. #

p <0,001 em relação a HBSS. \* p <0,0001 em relação ao controle; ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni; n = 3 / grupo.

### 5.3.10 Atividade do extrato de *L. ferrea* na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos estimulados por PMA

A figura 22 apresenta o percentual de formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos após pré-tratamento com o ESLF. O grupo de células estimuladas por PMA, mas não tratadas com o extrato elevou em 70% a produção de EROs em relação ao grupo controle sem estímulo (p < 0,0001). As concentrações avaliadas do ESLF foram significativamente diferentes em relação ao controle estimulado com PMA (p < 0,0001). As maiores reduções da produção foram observadas nos grupos tratados com as concentrações 50 e 100 µg/mL (40 ± 7,05 e 50 ± 11,63% de redução, respectivamente). Observou-se uma tendência na redução da produção de espécies reativas relacionada ao aumento da concentração do extrato.

Figura 22- Efeito do extrato seco de *L. ferrea* na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos estimulados por PMA

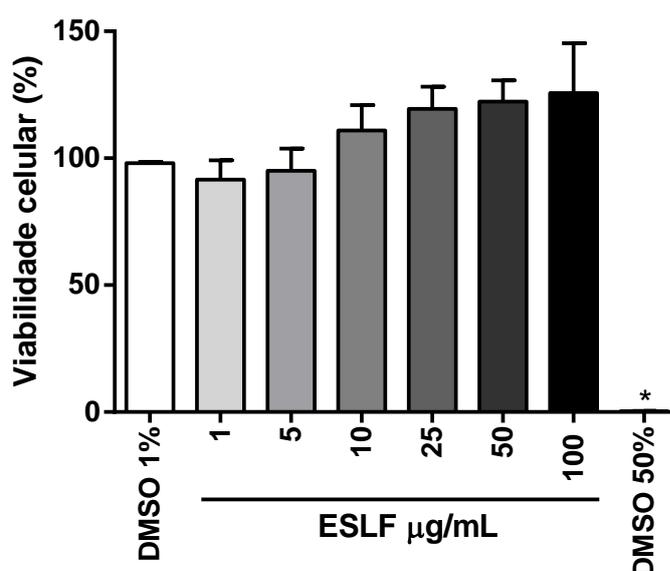


EROs: Espécies reativas de oxigênio; CTR: controle; VEIC: veículo; ESLF: Extrato seco de *Libidibia ferrea*; Querc: quercetina. Os valores representam a média ± erro padrão da média. # diferença em relação ao controle. \* p <0,0001 em relação ao controle estimulado com PMA; ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni; n = 3 / grupo.

### 5.3.11 Extrato seco de *L. ferrea* não altera o metabolismo de micróglias através do ensaio do MTT

OS valores percentuais da viabilidade de micróglias após pré-tratamento com o ESLF estão apresentados na figura 13. A população de micróglias pré-tratados com o extrato de *L. ferrea* em diferentes concentrações manteve a viabilidade próxima a 100%. Não houve alterações significativas na viabilidade celular influenciada pelo metabolismo mitocondrial quando comparado ao controle DMSO 1% ( $98 \pm 0,57\%$  de viabilidade e  $p = 0,1689$ ). O grupo citotóxico DMSO 50% apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos ( $p = 0,00001$ ) (Figura 23).

Figura 23- Efeito do extrato de *L. ferrea* sobre o metabolismo mitocondrial de micróglias BV2 (ensaio do MTT)



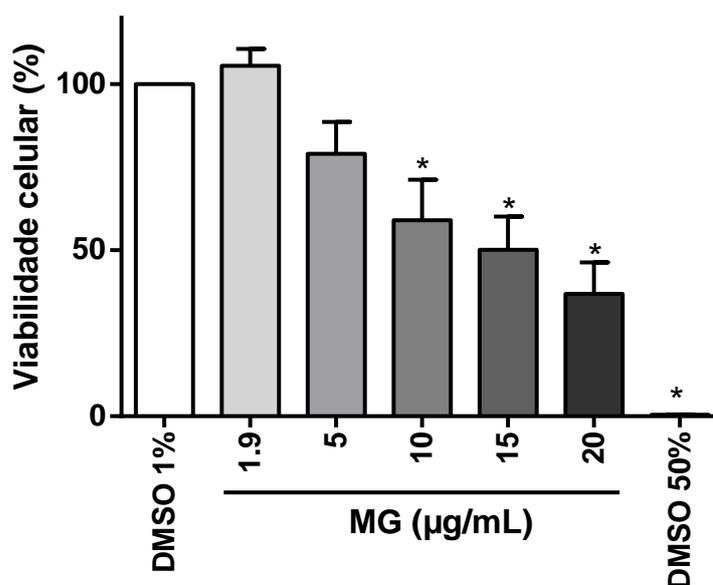
ESLF: Extrato seco de *Libidibia ferrea*. DMSO: dimetilsulfóxido. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs DMSO 1% ( $p < 0,0001$ , ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni)  $n = 3$  / grupo.

### 5.3.12 Efeito do metil galato no metabolismo de micróglias através do ensaio do MTT

As concentrações avaliadas do padrão metil galato variaram em relação ao percentual de viabilidade celular. As concentrações 1,9  $\mu\text{g/mL}$  ( $105,6 \pm 5,09\%$ ) e

5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $79,01 \pm 9,64\%$ ) foram estatisticamente comparáveis ao controle DMSO 1% ( $p = 0,053$ ). As demais concentrações 10, 15 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  reduziram a viabilidade das micróglias com uma tendência a redução dependente da dose (Figura 24).

Figura 24- Efeito do metil galato sobre o metabolismo mitocondrial de micróglias BV2 (ensaio do MTT)



MG: metil galato; DMSO: dimetilsulfóxido. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs DMSO 1% ( $p < 0,005$ , ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni)  $n = 3$  / grupo.

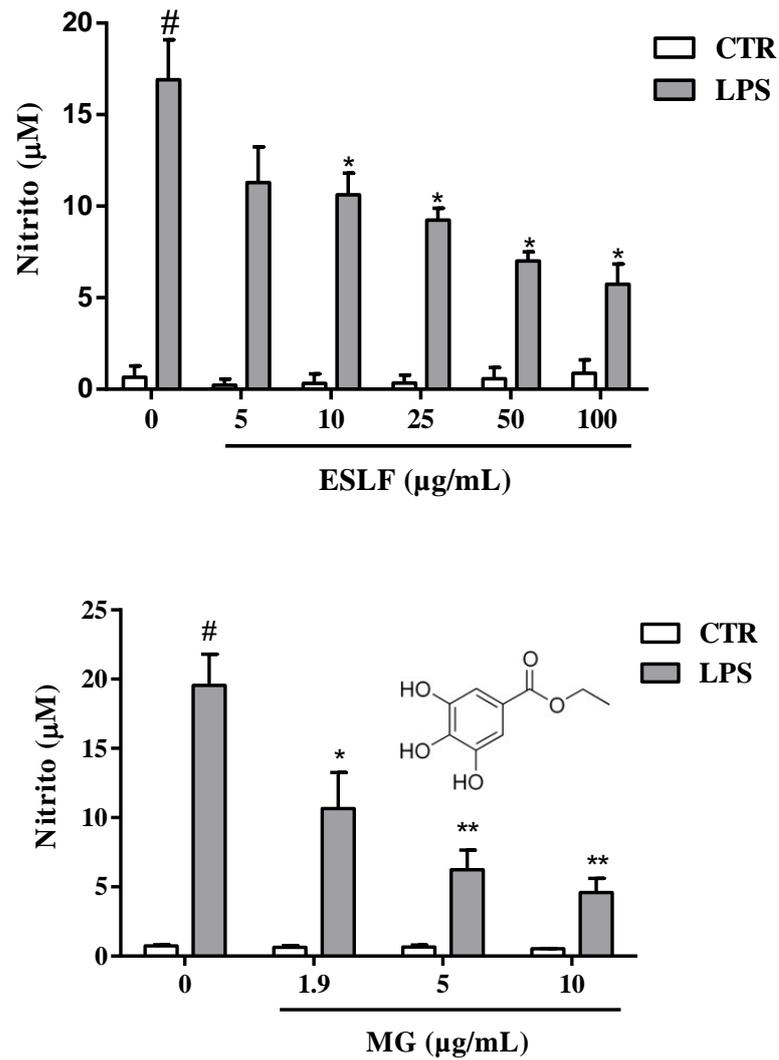
### 5.3.13 Efeito do extrato seco de *L. ferrea* e metil galato na redução da produção de nitrito por micróglias estimuladas por LPS

O nitrito é um mediador liberado em processos inflamatórios. Avaliamos a atividade do pré-tratamento de micróglias, estimuladas por LPS, com o ESLF e metil galato na liberação desse mediador (Figura 25). O grupo LPS elevou de forma acentuada a liberação de NO ( $16,92 \pm 2,17 \mu\text{M}$ ). O tratamento de células com ESLF (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) antes da estimulação com LPS reduziu significativamente a liberação de NO para o meio quando comparado ao grupo estimulado ( $p = 0,0017$ ). Observamos também que houve redução da liberação de NO com o aumento da concentração do ESLF. As concentrações 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  não diferiram estatisticamente ( $p = 0,3579$ ).

Em relação ao metil galato. Observou-se que o grupo LPS ( $19,55 \pm 2,24 \mu\text{M}$ ) elevou de forma significativa a produção de nitrito em relação ao grupo não tratado ( $0,74 \pm 0,08 \mu\text{M}$ ) ( $p = 0,0254$ ). O pré-tratamento com o padrão metil galato

1,9  $\mu\text{g/mL}$  ( $10,66 \pm 2,59 \mu\text{M}$ ) reduziu a liberação de NO de forma significativa ( $p = 0,04$ ). Acompanhando os dados da concentração 1,9  $\mu\text{g/mL}$ , as concentrações 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $6,23 \pm 1,41 \mu\text{M}$ ) e 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $4,58 \pm 1,02 \mu\text{M}$ ) reduziram significativamente a produção de nitrito em relação ao grupo estimulado.

Figura 25- Produção de nitrito em micróglias estimuladas por LPS após pré-tratamento com ESLF e metil galato

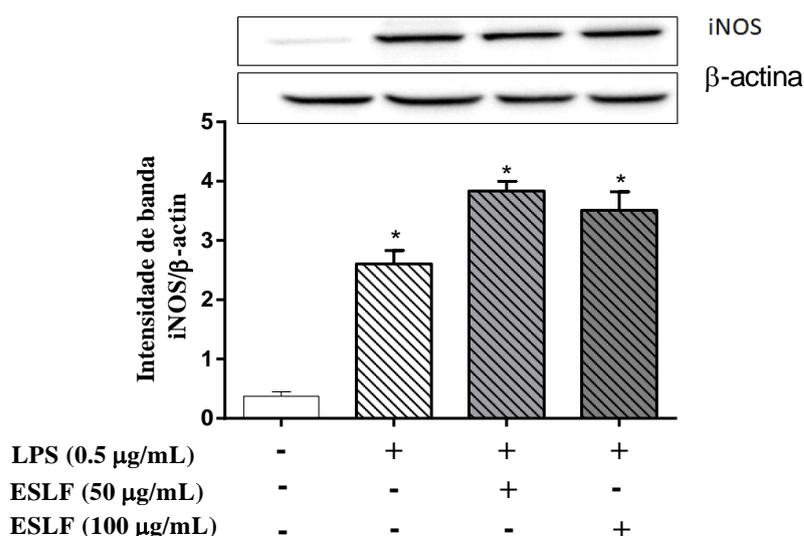


ESLF: Extrato liofilizado das folhas de *Libidibia ferrea*. MG: metil galato; CTR: controle, LPS: lipopolissacarídeo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. #  $p < 0,0001$  em relação ao controle (0) \*  $p < 0,01$  em relação ao controle estimulado (LPS-0); ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni;  $n = 3$  / grupo.

### 5.3.14 Extrato de *L. ferrea* não interfere na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em micróglia estimulado por LPS

Nesse ensaio investigou-se se a redução da produção de óxido nítrico pelo ESLF estaria relacionada a ação sobre a enzima responsável pela sua biossíntese (iNOS). A indução do estado inflamatório foi evidenciada através do aumento da expressão da proteína no grupo estimulado por LPS elevou (2,60 iNOS/b-actin) em relação ao grupo controle não estimulado (0,37 iNOS/b-actin) ( $p < 0,0001$ ). A figura 26 pode-se observar que o pré-tratamento com as concentrações 50  $\mu\text{g/mL}$  (3,83 iNOS/b-actin) e 100  $\mu\text{g/mL}$  (3,51 iNOS/b-actin) não reduziu a intensidade das bandas em relação ao grupo LPS, o que significa que não houve redução da expressão de iNOS nas concentrações avaliadas.

Figura 26- Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de micróglia induzida por LPS



LPS: lipopolissacarídeo; ESLF: extrato seco de *Libidibia ferrea*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,0001$  em relação ao controle sem estímulo de LPS. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni;  $n = 3$  / grupo.

### 5.3.15 Efeito do extrato de *L. ferrea* sobre os níveis das interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ em micróglia BV2 estimulado por LPS

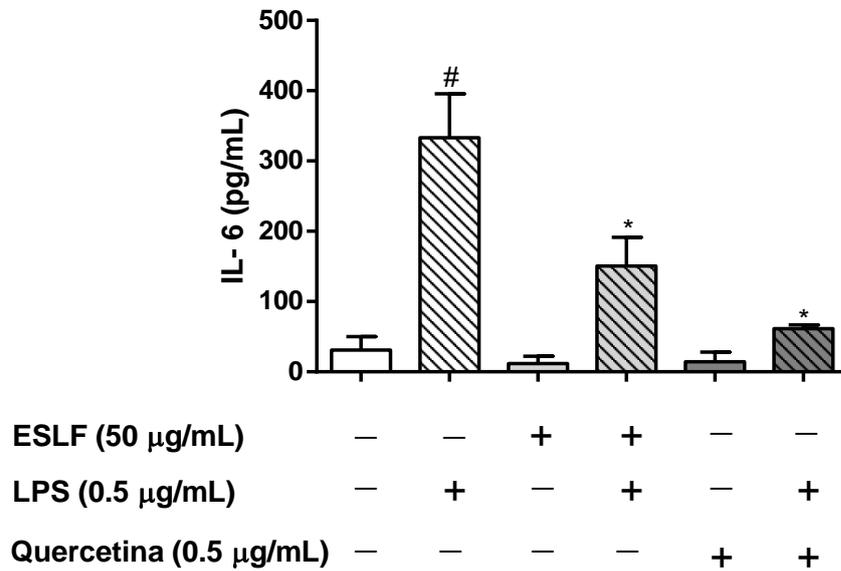
O grupo de células estimuladas por LPS elevou a produção de IL-1 $\beta$  nas micróglia (28,70  $\pm$  2,28 pg/mL) em aproximadamente duas vezes em comparação com o grupo não tratado (16,67  $\pm$  1,81 pg/mL). Porém, diferente da quercetina,

fármaco de referência ( $1,38 \pm 0,69$  pg/mL), o ESLF não reverteu ou reduziu a produção dessa citocina em relação ao grupo LPS.

A adição do LPS às células aumentou em torno de dez vezes a produção da citocina IL-6 ( $333,0 \pm 62,52$  pg/mL) em relação ao grupo não tratado ( $31,13 \pm 19,14$  pg/mL), e em 18 vezes a produção de TNF- $\alpha$  ( $404,70 \pm 80,35$  pg/mL) em relação ao grupo não tratado com LPS ( $21,59 \pm 3,90$  pg/mL).

O pré-tratamento das micróglia com o ESLF ( $50$   $\mu$ g/mL) reduziu significativamente a produção de IL-6 ( $150,80 \pm 40,56$  pg/mL) em relação ao grupo controle estimulado com LPS ( $p < 0,0001$ ). O mesmo não pode ser observado em relação a liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após pré-tratamento com o ESLF ( $50$   $\mu$ g/mL), os quais não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo estimulado com LPS. A produção de IL-6 nos grupos tratados com ESLF e quercetina, estimulados com LPS, apresentaram equivalência estatística. Observou-se ainda que a adição *per si* do extrato influenciou na redução da produção de IL-6 ( $11,75 \pm 10,44$  pg/mL) em comparação com o grupo sem a adição do LPS ( $31,13 \pm 19,14$  pg/mL) (Figura 27).

Figura 27- Efeito do extrato de *L. ferrea* na produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em micróglia estimulado por LPS



ESLF: Extrato seco das folhas de *Libidibia ferrea*; LPS: lipopolissacarídeo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. #  $p < 0,0001$  em relação ao controle. \*  $p < 0,0001$  em relação ao controle estimulado; ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni;  $n = 3$  / grupo.

## 6 DISCUSSÃO

A presente pesquisa avaliou o potencial do extrato seco das folhas de *Libidibia ferrea* (ESLF) como um ingrediente funcional, dando, portanto, prosseguimento à estudos anteriores realizados pelo nosso grupo (CHAGAS-NETO, 2018). A caracterização química do ESLF comprovou a presença de fenóis na planta, mostrando um teor comparável à *C. sinenes* (chá-verde), uma espécie vegetal muito explorada pela indústria alimentícia como um ingrediente funcional. Além disso, determinou-se o grau de segurança pré-clínica (toxicidade dose única e toxicidade doses repetidas), bem como a determinação das atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*.

Ingredientes funcionais são um grupo diversificado de compostos bioativos, geralmente extraídos de fontes naturais, que dispõem de valor nutricional e produzem efeitos positivos a saúde de quem os consome (FERNANDES; COELHO; SALAS-MELLADO, 2019). Possuem elementos de medicamentos, de nutrientes e de aditivos alimentares, o que torna os ingredientes funcionais produtos versáteis que podem ser consumidos sozinho ou fazer parte da composição de diferentes matrizes alimentares (KRUGER; MANN, 2003). Em estudo anterior (CHAGAS-NETO, 2018), o nosso laboratório desenvolveu o ESLF, que se mostrou uma fonte promissora de nutrientes essenciais como ferro (21,65 mg/100g) e zinco (31,52 mg/100g), afora a presença de fenóis e proteínas. Dessa forma, dando prosseguimento, no presente estudo o ESLF foi caracterizado fisicamente em relação ao seu tamanho, cor, umidade, solubilidade em água e propriedades de fluxo. As partículas do ESLF mostraram-se heterogêneas quanto ao tamanho (<250 – 500  $\mu\text{m}$ ). Esse dado foi ratificado por estudos anteriores (BRUNAUGH; WU; KANAPURAM; SMYTH, 2019; XIN et al., 2022), que mostraram que extratos secos obtidos por liofilização possuem tamanho heterogêneo e formato amorfo (BRUNAUGH; WU; KANAPURAM; SMYTH, 2019; XIN et al., 2022).

O ESLF apresentou um índice de umidade dentro dos limites estabelecidos pela farmacopeia brasileira (BRASIL, 2019), no entanto salienta-se que por ser higroscópico, é importante que o extrato seja mantido em um ambiente com baixa umidade. Além disso, pode ser avaliada a necessidade da adição de adjuvantes de secagem ao extrato.

A hidrossolubilidade do ESLF confere ao mesmo a possibilidade de ser usado na constituição de alimentos com matriz aquosa como sucos e iogurtes, por exemplo. O ESLF mostrou-se um pó com fluxo de interesse, o que o torna um insumo em potencial na produção de formas farmacêuticas como comprimidos e cápsulas. Pós usados como ativo ou excipiente nesses tipos de forma farmacêutica devem possuir propriedades de fluxo aceitáveis (fator de Hausner entre 1.00 e 1.34), o fluxo adequado de pó permite uma relação volume-massa constante e por conseguinte mantém a uniformidade de conteúdo de formas farmacêuticas como comprimidos e cápsulas (SVONJA-PAREZANOVIC et al. 2019).

As plantas constituem uma das fontes naturais mais promissoras de moléculas bioativas. Portanto, é imprescindível a caracterização química de produtos derivados de plantas, como extratos vegetais. O ESLF mostrou um teor de compostos fenólicos expressivo (273 mg EAG/g), superior ao extrato vegetal comercial das folhas de *C. sinensis* (157,5 mg EAG/g), que está entre as espécies mais exploradas pela indústria alimentícia como ingrediente funcional. A riqueza das folhas de *L. ferrea* em polifenóis foi evidenciada também por Port's et al. (2013). Os autores avaliaram o teor de fenóis e o potencial antioxidante de nove espécies vegetais oriundas da Amazônia e verificaram que o extrato utilizando as folhas de *L. ferrea* obteve os maiores níveis de compostos fenólicos (68,13 mg EAG/g) em relação as demais espécies avaliadas. Nesse contexto, pode ser observado que o ESLF desenvolvido pelo nosso laboratório tem mostrado maior eficiência quanto ao teor de fenóis totais em relação ao estudo citado. Esse maior teor de fenóis no ESLF pode estar associado a tecnologia que empregamos no seu desenvolvimento (CHAGAS-NETO, 2018), porém os ambientes distintos de coleta da planta também devem ser considerados.

Estudos têm mostrado o papel importante de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, taninos e cumarinas na prevenção e tratamento de distúrbios como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cânceres (REBOREDO-RODRÍGUEZ et al., 2018; RENAUD; MARTINOLI, 2019). Um estudo de coorte prospectivo publicado no ano de 2019 acompanhou 53552 participantes, durante um tempo médio de 21 anos, mostrou que a ingestão de polifenóis da classe dos flavonoides (1000 mg/dia) foi associada a um risco 14% menor de doença cardiovascular aterosclerótica, 9% menos risco de doença cardíaca isquêmica e 32% menos risco de doença arterial periférica (DALGAARD et al., 2019). Outras

pesquisas observaram o potencial antiproliferativo e indutor da autofagia tumoral, de polifenóis de outras classes como ácidos fenólicos, estilbenos e proantocianidinas no tratamento do câncer de pulmão e de mama (DUAN et al., 2018; GAO; TOLLEFSBOL, 2018).

Desse modo, além da determinação do teor de polifenóis no ESLF, a caracterização das principais classes e dos componentes majoritários no mesmo é de fundamental importância pois essa informação será útil para futura correlação com atividades biológicas de novos ingredientes funcionais.

Analisando o cromatograma e os espectros de massa dos componentes do ESLF, pode ser observado 18 picos, dos quais nove foram identificados. O componente majoritário, metil galato, ácido quínico, três representantes dos flavonoides (apigenina, orientina e isoorientina), três ácidos graxos, ácido elágico e três derivados do ácido elágico. A identificação das moléculas foi realizada baseada nos espectros de massa de cada pico, com os quais foi possível avaliar a estrutura molecular através da análise de íons precursores e o perfil de quebra de massa de cada composto. Além disso, para alguns compostos do extrato foram feitas comparações do perfil dos espectros de massa com o espectro de massa de padrões puros para certificar a identificação correta da substância e para outros a identificação foi confirmada através de comparação dos espectros de massa com a literatura científica, como foi o caso do componente majoritário metil galato (FARAG et al., 2015), orientina e isoorientina (KRASTEVA; NIKOLOV, 2008), apigenina galoil glicosídeo (LI et al., 2016) e os ácidos graxos ácido tri-hidroxi-octadecadienóico, ácido tri-hidroxi-octadecaenóico e ácido di-hidroxi-hexadecanóico (AGUIAR GALVÃO et al., 2018). Os três derivados do ácido elágico apresentaram padrões de fragmentação parecidos com o ácido elágico, no entanto a análise do espectro de massa não permitiu inferir com segurança a identificação desses compostos.

A presença da orientina e do ácido elágico no extrato das folhas de *L. ferrea* já havia sido descrita por outros autores (DA COSTA et al., 2015; NAWWAR et al. 2015; FALCÃO et al., 2019). No entanto, é importante destacar que o presente trabalho identificou pela primeira vez o metil galato nas folhas de *L. ferrea*, o qual é o componente majoritário do extrato produzido. O metil galato foi quantificado através de técnica cromatográfica (HPLC-DAD) com teor obtido de 38,15 µg/mg.

Estudos mostraram que polifenóis identificados no extrato de *L. ferrea* como metil galato e orientina, possuem propriedades antioxidante, anti-inflamatória,

moduladora do perfil lipídico e neuroprotetora (RAHMAN; JEON; KIM, 2016; LAM et al., 2016; SHARIFI-RAD et al., 2022). Vale ressaltar, no entanto, que alguns compostos identificados podem causar riscos quanto a segurança de uso. Pesquisas anteriores mostraram que a apigenina e o metil galato são antiproliferativos (MAMAT et al. 2020; KORGA et al., 2019). A apigenina, por exemplo, pode elevar o efeito tóxico da doxorubicina contra células HepG2 (KORGA et al., 2019). Portanto, é pertinente a avaliação da toxicidade de extrato para estudos que avaliam novos ingredientes funcionais.

O estudo da toxicidade do extrato de *L. ferrea* foi realizado através da administração do extrato do jucá em dose única e em dose repetida, utilizando camundondos swiss. Estudos pré-clínicos de toxicidade em animais são realizados para predição dos potenciais efeitos adversos que um novo produto poderá ocasionar em testes clínicos posteriores. É importante reforçar que, segundo a RDC 17 e do guia 23 da ANVISA, a avaliação da toxicidade em pesquisas de novos alimentos e medicamentos e sua avaliação é indispensável para evitar futuros riscos à saúde (BRASIL, 1999, 2019).

No presente estudo nenhuma das doses do extrato de *L. ferrea* administradas de forma aguda foi letal para os animais. Em relação a avaliação da toxicidade em dose única, a maior dose (2000 mg/Kg) não causou alterações significativas em nenhum parâmetro comportamental ou bioquímico do sangue, até 14 dias após o tratamento dos animais. Portanto estima-se que a DL<sub>50</sub>, dose responsável pela morte de 50% dos animais, esteja acima de 2000 mg/Kg. Segundo o “Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals” (GHS), organismo internacional responsável pela classificação da segurança de drogas e outros produtos químicos, para esse modelo o extrato de *L. ferrea* é classificado como categoria 5, na qual o risco para o consumo oral é considerado baixo (UNITED NATIONS, 2019).

A avaliação da toxicidade do ESLF, mediante a administração de dose única, nos parâmetros hematológicos mostrou o efeito do extrato sobre o sistema hematopoiético. A administração das doses de jucá 300, 1000 e 2000 mg/Kg provocou uma redução significativa de hemácias em comparação com o grupo controle. A quantidade de leucócitos e plaquetas não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle, dando indícios de que o extrato não ocasionou nenhuma infecção ou poderia facilitar hemorragias associadas a

mecanismos de agregação plaquetária. Apesar de a contagem de segmentados mais elevada e a de linfócitos mais reduzida significativamente (ESLF: 1 e 2 g/Kg, v.o.) em comparação ao grupo controle, foi visto que os valores desses parâmetros se mantiveram dentro do intervalo de normalidade para a espécie e o gênero de animais usado na pesquisa, segundo estudo desenvolvido na UFC (LIMA, 2018).

Em relação ao perfil lipídico, observou-se a elevação do teor de colesterol em todos os grupos (ESLF e controle) após o período de 14 dias do experimento, quando comparado ao início do estudo (dia 0). No caso dos grupos que receberam o ESLF, essa elevação pode estar relacionada ao anabolismo lipídico no fígado em decorrência do consumo de ácidos graxos componentes do extrato como o ácido tri-hidroxiocadecadienóico e o ácido tri-hidroxiocadecaenóico (YEH et al., 2018). No entanto, não foram observadas variações estatísticas quando comparado ao grupo controle, o que pode indicar que o incremento no valor possa também estar associado a nutrição consumida pelos animais durante o período do estudo.

A administração em dose única do extrato de *L. ferrea* não influenciou nos teores de glicose, parâmetro que avalia o metabolismo de carboidratos. Estudos etnofarmacológicos relataram o uso das folhas e cascas de *L. ferrea* como hipoglicemiante (VASCONCELOS et al., 2011; HASSAN et al., 2015). Os autores constataram que o extrato hidroetanólico das folhas de *L. ferrea* reduziu significativamente a glicose sérica e elevou o nível de insulina no sangue (HASSAN et al., 2015).

A ureia é um composto produzido no fígado e cuja excreção renal é de cerca de 90%. Alterações no doseamento desse biomarcador podem estar associados a patologias ou intoxicações que interferem diretamente no correto funcionamento das funções hepáticas e nas taxas normais de filtração glomerular (INKER; LEVEY, 2019). Os resultados do doseamento não revelaram alterações significativas nas taxas de ureia após a administração aguda das três concentrações do extrato em relação ao grupo controle. O que sugere que o extrato não foi tóxico para esse sistema e não comprometeu a função glomerular renal.

A função hepática foi avaliada ainda através do doseamento das transaminases ALT e AST. Essas enzimas são encontradas nos hepatócitos e sua elevação anormal está associada ao extravasamento devido a lesões celulares com posterior migração do conteúdo para a corrente sanguínea (BAI et al., 2001). O fígado é responsável pela metabolização, digestão, síntese e armazenamento de

compostos, o comprometimento desse órgão pode levar a uma série de complicações como a esteatose, cirrose e o câncer hepatocelular (MANTOVANI et al., 2020). Através do doseamento das transaminases foi possível concluir que as doses administradas do ESLF não alteraram as taxas normais desses biomarcadores, dando indícios, a nível bioquímico sobre a segurança do uso do extrato frente a esse sistema.

Esses dados orientaram o estudo da toxicidade doses repetidas do ESLF em camundongos, administrado por via oral durante 28 dias para avaliação da possível toxicidade em um período de uso maior. Mais uma vez não foi observada a morte de nenhum animal após o período do estudo. Além disso, o peso dos animais evoluiu no decorrer das semanas sem grandes variações. Uma agitação transitória foi percebida no primeiro dia do início do tratamento com o ESLF, mas após 30 minutos os animais retornaram ao comportamento anterior a administração do extrato. No mais, não foram evidenciados sinais clínicos que indicassem algum efeito tóxico como letargia, agitação, diarreia e piloereção, por exemplo, reforçando a tese de que o extrato apresenta segurança para o consumo.

Verificou-se que o valor de hemácias após 28 dias foi comparável ao grupo controle, o que indica que a anemia observada na avaliação da toxicidade em dose única foi transitória. Foi observada uma redução significativa de neutrófilos após o período do estudo na administração das três doses do extrato em comparação com o grupo controle, no entanto o quantitativo dessas células é considerado normal para essa espécie (LIMA, 2018). A quantidade de plaquetas foi reduzida significativamente nas concentrações 30 e 300 mg/Kg do extrato em relação ao grupo controle, no entanto, segundo estudo de Lima (2018), realizado com camundongos da Universidade Federal do Ceará, esses valores encontram dentro da faixa de normalidade para a espécie e gêneros. Salienta-se, no entanto que, pesquisas concluíram que componentes do extrato como metil galato e o ácido elágico reduziram a ativação de plaquetas (ATILLIO et al., 2010; LEE et al., 2014). Além disso, é sabido que alguns flavonoides são potenciais inibidores da função plaquetária. Orientina e isoorientina inibem a polimerização da fibrina e as atividades e produções de trombina e fator Xa (LEE; BAE, 2015).

A avaliação bioquímica do soro dos animais tratados com o ESLF não revelou significativas alterações no perfil lipídico em relação ao colesterol e os triglicerídeos, no entanto foi observado uma redução significativa nos teores de HDL

em todas as concentrações do ESLF administrado em relação ao grupo controle. Apesar de reduzida em relação ao grupo controle após os 28 dias de tratamento, percebe-se que em relação aos animais do mesmo grupo que iniciaram o experimento houve uma elevação desse parâmetro, além disso, os valores de HDL encontram-se em níveis considerados normais em relação aos valores de referência da espécie e do gênero dos animais (camundongos swiss) utilizados na pesquisa (LIMA, 2018). Portanto, acredita-se que a redução de HDL em todos os grupos quando comparado ao controle pode estar associado a fatores intrínsecos dos animais, fazendo-se necessária a realização de mais estudos para comprovação dessa tese. Nawwar e colaboradores (2015), em um ensaio utilizando ratos Wistar, avaliaram que um extrato das folhas de *L. ferrea* (300 mg/Kg) reduziu os parâmetros relacionados ao perfil lipídico, colesterol e triglicérides em 53,08 e 48,84%, respectivamente e elevaram o conteúdo de HDL em 158,71% em relação ao grupo controle.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos glicose e ureia após a administração das doses do ESLF não provocou grandes alterações em relação ao grupo de animais usado como controle, o que sugere que o extrato não provoca alterações no metabolismo de carboidratos e não influenciou negativamente na função renal.

A avaliação histopatológica possibilitou a avaliação dos riscos de toxicidade relacionados ao consumo do ESLF em paralelo com os achados bioquímicos. Verificou-se que a administração das três doses do ESLF (30, 100 e 300 mg/kg) diariamente e durante 28 dias não irritou ou causou alterações na mucosa gástrica, comprovadas através da comparação entre as lâminas histológicas do estômago dos animais que receberam as três doses do ESLF e as lâminas dos animais que receberam o veículo água. Esse achado é conveniente pois se pretende usar o produto por via oral. Prazeres e colaboradores, (2019) avaliaram um extrato hidroalcólico de uma outra parte da planta, vagens, e verificaram a propriedade antiulcerogênica em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.

No fígado, rins e coração dos animais dos grupos controle e teste foi observada congestão, ou seja, um aumento no volume de sangue no local, sendo acompanhado muitas vezes de focos de edema no local. Esses achados estão provavelmente relacionados ao evento de morte, durante a eutanásia dos animais, no que diz respeito a estase sanguínea e a inativação da bomba de sódio e potássio

que resulta na entrada de água para dentro das células, o que explica também o aumento do volume nuclear (KING et al., 2013).

A presença de focos de leucócitos no fígado de todas as doses administradas do ESLF e do grupo controle foi rara o que sugere que não houve inflamação local, corroborando com os resultados hematológicos. Em contrapartida, a presença de mitoses frequentes no grupo 300 mg/kg indica uma elevação da necessidade da atividade metabólica e/ou regenerativa dos hepatócitos (WANG et al., 2017). Portanto, é necessária uma avaliação mais minuciosa em relação a representatividade desse achado. Estudos complementares que avaliem a histopatologia do fígado e da medula óssea em um maior período de uso do extrato são necessários para elucidar o efeito do extrato nesse sistema.

Em relação ao tecido cardíaco, caracterizado fundamentalmente por células estriadas responsáveis pela contratilidade do coração (MOHARRAM et al., 2019), foi constatada a perda de parte dessa característica nos grupos tratados com os extratos nas doses 100 e 300 mg/kg. A redução da estriação de cardiomiócitos é um fenômeno *post-mortem* relacionado a eutanásia dos animais e pode ser verificado histologicamente (KING et al., 2013), sendo também observado no tecido cardíaco de animais do grupo controle.

Concentrações variadas (300, 400 e 2000 mg/Kg, via oral) de extratos (aquoso e hidroetanólico) obtidos de vagens, cascas e frutos de jucá administrados por via oral em ratos e camundongos não tiveram influência na alteração do peso e nem induziram sinais clínicos de toxicidade como diarreia, piloereção, convulsões e sonolência. Além disso, não foram observadas alterações histológicas no fígado, baço, rins e pulmões (BACCHI et al. 1995; FREITAS et al. 2012). Peters et al., (2008), avaliou a toxicidade reprodutiva de extratos aquosos de frutos de *L. ferrea* em ratas. Os autores observaram que a dose 300 mg/kg não foi tóxica para a mãe e nem interferiu na implantação do blastocisto. No entanto em modelo utilizando peixes zebra, foi observado que na dose de 2000 mg/Kg por via oral houve toxicidade cardíaca para embriões dessa espécie (FERREIRA et al., 2019).

Com base nos resultados de toxicidade *in vivo*, podemos inferir que o extrato não causou anemia, não é tóxico para o sistema renal e para a mucosa gástrica, não altera o metabolismo de carboidratos e nem modulou negativamente parâmetros bioquímicos do perfil lipídico. Esses achados são ratificados por estudos anteriores (BACCHI et al. 1995; FREITAS et al. 2012). no entanto é preciso

investigar mais profundamente a ação do extrato em precursores celulares na medula óssea, especialmente nas doses 100 e 300 mg/kg. Ademais, pode-se deduzir estudo toxicológico desenvolvido na presente pesquisa que a menor dose com a qual são observados efeitos adversos (LOAEL) foi 100 mg/kg.

Diante dos resultados obtidos na avaliação da toxicidade do ESLF, o estudo prosseguiu avaliando seu efeito antioxidante e anti-inflamatório. A atividade antioxidante constitui uma das atividades biológicas de interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais a partir de produtos naturais. A incapacidade do organismo em eliminar oxidantes levando a níveis intracelulares elevados desses, estão relacionados à patogênese de doenças como câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas (GLASAUER; CHANDEL, 2013). O ânion superóxido é um precursor de espécies oxidantes como  $H_2O_2$  e hidroxil, que quando produzidas em excesso são responsáveis por danos em estruturas celulares vitais como na membrana lipídica, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; KOHEN; NYSKA, 2002). O  $H_2O_2$  difunde-se mais facilmente através da membrana plasmática do que o ânion superóxido, gerando maiores quantidades de radical hidroxil, o qual não é eliminado através de mecanismos antioxidantes enzimáticos fisiológicos. Dessa forma, a eliminação de oxidantes como hidroxil do organismo pode ser realizada através do uso de antioxidantes com capacidade sequestradora do radical hidroxil que podem ser através da alimentação e uso de suplementos, por exemplo.

A capacidade sequestradora específica dos radicais hidroxil e superóxido no presente estudo foi avaliada através de métodos químicos. O ESLF apresentou atividade sequestradora para ambas as espécies reativas. No entanto, o extrato mostrou um maior potencial sequestrador do ânion superóxido em relação ao radical hidroxil. É importante salientar que o ânion superóxido é precursor de outros oxidantes como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil. Dessa forma, o efeito sequestrador do ESLF para os radicais hidroxil e superóxido o torna um ingrediente alimentício promissor como antioxidante capaz de controlar a síntese de outras espécies oxidantes.

O potencial sequestrador de radicais livres das folhas de *L. ferrea* também foi descrito por Nawwar et al., (2015) através do ensaio químico de capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), no qual a atividade antioxidante é avaliada medindo um sinal fluorescente de uma sonda que decresce na presença de

espécies reativas de oxigênio. Gulcin et al., (2020), verificaram que a dose efetiva 50 (DE<sub>50</sub>) foi  $12,5 \pm 2,9 \mu\text{g/mL}$ , Hassan et al. (2015) observaram concentração próxima para o sequestro do radical DPPH (DE<sub>50</sub> =  $12,45 \pm 2,86 \mu\text{g/mL}$ ). Evidencia-se nessas pesquisas um potencial antioxidante nas folhas de *L. ferrea*, porém a atividade sequestradora de radicais livres específicos produzidos fisiologicamente como o radical hidroxil ainda não haviam sido estudados. Portanto a presente pesquisa traz uma nova informação em relação as pesquisas que avaliam o potencial antioxidante das folhas dessa espécie.

O potencial anti-inflamatório de extratos de *L. ferrea* (folhas e frutos) vem sendo demonstrado em diferentes pesquisas (FALCÃO et al., 2019; CARVALHO et al., 1996; LIMA et al., 2012). Contudo, diante da natureza inédita do ESLF, com teor de fenóis superior em relação à estudos anteriores (PORT'S et al., 2013; GRISI et al., 2020), é essencial avaliar se esse extrato inédito com valor agregado mantém ou aprimorou o efeito anti-inflamatório de *L. ferrea*. Para tanto, foi investigado o efeito anti-inflamatório do ESLF e de seu constituinte bioativo majoritário, metil galato, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, mensurado através de vários parâmetros como volume do edema, atividade da mieloperoxidase, concentração de citocina e de marcadores do estresse oxidativo (GSH e ânion superóxido).

O ESLF reduziu significativamente o edema de pata dos camundongos na concentração de 200 mg/kg em relação ao grupo induzido por carragenina e apresentou efeito comparável ao padrão indometacina, resultado que se refletiu nos achados da atividade da enzima MPO, com redução de 58% em relação ao grupo controle estimulado por carragenina. O modelo de edema de pata é extensivamente empregado em estudos farmacológicos para avaliar o potencial anti-inflamatório de uma substância. O edema, um dos sinais cardinais da inflamação, é gerado por aminas vasoativas como histamina, a qual está presente nos grânulos de mastócitos e é liberada por estímulos físicos ou através da interação de antígenos bacterianos com IgE e o receptor FcεRI (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILLEPAN; WOOD, 2016). O edema juntamente com citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α participam ativamente da resposta inflamatória e promovem o recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Os resultados obtidos comprovam o potencial anti-inflamatório das folhas de *L. ferrea* em um modelo *in vivo*.

Vale salientar que para a prevenção de riscos relacionados ao consumo do extrato, o consumo diário de 200mg/kg, melhor dose relacionada ao efeito antiedematogênico, não é recomendado pois a dose na qual foram observados efeitos adversos após o uso diário do extrato foi 100mg/kg. No entanto, para efeitos de segurança, considera-se o extrato seguro pois apresenta DL50 > 2g/kg.

Estudos prévios revelaram o potencial das vagens de *L. ferrea* em inibir o edema de pata e orelha em camundongos e ratos. Carvalho et al. (1996) verificou que a dose 300 mg/kg do extrato aquoso das vagens reduziu 36% do edema de pata de ratos Wistar comparado ao grupo controle induzido por carragenina. Comparativamente, verifica-se que o ESLF desenvolvido na presente pesquisa apresentou um efeito redutor maior do edema (59,7%). Essa diferença se justifica pela diferença das partes da espécie e dos métodos de preparação do extrato empregados. Lima e colaboradores (2012) verificaram uma redução (66%) do edema de orelha de camundongos induzido por xileno quando foi administrado a dose 50mg/kg de um extrato hidroalcolico das vagens.

A produção de mediadores químicos, incluindo citocinas e produtos do estresse oxidativo têm um papel importante na instalação e desenvolvimento da resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina. Dessa forma, foi investigado se o efeito anti-edematogênico do ESLF estaria relacionado a um efeito sobre a produção desses mediadores. Foi observado que tanto o ESLF quanto seu constituinte químico majoritário, metil galato, reduziram significativamente a produção de produtos da peroxidação lipídica e o extrato ainda reduziu em 49% o nível da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  em relação ao controle estimulado. Comparativamente, foi observado um efeito antioxidante comparável entre os extratos de *L. ferrea* (200 mg/kg) e de *C. sinensis* (100 mg/kg) na avaliação do potencial contra a peroxidação lipídica, no entanto o ESLF apresentou efeito redutor superior da liberação de TNF- $\alpha$  no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

O extrato de *L. ferrea* não elevou os níveis das enzimas antioxidante SOD e GSH. A não elevação dos níveis dessas enzimas pode estar relacionada a baixa necessidade da ação enzimática neutralizadora de espécies oxidantes devido a presença dos componentes sabidamente antioxidantes sequestradores desse radical no extrato de *L. ferrea*.

Diante dos resultados obtidos, o ESLF possui efeito anti-inflamatório *in vivo*, parte desse efeito está associado a redução do acúmulo de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, no foco inflamatório, além da redução da produção de TNF- $\alpha$  e redução da produção de produtos da peroxidação lipídica. Dessa forma, o ESLF parece que além de modular a produção de oxidantes, age também sequestrando espécies oxidantes acumuladas no foco inflamatório.

Prosseguindo os estudos, foi investigado se o ESLF seria capaz de modular a ativação de células do sistema imune periférico e central, como neutrófilos e micróglia, respectivamente, que têm um papel importante na gênese de várias doenças inflamatórias como AVC e doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (BISWASS, 2016, ZHAO et al., 2021).

Os neutrófilos são as primeiras células de defesa recrutadas para o sítio inflamatório, fagocitam e neutralizam patógenos através de mecanismos oxidantes catalisados pela enzima MPO (ROSALES et al., 2016; MORTAZ et al., 2018). A elevação da atividade da MPO é um indício do recrutamento de neutrófilo para um sítio inflamatório agudo (ARNHOLD, 2020). Nos últimos anos a MPO ganhou destaque por sua participação na fisiopatologia de doenças crônicas como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (FERNANDES et al., 2012; TANG et al., 2006; RAY; KATYAL, 2016). Desse modo, a atividade de MPO surge como um biomarcador em potencial não só para inflamação aguda, mas também para avaliação de doenças crônicas.

A atividade do extrato de *L. ferrea* sobre a atividade da MPO foi verificada em neutrófilos humanos induzidos por PMA. Os resultados de atividade da MPO após pré-tratamento com o ESLF mais uma vez reforçaram a atividade do ESLF na redução da atividade dessa enzima, com um decréscimo expressivo de 62,91% na concentração 100  $\mu\text{g/mL}$ , resultado associado, em parte, a presença de componentes fenólicos e mais precisamente ao metil galato, o qual, na concentração de 4  $\mu\text{g/mL}$  (teor de metil galato em 100  $\mu\text{g/mL}$  do extrato) reduziu em 70,5% a atividade da MPO. Esses resultados indicam, indiretamente, uma redução do recrutamento de neutrófilos e por consequência o abrandamento do processo inflamatório.

Além disso, os efeitos do ESLF e do metil galato não estão associados a toxicidade em neutrófilos, segurança comprovada através dos ensaios de MTT, que avalia o metabolismo mitocondrial celular, e através da dosagem da enzima LDH no

meio extracelular. Em todos os ensaios a viabilidade não foi reduzida significativamente em relação ao padrão tóxico.

Estudos como o de Falcão e colaboradores (2019) ratificam esse achado. Os autores avaliaram a atividade anti-inflamatória intra-articular do extrato aquoso das folhas de *L. ferrea* através de modelo de indução da inflamação por zimosan em ratos e observaram que o extrato das folhas de *L. ferrea* (100, 200 e 300 mg/Kg) reduziram a atividade de MPO em até  $85 \pm 7\%$  quando comparado ao controle induzido por zimosan. Os autores constataram ainda que o extrato reduziu o influxo de leucócitos no fluido sinovial em  $76 \pm 2\%$  nas mesmas doses.

A constatação que o ESLF reduz mediadores inflamatórios que podem estar associados a patogênese, inclusive de patologias neurodegenerativas, revela que o ESLF pode ter seu uso associado também ao tratamento complementar de patologias inflamatórias no SNC. Sendo assim, resolvemos investigar o potencial desse extrato frente a um modelo de inflamação utilizando células imunes provenientes do sistema nervoso central.

Avaliamos o potencial anti-inflamatório do extrato em células microgliais BV2 através de modelo de inflamação induzida por LPS. As micróglia contribuem ativamente para as respostas neuroinflamatórias como células imunes semelhantes a macrófagos residentes no SNC. Em resposta a estímulos como ao LPS, um ligante de TLR4, as células microgliais secretam vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e NO, e regulam positivamente óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e, portanto, são mediadores diretos da inflamação a nível de sistema nervoso central, o que pode contribuir a longo prazo com a patogênese de doenças neurodegenerativas como o Parkinson e o Alzheimer (LEE et al., 2021).

O pré-tratamento com ESLF (50  $\mu$ g/m) não alterou significativamente os níveis de IL-1 $\beta$ , no entanto, reduziu em 21,5% a liberação de TNF- $\alpha$  e em 55% a liberação de IL-6 em relação ao grupo estimulado. A citocina IL-6 é um reconhecido regulador da resposta imunológica de micróglia. Em condições de homeostase corporal, são encontrados baixos níveis de IL-6 produzidos por micróglia, no entanto há o aumento da produção dessa citocina em condições de ativação estimuladas por lesões teciduais, isquemia e condições relacionadas a distúrbios neurodegenerativos como nas doenças de Parkinson e Alzheimer (RECASENS et al., 2021).

Verificamos ainda que o pré-tratamento com o extrato de *L. ferrea* (50 µg/mL) atenuou em 58% a liberação de NO das micróglia. O NO é um mediador presente em respostas inflamatórias. A produção de NO de forma exacerbada no SNC está associada a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Além disso, o excesso de NO reage com o oxigênio produzindo nitrito e peroxinitrito, espécies oxidantes envolvidas no estresse oxidativo (YUSTE et al., 2015).

Verificamos que o extrato não reduziu a expressão de iNOS, enzima que catalisa a formação de óxido nítrico. Sugerimos que a redução do teor de NO após o pré-tratamento com o ESLF pode estar relacionada ao potencial redutor de espécies reativas característico do extrato ou a outras vias de sinalização da inflamação.

A riqueza em compostos polifenóis, principalmente do composto majoritário metil galato, pode explicar parte desse potencial anti-inflamatório preventivo do extrato. Verificamos que 1,9 µg/mL reduziu significativamente a liberação de NO ( $11,14 \pm 3,87 \mu\text{M}$ ) em comparação com o grupo estimulado por LPS ( $15,51 \pm 6,38 \mu\text{M}$ ). Também observamos uma tendência na redução da liberação de NO pelo metil galato de maneira dependente da dose. No entanto, deve-se notar que o aumento da dose acima de 1,9 µg/mL reduziu significativamente a viabilidade celular da micróglia.

Ademais, os efeitos observados a partir do pré-tratamento com o ESLF e o metil galato não estão associados a citotoxicidade em micróglia, a segurança foi comprovada através dos ensaios de MTT e da dosagem da enzima LDH no meio extracelular.

Os dados obtidos indicam a segurança e o potencial antioxidante e anti-inflamatório do extrato de *L. ferrea*. Essa espécie encontrada em toda região nordeste, apresenta folhas perenes, com extrato de fácil obtenção e alto teor de polifenóis em sua maioria composto por ácidos fenólicos e flavonoides como metil galato e outros polifenóis que contribuem para o efeito do extrato. Possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* comparáveis a espécies vegetais com uso global e extensamente estudadas quanto aos aspectos funcionais como é o caso da *C. sinensis*. Essas características fazem do extrato seco de *L. ferrea* uma opção em potencial como um novo ingrediente funcional.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dessa pesquisa permitiram concluir que:

- As propriedades físicas do extrato (fluxo do pó, solubilidade, umidade), indicam um caráter versátil com potencial para uso na produção de formas farmacêuticas como pós, cápsulas e comprimidos;
- O extrato apresenta riqueza em compostos fenólicos como metil galato (composto majoritário), orientina, isorientina, ácido elágico e seus derivados;
- Segundo o sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS), o ESLF apresenta baixo risco de ocasionar efeitos tóxicos em modelo animal (camundongos swiss) após administração em dose única;
- O consumo do extrato não causou a morte de nenhum animal e não alterou significativamente parâmetros associados às funções renal, hepática e no metabolismo de carboidratos em modelo *in vivo* utilizando camundongos swiss;
- A menor dose do extrato com a qual foram observados efeitos adversos (LOAEL) foi 100 mg/kg;
- O potencial antioxidante do extrato está relacionado a atividade sequestradora de espécies oxidantes como os radicais hidroxil e superóxido;
- O extrato apresenta atividade antiedematogênica, reduz o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório e inibe a síntese de mediadores inflamatórios como a citocina TNF- $\alpha$  e espécies oxidantes.
- O extrato não interferiu no metabolismo mitocondrial e nem causou danos na membrana celular de neutrófilos e micróglia;
- O extrato reduz a síntese de NO e da citocina IL-6 em modelo de inflamação utilizando micróglia estimuladas com LPS e, portanto, possui atividade anti-neuroinflamatória.
- O extrato apresenta propriedades antioxidante e anti-inflamatória comparáveis ao extrato de *C. sinensis* e parte desse efeito se deve a presença de metil galato.

## 8. CONCLUSÃO

Na presente pesquisa verificou-se que o extrato seco padronizado das folhas de *L. ferrea* é seguro, apresenta capacidade antioxidante sequestradora de radicais livres e efeito anti-inflamatório a nível sistêmico e central, propriedades essas relacionadas a riqueza do extrato em compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos como o componente majoritário metil galato. Sendo assim, o produto bioativo desenvolvido possui potencial para ser usado como um ingrediente funcional, com possibilidade de uso humano e veterinário, através do consumo direto, suplementação e como um aditivo alimentar.

## REFERÊNCIAS

ADWAS, Almokhtar; ELSAYED, Ata Sedik Ibrahim; AZAB, Elsayed; QUWAYDIR, Fawzia Amhimmid. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of applied biotechnology & bioengineering**, v. 6, p. 43-47, 2019. <http://dx.doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00173>.

ALKAZEMI, Dalal; RAHMAN, Abdur; HABRA, Banan. Alterations in glutathione redox homeostasis among adolescents with obesity and anemia. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-12, 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-82579-5>.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**, 8ª ed., Porto alegre: Ed. Artmed, 2007

ARAÚJO, Aurigena Antunes de; SOARES, Luiz Alberto Lira; FERREIRA, Magda Rhayanny Assunção; SOUZA NETO, Manoel André de; SILVA, Giselle Ribeiro da; ARAÚJO, Raimundo Fernandes de; GUERRA, Gerlane Coelho Bernardo; MELO, Maria Celeste Nunes de. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.031>.

ARNHOLD, Jürgen. The Dual Role of Myeloperoxidase in Immune Response. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, p. 8057, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21218057>.

ATTILIO P, MERRITT C, SIMS J, KANE N, O'SULLIVAN J. The effect of ellagic acid on platelet activation as measured by the quantification of P-selectin using flow cytometry. **American Association of Nurse Anesthetists Journal**, v. 8, p. 453-459, 2010.

BACCHI, Elfriede; SERTIÉ, Jayme. Antiulcer Action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in Rats. **Planta Medica**, v. 60, p. 118-120, 1994. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-959430>.

BACCHI, Elfriede; SERTIÉ, Jayme; VILLA, Nelson; KATZ, Hilton. Antiulcer Action and Toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, p. 204-207, 1995. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-958056>.

BAI, X., YANG, P., ZHOU, Q., CAI, B., BUIST-HOMAN, M, CHENG, H., JIANG, J., SHEN, D., LI, L., BATRES, L.A., MALLER, E.S. **Laboratory assessment of liver function and injury in children: liver disease in children**. Philadelphia: Lippincott, 2001.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276–287, 1971.

BISWASS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-9, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5698931>.

BITU-PINTO, Natália; ALEXANDRE, Bruno da Silva; NEVES, Kelly Rose Tavares; SILVA, Aline Holanda; LEAL, Luzia Kalyne A. M.; VIANA, Glauce S. B. Neuroprotective properties of the standardized extract from *camellia sinensis* (green tea) and its main bioactive components, epicatechin and epigallocatechin gallate, in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-12, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/161092>.

BONACORSI, Cibele; RADDI, Maria Stella G.; FONSECA, Luiz Marcos da; SANNOMIYA, Miriam; VILEGAS, Wagner. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on *Helicobacter pylori*-Induced Neutrophils Oxidative Burst. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 133-141, 2011. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms13010133>.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982. <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª ed., 2019.

BRASIL. Guia 23, de 09 de agosto de 2019. Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. 2019

BRASIL. Resolução RDC 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, constante do anexo desta Portaria. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br), Acesso em 11 de maio de 2022.

BRASIL. Resolução RDC 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br), Acesso em 11 de maio de 2022,

BRASIL. Resolução RDC 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br), Acesso em 11 de maio de 2022.

BRASIL. Resolução RDC 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) => Acesso em 11 de maio de 2022.

BRASIL. Resolução RDC 13, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. Órgão emissor: ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) => Acesso em 14 de agosto de 2022.

BRUNAUGH, Ashlee D.; WU, Tian; KANAPURAM, Sekhar R.; SMYTH, Hugh D. C. Effect of Particle Formation Process on Characteristics and Aerosol Performance of Respirable Protein Powders. **Molecular Pharmaceutics**, v. 16, p. 4165-4180, 2019. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00496>.

CALLEGARI-JAQUES, Sidia. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2003.

CARVALHO, José T.; TEIXEIRA, José. M.; SOUZA, Pergentino J.C.; BASTOS, Jairo K.; SANTOS FILHO, David; SARTI, Sílvio José. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 53, p. 175-178, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01441-9](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(96)01441-9).

CHAGAS-NETO, Francisco Cirineu. Desenvolvimento do extrato seco de *Libidibia ferrea* (jucá) como alimento funcional: caracterização química e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória em modelo de neuroinflamação. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CHEN, Bang-Tian; LI, Wei-Xi; HE, Rong-Rong; LI, Yi-Fang; TSOI, Bun; ZHAI, Yu-Jia; KURIHARA, Hiroshi. Anti-Inflammatory Effects of a Polyphenols-Rich Extract from Tea (*Camellia sinensis*) Flowers in Acute and Chronic Mice Models. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/537923>.

CHEN, Linlin; DENG, Huidan; CUI, Hengmin; FANG, Jing; ZUO, Zhicai; DENG, Junliang; LI, Yinglun; WANG, Xun; ZHAO, Ling. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, p. 7204-7218, 2017. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.

CHEN, Rui; WANG, Xiu-Juan; ZHANG, Yao-Yuan; XING, Yan; YANG, Liu; NI, He; LI, Hai-Hang. Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds. **Food Chemistry**, v. 300, p. 125162, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125162>.

CZERNICKA, Maria; ZAGUŁA, Grzegorz; BAJCAR, Marcin; SALETNIK, Bogdan; PUCHALSKI Czesław. Study of nutritional value of dried tea leaves and infusions of black, green and white teas from Chinese plantations. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 68, p. 237-245, 2017.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory

hypernociception. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 824-832, 2008. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0907654>.

DA COSTA, Leydiana; GUILHON-SIMPLICIO, Fernanda; DE SOUZA, Tatiane. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex tul) L. P. Queiroz var. *Ferrea*: Pharmacological, phytochemical and botanical aspects, **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 48–53, 2015.

DALGAARD, Frederik; BONDONNO, Nicola P; MURRAY, Kevin; BONDONNO, Catherine P; LEWIS, Joshua R; CROFT, Kevin D; KYRØ, Cecilie; GISLASON, Gunnar; SCALBERT, Augustin; CASSIDY, Aedin. Associations between habitual flavonoid intake and hospital admissions for atherosclerotic cardiovascular disease: a prospective cohort study. **The Lancet Planetary Health**, v. 3, p. 1-10, 2019. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2542-5196\(19\)30212-8](http://dx.doi.org/10.1016/s2542-5196(19)30212-8).

DE GAULEJAC, Nathalie Saint-Cricq de; GLORIES, Yves; VIVAS, Nicolas. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v. 32, p. 327-333, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969\(99\)00093-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969(99)00093-9).

DIAS, A.M.A.; REY-RICO, A.; OLIVEIRA, R.A.; MARCENEIRO, S.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; R.N.C. JÚNIOR; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C. de. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 74, p. 34-45, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.12.007>.

DI MEO, Florent; LEMAUR, Vincent; CORNIL, Jérôme; LAZZARONI, Roberto; DUROUX, Jean-Luc; OLIVIER, Yoann; TROUILLAS, Patrick. Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: atom versus electron transfer. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 117, p. 2082-2092, 2013. <http://dx.doi.org/10.1021/jp3116319>.

DI MEO, Sergio; VENDITTI, Paola. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1-32, 2020. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/9829176>.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 421-31, 1990. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-i](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i).

DUAN, Jing; ZHAN, Ji-Cheng; WANG, Gui-Zhen; ZHAO, Xin-Chun; HUANG, Wei-Dong; ZHOU, Guang-Biao. The red wine component ellagic acid induces autophagy and exhibits anti-lung cancer activity in vitro and in vivo. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, p. 143-154, 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.13899>.

DURAZZO, Alessandra; LUCARINI, Massimo; SOUTO, Eliana B.; CICALA, Carla; CAIAZZO, Elisabetta; IZZO, Angelo A.; NOVELLINO, Ettore; SANTINI, Antonello. Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, v. 33, p. 2221-2243, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6419>.

FALCÃO, Tamires Rocha; RODRIGUES, Cássio Alexandre Oliveira; ARAÚJO, Aurigena Antunes de; MEDEIROS, Caroline Addison Carvalho Xavier de; SOARES, Luiz Alberto Lira; FERREIRA, Magda Rhayanny Assunção; VASCONCELOS, Roseane Carvalho; ARAÚJO JÚNIOR, Raimundo Fernandes de; LOPES, Maria Luiza Diniz de Sousa; GUERRA, Gerlane Coelho Bernardo. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, p. 1-10, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-019-2454-3>.

FARAG, Mohamed A.; SAKNA, Sarah T.; EL-FIKY, Nabaweya M.; SHABANA, Marawan M.; WESSJOHANN, Ludger A. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight Bauhinia L. species from Egypt using UHPLC–PDA–qTOF-MS and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 119, p. 41-50, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.004>.

FERNANDES, Raissa Maria Sampaio Neves; SILVA, Neusa Pereira da; SATO, Emília Inoue. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 32, p. 1605-1609, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-011-1810-5>.

FERNANDES, Sibeles Santos; COELHO, Michele Silveira; SALAS-MELLADO, Myriam de Las Mercedes. Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods. **Bioactive Compounds**, p. 129-142, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814774-0.00007-4>.

FERREIRA, Diego Q.; FERRAZ, Thamara O.; ARAÚJO, Raquel S.; CRUZ, Rodrigo Alves Souza; FERNANDES, Caio Pinho; SOUZA, Gisele C.; ORTIZ, Brenda L. S.; SARQUIS, Rosângela S. F. R.; MIRANDA, Jemima C. M. M.; GARRETT, Rafael; CARVALHO, José C. Tavares; OLIVEIRA, Anna Eliza M. de Faria Mota. *Libidibia ferrea* (jucá), a Traditional Anti-Inflammatory: A Study of Acute Toxicity in Adult and Embryos Zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v.12, p. 1–15. 2019. <http://dx.doi:10.3390/ph12040175>.

FERREIRA, Magda Rhayanny Assunção; FERNANDES, Mônica T.; DA SILVA, Wliana A.; BESERRA, Isabelle C. DE SOUZA, Tatiane P.; PIMENTEL, Maria Fernanda; SOARES, Luiz Alberto. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* martius. **Pharmacogn. Mag.**, v. 12, p. 285–291, 2016. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.182165>.

FERREIRA JÚNIOR, Washington Soares; CAMPOS, Letícia Zenóbia de Oliveira; de MEDEIROS Patrícia Muniz. Unconventional Food Plants: Food or Medicine? **Local Food Plants of Brazil**. p. 29-47, 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-69139-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-69139-4_3).

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T. U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia* (Caesalpinia) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/514134>.

GALVÃO, W.R. Aguiar; BRAZ FILHO, R.; CANUTO, K.M.; RIBEIRO, P.R.V.; CAMPOS, A.R.; MOREIRA, A.C.O.M.; SILVA, S.O.; MESQUITA FILHO, F.A.; S.A.A.R., Santos; MELO JUNIOR, J.M.A. Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - A conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.024>.

GAO, Yifeng; TOLLEFSBOL, Trygve. Combinational proanthocyanidins and resveratrol synergistically inhibit human breast cancer cells and impact epigenetic-mediating machinery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1-18, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19082204>.

GARCIA, Jéssica A.A.; CORRÊA, Rúbia C.G.; BARROS, Lillian; PEREIRA, Carla; ABREU, Rui M.V.; ALVES, Maria José; CALHELHA, Ricardo C.; BRACHT, Adelar; PERALTA, Rosane M.; FERREIRA, Isabel C.F.R. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302-308, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.074>.

GLASAUER, Andrea; CHANDEL, Navdeep S. ROS. **Current Biology**, v. 3, p. 1-3, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.011>.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**. v. 392, p. 1736–1788, 2018.

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

GREEN, Laura C.; TANNENBAUM, Steven R.; GOLDMAN, Peter. Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981. <http://dx.doi.org/10.1126/science.6451927>.

GRISI, C. V. B.; CORDEIRO, A. M. T. de M.; NASCIMENTO, M. K. G. do; FRANCA, S. A. M. da; FREIRE, S. M. M.; ALBUQUERQUE, C. L. C. de; MARQUES, A. da S.; ARAÚJO, G. T. de. Antioxidant potential and stability of the juca (*Libidibia ferrea*) bioadditive. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e945975224, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.5224>.

GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 651-715, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3. ed. London, UK: Oxford University Press, 1999.

HASSAN, Sherien Kamal; EL-SAMMAD, Nermin Mohammed; MOUSA, Amria Mamdouh; MOHAMMED, Maha Hashim; FARRAG, Abd El Razik Hussein; HASHIM, Amani Nassir Eldin; WERNER, Victoria; LINDEQUIST, Ulrike; NAWWAR, Mahmoud Abd El-Moein. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, p. 462-471, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apitb.2015.03.004>.

HAUSNER, H.H. Friction conditions in a mass of metal powder. **International Journal of Powder Metallurgy**, v. 3. p. 7-13. 1967.

HOSSEN, Md. Sakib; TANVIR, E. M.; PRINCE, Maruf Billah; PAUL, Sudip; SAHA, Moumoni; ALI, Md. Yousuf; GAN, Siew Hua; KHALIL, Md. Ibrahim; KARIM, Nurul. Protective mechanism of turmeric (*Curcuma longa*) on carbofuran-induced hematological and hepatic toxicities in a rat model. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, p. 1937-1945, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1345951>.

INKER, Lesley A.; LEVEY, Andrew S. Measurement and estimation of kidney function. **Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation**, fourth edition. 23–41. 2019. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/B978-0-323-52978-5.00002-1>.

JOLLOW, D.J; MITCHELL, J.R.; ZAMPAGLIONE N.; GILLETTE, J.R.; Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. **Pharmacology**. v.11, p.151-69, 1974. <http://dx.doi.org/10.1159/000136485>.

JOVANOVIĆ, A. A.; LEVIĆ, S.M.; PAVLOVIĆ, V.B.; MARKOVIĆ, S.B.; PJANOVIĆ, R.V.; ĐORĐEVIĆ, V.B.; NEDOVIĆ, V.; BUGARSKI, B.M. Freeze vs. Spray Drying for dry wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) extract formulations: the impact of gelatin as a coating material. *Molecules*, v. 26, p. 1-16, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26133933>.

KABEYA, L.M.; KANASHIRO, A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SORIANI, F.M.; LOPES, J.L.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, v. 111, p. 103–14, 2002.

KANY, Shinwan; VOLLRATH, Jan Tilmann; RELJA, Borna. Cytokines in Inflammatory Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-31, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20236008>.

KHALAF, Ahmad Taha; WEI, Yuanyuan; ALNEAMAH, Sadiq; AL-SHAWI, Sarmad Ghazi; KADIR, Samiah Yasmin; ZAINOL, Jamaludin; LIU, Xiaoming. What Is New in the Preventive and Therapeutic Role of Dairy Products as Nutraceuticals and Functional Foods? **BioMed research international**, v. 2021, p. 1-9. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8823222>.

KHAN, Amjad; ALSAHLI, Mohammed; RAHMANI, Arshad. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. **Medical Sciences**, v. 6, p. 1-21, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/medsci6020033>.

KHAN, Parvez; IDREES, Danish; MOXLEY, Michael A.; CORBETT, John A.; AHMAD, Faizan; VON FIGURA, Guido; SLY, William S.; WAHEED, Abdul; HASSAN, Md. Imtaiyaz. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: clinical and non-clinical application and future uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 333-355, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-0850-1>.

KIM, Yoona; CLIFTON, Peter. Curcumin, Cardiometabolic Health and Dementia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, p. 1-34, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph15102093>.

KING, John M., ROTH-JOHNSON, Lois, DODD, David c.; NEWSOM, Marion E. **The necropsy book: a guide for veterinary students, residents, clinicians, pathologists, and biological researchers**. New York, Charles Louis Davis DVM Foundation, 7<sup>o</sup> Ed. 2013.

KOHEN, Ron; NYSKA, Abraham. Invited Review: oxidation of biological systems. **Toxicologic Pathology**, v. 30, p. 620-650, 2002. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230290166724>.

KOONYOSYING, Pimpisid; KONGKARNKA, Sarawut; UTHAIPIBULI, Chairat; SVASTI, Saovaros; FUCHAROEN, Suthat; SRICHAIRATANAKOOL, Somdet. Green tea extract modulates oxidative tissue injury in beta-thalassemic mice by chelation of redox iron and inhibition of lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1694–1702. 2018. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.017.

KÖLLIKER-FRERS, Rodolfo; UDOVIN, Lucas; OTERO-LOSADA, Matilde; KOBIEC, Tamara; HERRERA, María Inés; PALACIOS, Jorge; RAZZITTE, Gabriela; CAPANI, Francisco. Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease, Mediators of Inflammation, v. 2021, p 1-20, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9999146>

KORGA, Agnieszka; OSTROWSKA, Marta; JOZEFczyk, Aleksandra; IWAN, Magdalena; WOJCIK, Rafal; ZGORKA, Grazyna; HERBET, Mariola; VILARRUBLA, Gemma Gomez; DUDKA, Jaroslaw. Apigenin and hesperidin augment the toxic effect of doxorubicin against HepG2 cells. **Bmc Pharmacology and Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s40360-019-0301-2>.

KRASTEVA, Iliana; NIKOLOV, Stefan. Flavonoids in Astragalus corniculatus. **Química Nova**, v. 31, p. 59-60, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000100012>.

KRYSTEL-WHITTEMORE, Melissa; DILEEPAN, Kottarappat N.; WOOD, John G. Mast Cell: a multi-functional master cell. **Frontiers In Immunology**, v. 6, p. 1-12, 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>.

KRUGER, C.L; MANN, S.W. Safety evaluation of functional ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 793-805, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(03\)00018-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00018-8).

KUDOH, Satoru; SUZUKI, Katsuhiko; YAMADA, Mutsuo; LIU, Qiang; NAKAJI, Shigeyuki; SUGAWARA, Kazuo. Contribution of nitric oxide synthase to human neutrophil chemiluminescence. **Luminescence**, v. 14, n. 6, p. 335-339, 1999. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1522-7243\(199911/12\)14:63.0.co;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1522-7243(199911/12)14:63.0.co;2-#).

KURUTAS, Ergul Belge. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 1-22, 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, p. 1-5, 2018. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot095497>.

LAM, Kit Ying; LING, Anna Pick Kiong; KOH, Rhun Yian; WONG, Ying Pei; SAY, Yee How. A Review on Medicinal Properties of Orientin. *Advances In Pharmacological Sciences*, v. 2016, p. 1-9, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4104595>.

LEE, Jae-Won; CHUN, Wanjoo; LEE, Hee Jae; KIM, Seong-Man; MIN, Jae-Hong; KIM, Doo-Young; KIM, Mun-Ock; RYU, Hyung Won; LEE, Su Ui. the role of microglia in the development of neurodegenerative diseases. **Biomedicines**. 9, n. 10, p. 1449, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9101449>.

LEE, Jung-Jin; CHO, Won-Kyung; KWON, Hye Eun; GU, Minjung; MA, Jin Yeul. Gallarhois exerts its antiplatelet effect by suppressing ERK1/2 and PLC $\beta$  phosphorylation. **Food And Chemical Toxicology**, v. 69, p. 94-101, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.032>.

LEE, Wonhwa; BAE, Jong-Sup. Antithrombotic and antiplatelet activities of orientin in vitro and in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 388-398, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.037>.

LEÓN-VILLANUEVA, Andrés; HUERTA-OCAMPO, José A.; BARRERA-PACHECO, Alberto; MEDINA-GODOY, Sergio; LAROSA, Ana P. Barba de. Proteomic analysis of non-toxic *Jatropha curcas* byproduct cake: fractionation and identification of the major components. **Industrial Crops And Products**, v. 111, p. 694-704, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.046>.

LEWIS, G. P. *Libidibia*. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.

LI, Jinhua; KUANG, Gang; CHEN, Xiaohu; ZENG, Rui. Identification of Chemical Composition of Leaves and Flowers from *Paeonia rockii* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. **Molecules**, v. 21, p. 1-8, 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21070947>.

LIMA, Francisco Evanir Gonçalves. Perfil bioquímico e hematológico de ratos e camundongos do biotério central da universidade federal do Ceará. 76 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

LIMA, Sandrine Maria A.; ARAÚJO, Larissa Cardoso C.; SITÔNIO, Marília Maria; FREITAS, Ana Carina C.; MOURA, Sirlene L.; CORREIA, Maria Tereza S.; MALTA, Diana Jussara N.; GONÇALVES-SILVA, Teresinha. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000197>.

LIPINSKI, Boguslaw. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2011, p. 1-9, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/809696>.

LIU, Chao.; CHU, Dewei.; KALANTAR-ZADEH, Kouros.; GEORGE, Jacob.; YOUNG, Houward. A.; Liu, Guozhen. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Advanced Science**, v. 8, p. 1-29. <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>.

LIU, Zhe; ZHANG, Jiagan; LU, Shengmin; TANG, Weimin; ZHOU, Yibin; QUEK, Siew Young. Effects of different drying methods on phenolic components and in vitro hypoglycemic activities of pulp extracts from two Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) cultivars. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, p. 366-373, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2021.11.014>.

LOPES, Nayara; FACCIN-GALHARDI, Lígia Carla; ESPADA, Samantha Fernandes; PACHECO, Arcelina Cunha; RICARDO, Nágila Maria Pontes Silva; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho; NOZAWA, Carlos. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.015>.

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

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of Ig M and IgG. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 2015–2020, 1984.

MACÊDO, Nair Silva, SILVEIRA, Zildene de Sousa; BEZERRA, Antônio Henrique; COSTA, José Garlberto M.; COUTINHO, Henrique Douglas M.; ROMANO, Barbara; CAPASSO, Raffaele., CUNHA, Francisco Assis Bezerra; SILVA, Márcia Vanusa. *Caesalpinia ferrea* C. Mart. (Fabaceae) phytochemistry, ethnobotany, and bioactivities: a review. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3831, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25173831>.

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

MAMAT, Norlida; ABDULLAH, Hasmah; HAPIDIN, Hermizi; MOKHTAR, Noor Fatmawati. Gallic Acid and Methyl Gallate Enhance Antiproliferative Effect of Cisplatin on Cervical Cancer (HeLa) Cells. **Sains Malaysiana**, v. 49, n. 5, p. 1107-1114, 2020. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2020-4905-15>.

MANTOVANI, Alessandro; SCORLETTI, Eleonora; MOSCA, Antonella; ALISI, Ana; BYRNE, Christopher D.; TARGHER, Giovanni Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, v. 111, p. 1-10, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154170>.

MARTINS, Alexandre; SCHIMIDT, Helen L.; GARCIA, Alexandre; ALTERMANN, Caroline dalla Colletta; SANTOS, Francieli W.; CARPES, Felipe P.; SILVA, Weber Cláudio da; MELLO-CARPES, Pâmela B. Supplementation with different teas from *Camellia sinensis* prevents memory deficits and hippocampus oxidative stress in ischemia-reperfusion. **Neurochemistry International**, v. 108, p. 287-295, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2017.04.019>.

MELO, J.G.; RODRIGUES, M.D.; NASCIMENTO, S.C.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: a comparison of different selection approaches. **South African Journal Of Botany**, v. 113, p. 47-53, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.013>.

MERCOGLIANO, María Florencia; BRUNI, Sofía; ELIZALDE, Patricia V.; SCHILLACI, Roxana. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Blockade: an opportunity to tackle breast cancer. **Frontiers In Oncology**, v. 10, p. 1-25, 2020. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.00584>.

MORTAZ, Esmaeil; ALIPOOR, Shamila D.; ADCOCK, Ian M.; MUMBY, Sharon; KOENDERMAN, Leo. Update on neutrophil function in severe inflammation. **Frontiers In Immunology**, v. 9, p. 1-14, 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02171>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

NAWWAR, Mahmoud HUSSEIN, Sahar; EL-MOUSALLAMI, Amani; HASHEM, Amani; MOUSA, Mona; HETTA, M. H.; HAMED, M. A.; WERNER, V.; BECKER, A.; HAERTEL, B. Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Pharmazie**, n. 8, p. 553-558, 2015. <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2015.5526>.

NAWWAR, Mahmoud; EL-MOUSALLAMI, Amani; HUSSEIN, Sahar; HASHEM, Amani; MOUSA, Mona; LINDEQUIST, Ulrike; LINSCHIED, Michael. Three New Di-O-glycosyl-C-glucosyl Flavones from the Leaves of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, v. 69, n. 9-10, p. 357-362, 2014. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.5560/znc.2014-0113>.

NAYAK, Spurthi; ARAVIND B; MALAVALLI, Sachin; SUKANTH, B; POORNIMA, R; BHARATI, Pushpa; Hefferon, Kathleen; Kole, Chittaranjan; Puppala, Naveen. Omics

Technologies to Enhance Plant Based Functional Foods: An Overview. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 1-18, 2021. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2021.742095>

NAKAMURA, Eliane s; KUROSAKI, Fumiya; ARISAWA, Munehisa; MUKAINAKA, Teruo; OKUDA, Masato; TOKUDA, Harukuni; NISHINO, Hoyoku; PASTORE, Floriano. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p.119-124. 2002.

NING, Jingming; HOU, Gary G.; SUN, Jingjing; WAN, Xiaochun; DUBAT, Arnaud. Effect of green tea powder on the quality attributes and antioxidant activity of whole-wheat flour pan bread. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 79, p. 342-348, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.052>.

NOZAKI, Hiroshi; HAYASHI, Ken-Ichiro; KIDO, Masahiro; KAKUMOTO, Kazuyuki; IKEDA, Shogo; MATSUURA, Nobuyasu; TANI, Hiroyuki; TAKAOKA, Daisuke; IINUMA, Munekazu; AKAO, Yukihiro. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290-8292, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.130>.

OHIRA, Susumu. ChemInform Abstract: new chalcone dimers (i) from caesalpinia ferrea mart act as potent inhibitors of dna topoisomerase ii. **Cheminform**, v. 45, n. 2, p. 5052-5055, 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chin.201402207>.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. OECD 423. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. OECD 407. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2008.

PETERS, Vera M.; SOUZA, Síntia; CARVALHO, José; BORGES, Luciana; GUERRA, Martha. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. **Botanica Latinoamericana e Caribe. Plantas Medicinarias Aromáticas**, v. 7, n.5, p. 268-272, 2008.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

PIZZINO, Gabriele; IRRERA, Natasha; CUCINOTTA, Mariapaola; PALLIO, Giovanni; MANNINO, Federica; ARCORACI, Vincenzo; SQUADRITO, Francesco; ALTAVILLA, Domenica; BITTO, Alessandra. Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8416763>.

POLJSAK, Borut; IUPUT, Dušan; MILISAV, Irina. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine**

and **Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-11, 2013.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/956792>.

PORT'S, Pollyane da Silva; CHISTÉ, Renan Campos; GODOY, Helena Teixeira; PRADO, Marcelo Alexandre. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, p. 875-881, 2013.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.010>.

PRAZERES, Lady D. K. T.; ARAGÃO, Ticiana P.; BRITO, Samara A.; ALMEIDA, Cynthia L. F.; SILVA, Amanda D.; PAULA, Mirella M. F. de; FARIAS, Juliane S.; VIEIRA, Leucio D.; DAMASCENO, Bolívar P. G. L.; ROLIM, Larissa A. Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. (Fabaceae). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-23, 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2019/1983137>.

RAHMAN, Naimur; JEON, Miso; KIM, Yong-Sik. Methyl gallate, a potent antioxidant inhibits mouse and human adipocyte differentiation and oxidative stress in adipocytes through impairment of mitotic clonal expansion. **Biofactors**, v. 42, n. 6, p. 716-726, 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1310>.

RAMZAN, M., SANA, S., JAVAID, N. et al. Mitigation of bacterial spot disease induced biotic stress in *Capsicum annuum* L. cultivars via antioxidant enzymes and isoforms. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88797-1>

RAY, R.S.; KATYAL, Anju. Myeloperoxidase: bridging the gap in neurodegeneration. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 611-620, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.031>.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, Patricia; VARELA-LÓPEZ, Alfonso; FORBES-HERNÁNDEZ, Tamara Y.; GASPARRINI, Massimiliano; AFRIN, Sadia; CIANCIOSI, Danila; ZHANG, Jiaojiao; MANNA, Piera Pia; BOMPADRE, Stefano; QUILES, José L. Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil as Nutraceutical Tools for the Prevention and Management of Cancer and Cardiovascular Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1-21, 2018.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms19082305>.

RECASENS, Mireia, ALMOLDA, Beatriz., PÉREZ-CLAUSELL, Jesús.; CAMPBELL, Iain; GONZÁLEZ, Berta; CASTELLANO, Bernardo. Chronic exposure to IL-6 induces a desensitized phenotype of the microglia. **Journal of Neuroinflammation** v. 18, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02063-1>

RENAUD, Justine; MARTINOLI, Maria-Grazia. Considerations for the Use of Polyphenols as Therapies in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-25, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20081883>.

ROSALES, Carlos; DEMAUREX, Nicolas; LOWELL, Clifford A.; URIBE-QUEROL, Eileen. Neutrophils: their role in innate and adaptive immunity. **Journal of**

**Immunology Research**, v. 2016, p. 1-2, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1469780>.

SAMPAIO, Fábio C.; PEREIRA, Maria do Socorro V.; DIAS, Celidarque S.; COSTA, Vicente Carlos O.; CONDE, Nikeila C.O.; BUZALAF, Marília A.R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 289-294, 2009.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.034>.

SARKHEL, Sumana. Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract in mice. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 1-3, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.006>.

SAWADA, Luis Armando; MONTEIRO, Vanessa Sâmia da Conceição; RABELO, Guilherme Rodrigues; DIAS, Germana Bueno; CUNHA, Maura da; NASCIMENTO, José Luiz Martins do; BASTOS, Gilmar de Nazareth Tavares. Libidibia ferrea Mature Seeds Promote Antinociceptive Effect by Peripheral and Central Pathway: possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/508725>.

SCHUMACHER, Sarah M.; PRASAD, Sathyamangla V. Naga. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Heart Failure: an updated review. **Current Cardiology Reports**, v. 20, p. 1-20, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s11886-018-1067-7>.

SHARIFI-RAD, Javad; QUISPE, Cristina; CASTILLO, Carla Marina Salgado; CAROCA, Rodrigo; LAZO-VÉLEZ, Marco A.; ANTONYAK, Halyna; POLISHCHUK, Alexandr; LYSIUK, Roman; OLIINYK, Petro; MASI, Luigi de. Ellagic Acid: a review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1-24, 2022.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2022/3848084>.

SHIMIZU, Makoto. History and Current Status of Functional Food Regulations in Japan. **Nutraceutical and Functional Food Regulations n The United States And Around The World**, p. 257-263, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-405870-5.00015-3>.

SILVA, Cleivaldo Santos da; NUNES, Patrícia de Oliveira; MESCOUTO, Cleide Samara Tavares; MÜLLER, Regina Celi Sarkis; PALHETA, Dulcidéia da Conceição; FERNANDES, Kelly das Graças. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 751-754, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612010000300028>.

SILVA Luís Claudio Nascimento; MIRANDA, Rita de Cássia Mendonça; GOMES, Edelvio de Barros; MACEDO, Alexandre José. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research.**, v. 7, n. 32. p. 2358-2364, 2013.

SILVA, F. A.; FERREIRA, M. R.A.; SOARES, L. A. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, F. S. B.; MAIA, L. C. Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of field grown *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 36, p. 1110-1115, 2014. <http://dx.doi.org/10.5897/jmpr2013.5503>.

SILVA, Luciano B.; SANTOS NETO, Alexandrino P. dos; MAIA, Sandra M.A.s.; GUIMARÃES, Carolina dos Santos; QUIDUTE, Iliana L.; CARVALHO, Alessandra de A.T.; A. JÚNIOR, Severino; LEÃO, Jair C. The Role of TNF- $\alpha$  as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. **The Open Dentistry Journal**, v. 13, p. 332-338, 2019. <http://dx.doi.org/10.2174/1874210601913010332>.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Oxidants And Antioxidants Part A**, p. 152-178, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1).

SOUZA, Clayton F. de; LUCYSZYN, Neoli; FERRAZ, Fernando A.; SIERAKOWSKI, Maria Rita. Caesalpinia ferrea var. ferrea seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 641-647, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.031>.

STATISTA. Global plant-based food market size 2020-2030. 2021. <https://www.statista.com/statistics/1280394/global-plant-based-food-market-value/#:~:text=Global%20plant%2Dbased%20food%20market%20size%202020%2D2030&text=The%20global%20plant%2Dbased%20food,worth%2044.2%20billion%20U.S.%20dollars>. Acesso em: 19/03/2022.

STATISTA. Size of the worldwide functional food and beverage market 2020-2028. 2021. <https://www.statista.com/statistics/1264080/functional-food-and-beverages-global-market-size/>. Acesso em: 19/03/2022.

SVONJA-PAREZANOVIC, Gordana; LALIC-POPOVIC, Mladena; GOLOCORBINKON, Svetlana; TODOROVIC, Nemanja; PAVLOVIC, Nebojsa; JOVICIC-BATA, Jelena. The effect of magnesium stearate and sodium starch glycolate on powder flowability. **Acta Periodica Technologica**, p. 304-310, 2019. <http://dx.doi.org/10.2298/apt1950304s>.

SWINBANKS, David; O'BRIEN, John. Japan explores the boundary between food and medicine. **Nature**, v. 364, n. 6434, p. 180-180, 1993. <http://dx.doi.org/10.1038/364180a0>.

TANG, W.H. Wilson; BRENNAN, Marie-Luise; PHILIP, Kiran; TONG, Wilson; MANN, Shirley; VAN LENTE, Frederick; HAZEN, Stanley L. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. **The American Journal of Cardiology**, v. 98, p. 796-799, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.04.018>.

TRENTIN, Danielle da Silva; GIORDANI, Raquel Brandt; ZIMMER, Karine Rigon; SILVA, Alexandre Gomes da; SILVA, Márcia Vanusa da; CORREIA, Maria Tereza dos Santos; BAUMVOL, Israel Jacob Rabin; MACEDO, Alexandre José. Potential of

medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 327-335, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>.

UEDA H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v.8, n. 5, p. 377-381. 2002.

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

UNITED NATIONS. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS) eighth revised edition. New York and Geneva: 2019.

USP 30 NF 25. **United States Pharmacopoeia & National Formulary**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2007.

VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L.A.L.; SÁ, M.D.C.; SOUZA, T.P.; WANDERLEY, A.G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1533-1541, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.08.059>.

WANG, Chang Rong; ZHOU, Rong; NG, Tzi Bun; WONG, Jack Ho; QIAO, Wen Tao; LIU, Fang. First report on isolation of methyl gallate with antioxidant, anti-HIV-1 and HIV-1 enzyme inhibitory activities from a mushroom (*Pholiota adiposa*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 626-637, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.023>.

WANG, Min-Jun; CHEN, Fei; LAU, Joseph T y; HU, Yi-Ping. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 5, p. 1-7, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.167>.

WANG, Yulin; CHEN, Jia; WANG, Damao; YE, Fayin; HE, Yonglin; HU, Zicong; ZHAO, Guohua. A systematic review on the composition, storage, processing of bamboo shoots: focusing the nutritional and functional benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 71, p. 104015, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2020.104015>.

WATERS CORPORATION. Waters 996 Photodiode Detector: Peak Purity I What is peak purity analysis? U.S.A., 1998.

YUSTE, Jose Enrique; TARRAGON, Ernesto; CAMPUZANO, Carmen María; ROS-BERNAL, Francisco. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 1-13. 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00322>

YEH, Yu-Te; CHO, Yan-Yu; HSIEH, Shu-Chen; CHIANG, An-Na. Chinese olive extract ameliorates hepatic lipid accumulation *in vitro* and *in vivo* by regulating lipid metabolism. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-13, 2018. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/s41598-018-19553-1>.

XIN, Xing; ESSIEN, Sinemobong; DELL, Kiri; WOO, Meng Wai; BAROUTIAN, Saeid. Effects of Spray-Drying and Freeze-Drying on Bioactive and Volatile Compounds of Smoke Powder Food Flavouring. **Food And Bioprocess Technology**, v. 15, n. 4, p. 785-794, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-022-02779-3>.

ZHAO, Cai-Ning; TANG, Guo-Yi; CAO, Shi-Yu; XU, Xiao-Yu; GAN, Ren-You; LIU, Qing; MAO, Qian-Qian; SHANG, Ao; LI, Hua-Bin. Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, p. 1-14, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox8070215>.

ZHAO, Chunjian; LI, Chunying; LIU, Shuaihua; YANG, Lei. The Galloyl Catechins Contributing to Main Antioxidant Capacity of Tea Made from *Camellia sinensis* in China. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/863984>.

ZHAO, Haifeng; DONG, Jianjun; LU, Jian; CHEN, Jian; LI, Yin; SHAN, Lianju; LIN, Yan; FAN, Wei; GU, Guoxian. Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7277-7286, 2006. <http://dx.doi.org/10.1021/jf061087w>.

ZHAO, Huakan; WU, Lei., YAN, Guifang; CHEN, Yu; ZHOU, Mingyue; WU, Yongzhong; LI, Yongsheng. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal transduction and targeted therapy**. v. 6, p. 1-46, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>

ZHOU, Mengshi; XU, Rong; KAELBER, David C.; GURNEY, Mark E. Tumor Necrosis Factor (TNF) blocking agents are associated with lower risk for Alzheimer's disease in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. **Plos One**, v. 15, n. 3, p. 1-15, 2020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229819>.