

**PATRÍCIA APARECIDA FIGUEIREDO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E  
FOTOPROTETOR DE EXTRATOS DE *Hymenaea courbaril* L. E  
*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.**

**ASSIS**

**2014**

**PATRÍCIA APARECIDA FIGUEIREDO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E  
FOTOPROTETOR DE EXTRATOS DE *Hymenaea courbaril* L. E  
*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

ASSIS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca do Instituto Educacional de Assis – I E D A

F475a Figueiredo, Patrícia Aparecida  
Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor de extratos de *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne / Patrícia Aparecida Figueiredo. Assis, 2014  
70 f.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.

Orientador: Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

1. Plantas medicinais. 2. Jatobá. 3. Atividade antioxidante. 4. Fotoproteção. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 634.6

Disse a rosa para o pequeno príncipe:  
“- É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser  
conhecer as borboletas. Dizem que são tão belas!”

Disse a raposa para o pequeno príncipe:  
“- Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua  
rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

Dedico este trabalho à memória de minha querida avó Eufrazia Ferreira Maia Figueiredo, que mesmo na simplicidade de não ter frequentado a escola, soube transmitir toda sua sabedoria da vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e Maria por me guiar sempre nas escolhas dos melhores caminhos.

Aos meus pais, Tadeu e Célia pelo amor, apoio e dedicação sem os quais nada seria possível e ao meu irmão José Antônio (*in memoriam*), minha eterna inspiração.

Ao meu orientador, professor Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, por seu apoio e amizade, além de dedicação e atenção nas revisões e sugestões, fatores que contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Jackson, pelo carinho, amor e compreensão.

À professora Dra. Lucinéia dos Santos, a qual foi fundamental para que eu ingressasse no mestrado. Obrigada por tudo, jamais vou esquecer!

Aos amigos Márcio e em especial Cidinha, pela ajuda nas coletas das plantas e por sempre acreditar no meu potencial e nunca me deixar desanimar.

Aos professores que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca.

Ao professor Dr. Rondinelli Donizetti Herculano por sempre me receber de portas abertas em seu laboratório.

Ao professor Dr. Valdecir Farias Ximenes e doutoranda Luana Chiquetto Paracatú, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências de Bauru, UNESP-Bauru, por todo o apoio na realização do teste ORAC-FL.

Aos colegas do mestrado, em especial à Kamille, Pamela, Vanessa, Gustavo e Larissa, por compartilharem tanto os momentos de desespero, como os de alegrias e sucessos ao longo do curso.

Aos colegas de laboratório, Valter e Gustavo Martins pela troca de conhecimento e convívio.

Aos funcionários da Universidade Estadual Paulista, em especial ao Gilberto, Allan e Amábile, pela disposição e auxílios prestados.

À todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Processo 2011/15430-5), pelo apoio financeiro concedido.

À todos que ajudaram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
Radicais livres e estresse oxidativo.....	12
Câncer.....	13
Radiação solar e câncer de pele.....	14
Antioxidantes.....	16
Compostos fenólicos.....	18
Gênero <i>Hymenaea</i> .....	21
<i>Hymenaea courbaril</i> L.....	22
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>Capítulo I. Atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies de <i>Hymenaea</i> (jatobá)</b> .....	35
Resumo.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38
Resultados e discussão.....	42
Conclusão.....	51
Referências.....	51
<b>Capítulo II. Atividade citotóxica de <i>Hymenaea courbaril</i> sobre células tumorais</b> .....	57
Resumo.....	58
Introdução.....	59
Material e Métodos.....	59
Resultados.....	61
Discussão.....	66
Conclusão.....	67
Referências.....	67
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	70

FIGUEIREDO, Patrícia Aparecida. **Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor de extratos de *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Assis, 2014.

## RESUMO

*Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stigonocarpa* são plantas medicinais nativas do Brasil. Conhecidas popularmente como "jatobá" são utilizadas largamente na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades, tais como problemas respiratórios, inflamações, dores no estômago, e como cicatrizante. Essas espécies apresentam potencial valor terapêutico em virtude da presença de diversos metabólitos secundários como flavonoides e terpenoides. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante e fotoprotetora dos extratos hidroetanólicos e metanólico de partes vegetais (folhas, frutos casca, polpa e sementes) de *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*, bem como determinar seu conteúdo de fenóis e flavonoides totais. Além disso, foi avaliado também a citotoxicidade do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*. A atividade antioxidante dos extratos foi realizada pelos testes do seqüestro de radicais livres, usando o DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), pelo teste do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e pelo ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL). O teor de fenóis e flavonoides totais foram determinados por métodos espectrofotométricos. A citotoxicidade do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* sobre células de melanoma murino (B16F10-Nex2) foi investigado pelo teste da viabilidade celular utilizando o método de exclusão do corante azul de Tripán. O fator de fotoproteção solar (FPS) foi determinado por método *in vitro*. Os resultados demonstraram que, exceto os extratos das polpas, todos os extratos de ambas as espécies apresentaram atividade antioxidante para os testes DPPH e FRAP, sendo que o extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou maior atividade antioxidante com  $EC_{50}=149,43\mu\text{g/mL}$  para o teste do DPPH e  $3073,51\pm 66,73\mu\text{M}$  Equivalente Trolox (ET) /g de extrato para o teste FRAP. O extrato hidroetanólico da folha de *H. stigonocarpa* apresentou maior potencial antioxidante (0,56 Equivalente Trolox) para o teste ORAC-FL. O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou maior teor de fenóis e flavonoides totais ( $464,34\pm 04,62$  e  $442,25\pm 18,03$  respectivamente). Quanto a determinação do FPS das emulsões contendo apenas o extrato, maior valor foi observado para a emulsão do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* (2,20). Com relação ao teste de citotoxicidade os resultados demonstraram que o extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* induziu a morte celular, o qual na concentração de  $50\mu\text{g/mL}$  reduziu em mais de 50% o número de células de melanoma murino B16F10-Nex2 para a período de 24h e 91% para o período de 48h de exposição. Os resultados do presente estudo indicaram que o extrato hidroetanólico da semente da espécie *H. courbaril* apresentou alta atividade antioxidante nos testes DPPH e FRAP, assim como a presença de compostos fenólicos. Além disso, demonstrou também atividade citotóxica, tornando-se assim uma importante fonte de compostos com atividade biológica.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Jatobá. Atividade antioxidante. Fotoproteção. Citotoxicidade.



FIGUEIREDO, Patrícia Aparecida. **Evaluation of antioxidant, cytotoxic and photoprotective potential of *Hymenaea courbaril* L. and *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne extracts.** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Assis, 2014.

#### ABSTRACT

*Hymenaea courbaril* and *Hymenaea stigonocarpa* are native medicinal plants of Brazil. Popularly known as "jatobá-da-mata" and "jatobá-do-cerrado" are widely used in folk medicine to treat various diseases, the different parts of the plants in the form of tea or syrup are used to treat respiratory problems, inflammation, stomach pain, and how healing. These species have potential therapeutic value due to the presence of various secondary metabolites such as flavonoids and terpenoids. Therefore, the objective this study was to evaluate the antioxidant and photoprotective activity of the hydroethanolic and methanolic extracts from plant parts (leaves, fruit rind, pulp and seed) of *H. courbaril* and *H. stigonocarpa*, as well as their content of total phenols and flavonoids. Moreover, it was also evaluated the cytotoxicity of the hydroethanolic extract from seeds of *H. coubaril*. The antioxidant activity of the extracts was performed by free radical scavenging using DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), antioxidant power reduction of iron (FRAP) and the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-FL) assays. The content of total phenols and flavonoids was determined by spectrophotometric methods. The cytotoxicity of the hydroethanolic extract from seeds of *H. coubaril* on murine melanoma (B16F10-Nex2) cells was investigated by cell viability test using the Trypan blue dye exclusion method. The sun protection factor (SPF) was determined by *in vitro* method. The results showed that, except for pulp extracts, all extracts of both species showed antioxidant activity for DPPH and FRAP assays, and the hydroethanolic extract from seeds of *H. coubaril* presented the highest antioxidant activity with EC<sub>50</sub> = 149.43 µg/mL for DPPH assay and 3073.51 ± 66.73 µM Trolox Equivalent (TE)/ g extract for the FRAP assay. The hydroethanolic extract from leaf of *H. stigonocarpa* showed the highest antioxidant potential (0.56 Trolox equivalente) for the ORAC-FL assay. The hydroethanolic extract from seeds of *H. coubaril* showed the highest content of total phenols and flavonoids (464.34 ± 04.62 and 442.25 ± 18.03 respectively). Regarding FPS of emulsions containing only the extract, the highest value was observed for the emulsion of hydroethanolic extract from seeds of *H. coubaril* (2.20). With respect to the cytotoxicity assay, the results showed that the hydroethanolic extract from seeds of *H. courbaril* induced cell death, in which the concentration of 50 µg/mL reduced more than 50% the number of cells of murine melanoma B16F10-Nex2 for the period 24h and 91% for the period of 48h exposure. The results of this study indicated that the hydroethanolic extract from seed of the specie *H. courbaril* showed high antioxidant activity in DPPH and FRAP assays, as well as the presence of phenolic compounds. Moreover, it also showed cytotoxic activity, thus becoming an important source of compounds with biological activity.

Keywords: Medicinal plants. Jatoba. Antioxidant activity. Photoprotection. Cytotoxicity.

## INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas pelo homem para fins medicinais é milenar, há registros que datam 1500 a. C., como no manuscrito egípcio “Ebers Papyrus”, onde continha informações sobre prescrições médicas e de drogas, sendo algumas espécies utilizadas até hoje entre elas, Ginseng (*Panax* spp.) e *Cassia* spp. (FIRMO et al., 2011). Ao longo da história, a humanidade foi utilizando e modificando os recursos naturais em seu próprio benefício e assim, foi descobrindo as propriedades curativas e tóxicas das plantas (DEVIIENNE et al.,2004).

A comprovação científica dos efeitos terapêuticos das plantas tem despertado o interesse dos pesquisadores, na busca por mecanismos alternativos para o tratamento, cura e prevenção de diversas doenças, pois a maioria das plantas medicinais são utilizadas com base no conhecimento popular, carecendo de estudos farmacológicos e toxicológicos, além da identificação dos compostos responsáveis por tais atividades (MACIEL et al., 2002).

São várias as utilidades dos produtos naturais, sejam como suplementos na alimentação, intermediários usados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (MOTANARI e BOLZANI, 2001), ou ainda, utilizados *in natura*, sendo as plantas consideradas uma das principais fontes de compostos biologicamente ativos. No decorrer dos anos, o estudo destes produtos tem contribuído enormemente para o desenvolvimento de diversos fármacos com importantes aplicações terapêuticas e muitos utilizados na medicina moderna, onde grande parte são derivados direta ou indiretamente de plantas superiores (CRAGG e NEWMAN, 2013).

No entanto, apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado. O Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, abriga aproximadamente 20% de toda a biodiversidade do planeta, isto inclui cerca

de 50.000 espécies de plantas, tornando-o uma fonte potencial de novas substâncias com ações farmacológicas (OLIVEIRA et al., 2012).

Nesse sentido foi escolhida para a realização deste estudo duas espécies nativas do Brasil, *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stigonocarpa* conhecidas popularmente como jatobá. Alguns trabalhos científicos têm demonstrado o potencial destas espécies para a indústria civil, farmacêutica e de alimentos (Vieira e Martins, 2000; Silva et al., 2001; Souza e Felfili, 2006).

Diante do potencial botânico do Brasil e da necessidade de se encontrar novas evidências de atividade biológica, buscou-se realizar um trabalho que viabilize um maior conhecimento das espécies existentes no país, especificamente das espécies de *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stigonocarpa*. Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar a atividade antioxidante e fotoprotetora dos extratos das folhas, cascas dos frutos, polpas e sementes de *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stigonocarpa*, além de avaliar também a atividade citotóxica do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos ou moléculas com átomos que contêm um elétron não emparelhado na última camada eletrônica, fato que os tornam instáveis e altamente reativos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1991). Eles são gerados por fontes endógenas ou exógenas, sendo as fontes endógenas relacionadas às reações metabólicas como a oxidação nas mitocôndrias durante a respiração celular, a fagocitose durante o processo inflamatório e a atividade de enzimas como oxidases, lipoxigenases e peroxidases. Já as fontes exógenas são: a poluição do ar, utilização de medicamentos, pesticidas, tabagismo, dieta alimentar e radiação ultravioleta (SOARES, 2002; BIANCHI e ANTUNES, 1999; HIRATA et al., 2004).

Os radicais livres oriundos de fontes endógenas são constantemente formados no organismo humano durante processos metabólicos, atuando na regulação de mecanismos relacionados a processos como resposta imune, proliferação celular, inflamação e morte celular, em reações bioquímicas, desempenhando assim funções importantes no metabolismo (JENSEN, 2003; VALKO et al., 2006; DEMPLE, 2010; PINHO et al., 2010; REUTER et al., 2010). Entretanto, quando os radicais livres estão em excesso e há uma deficiência no sistema protetor, ocorre um desequilíbrio entre pró-oxidante/antioxidante, caracterizando o estresse oxidativo (REUTER et al., 2010; RASHID et al., 2013).

Entre os principais radicais livres estão os metais de transição e as espécies derivadas do oxigênio. Os radicais livres são denominados de “Espécies reativas de oxigênio” (EROs), pois a maioria deriva dele e os que não derivam do oxigênio são chamados de “Radicais Livres de Oxigênio”. As EROs estão divididas em dois

grupos, os radicalares: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ); e os não radicalares: ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) os quais se referem a moléculas derivadas do oxigênio e que são capazes de gerar radicais livres (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BIANCHI e ANTUNES, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BARREIROS et al., 2006).

O estado de estresse oxidativo e seus reativos podem causar danos e alterações nas células, pois os mesmos têm meia-vida muito curta, o que dificulta o seqüestro desses *in vivo* (BARREIROS, et al., 2006), eles agem sobre os componentes celulares, inativando proteínas ao oxidarem seus grupamentos sulfidrilas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), se ligando aos ácidos nucléicos que acarretam em aberrações cromossômicas danificando o DNA, danificam membranas, desencadeando reações de oxidação que afetam a sua estrutura e integridade funcional (SOARES, 2002; VALKO et al., 2006). Entre as doenças associadas às espécies reativas de oxigênio, estão doenças do coração, doenças relacionadas ao envelhecimento, como Alzheimer e doença de Parkinson, aterosclerose e carcinogêneses (GIASSON et al., 2002; PINHO et al., 2010; WANG et al., 2013; STRATHEARN et al., 2014).

## **Câncer**

De acordo com estimativas da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial de Saúde, 8,2 milhões de pessoas morreram de câncer em todo o mundo, no ano de 2012 (WHO, 2014). No Brasil, estima-se para o ano de 2014, a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2014).

Câncer é um nome genérico dado a um grande conjunto de doenças que tem em comum o crescimento descontrolado de células transformadas, as quais invadem tecidos e órgãos, podendo afetar qualquer parte do corpo (INCA, 2014; Harput et al., 2012). Os diferentes tipos e denominações de câncer ocorrem em função dos vários tipos de células do corpo, se ele tem início no tecido epitelial por exemplo, recebe o nome de carcinoma, caso se inicie em tecidos conjuntivos é chamado de sarcoma (INCA, 2014).

A ciência enfrenta ainda muitos obstáculos para a cura do câncer. Um dos principais problemas é a resistência adquirida pelas células tumorais em relação aos agentes quimioterápicos utilizados atualmente, além disso, eles apresentam muitos efeitos adversos o que prejudica o tratamento (SARASWATHY e GONG, 2013; RAVISHANKAR et al., 2013). Diante disso, pesquisadores tem buscado fontes alternativas para o tratamento do câncer, como os produtos naturais, principalmente os de origem vegetal (STEENKAMP e GOUWS, 2006; ASSAF et al., 2013). A síntese de substâncias fundamentada nos agentes naturais com propriedades antitumorais, principalmente os alcaloides, tem-se mostrado promissora no desenvolvimento de novas drogas para o uso clínico, como por exemplo, as drogas anticâncer desenvolvidas a partir dos alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina, e o isolamento do composto citotóxico podofilotoxina (CRAGG e NEWMAN, 2005).

### **Radiação solar e câncer de pele**

O sol emite diversos tipos de radiação e, dentre estes, destaca-se a radiação ultravioleta por exercer efeitos significativos sobre a pele. Ela é composta por 3 faixas de comprimentos de onda: UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (100-

290nm), sendo esta última absorvida antes mesmo de atingir a superfície terrestre (JANSEN et al., 2013).

A radiação solar apresenta efeitos benéficos e maléficos a saúde, sendo que o fator determinante de sua ação é a quantidade de radiação e o tempo de exposição. Entre os fatores benéficos, destaca-se a estimulação da formação de vitamina D3, a qual é importante na fixação de cálcio nos ossos. Além disso, atua também no funcionamento do sistema imunológico (MARQUES et al., 2010; CASTRO, 2011). Com relação aos efeitos maléficos, muitos estudos tem demonstrado que os danos no DNA causados pela exposição crônica aos raios UV está associada a fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento, levando a formação de diversos tipos de cânceres de pele incluindo melanoma, carcinoma basocelular e espinocelular (AFAQ, 2011, CESTARI et al., 2012, JANSEN et al., 2013; AGBAI et al., 2014), além disso, outro efeito relacionado a radiação é a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais são extremamente danosas as moléculas essenciais ao organismo como lipídios, proteínas e DNA (AFAQ, 2011; BALOGH et al., 2011).

O DNA é um alvo da radiação ultravioleta devido a sua estrutura molecular que absorve radiações nessa faixa espectral. A radiação induz modificações fotoquímicas nas pirimidinas resultando em dímeros de ciclobutano e outros subprodutos, isso leva a mudanças estruturais na hélice do DNA, interrompendo assim o processo de replicação (BALOGH et al., 2011, RAZA et al., 2013). As células possuem sistemas de defesa, como por exemplo, a fotorreativação enzimática, processo no qual enzimas por meio de reações fotoquímicas restauram a estrutura do DNA, entretanto, quando a exposição à radiação ultravioleta é prolongada esses sistemas se tornam ineficientes (FRIEDBERG, 1999). Em alguns casos pode resultar na morte celular, porém, pode também ocorrer um silenciamento

gênico como por exemplo de genes supressores de tumor o que resultará na formação de melanoma (CHOULDHARI et al., 2014).

O câncer de pele é um dos tipos de canceres mais frequente no Brasil. Representa aproximadamente 25% dos casos registrados no país, sendo o melanoma o responsável pelo maior índice de mortalidade devido ao difícil prognóstico dessa doença (INCA, 2014).

### **Antioxidantes**

Muitos estudos têm demonstrado a importância do consumo de alimentos ricos em antioxidantes, pois estes diminuem os riscos a várias doenças nas quais o estresse oxidativo está relacionado como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (REZAIRE et al., 2014), sendo os vegetais reconhecidos como importante fonte de antioxidante e os compostos fenólicos um dos principais grupos responsáveis por esta propriedade (RICE-EVANS et al., 1997; BOUDET, 2007).

Os antioxidantes são definidos como substâncias que, em baixa concentração quando comparadas a do substrato oxidável, inibem ou previnem a oxidação de um substrato de maneira eficaz (SIES e STAHL, 1995). A atividade antioxidante de um composto é influenciada por diversos fatores como a concentração do composto, seu potencial como agente doador de elétron ou hidrogênio, sua reatividade com outros antioxidantes, seu potencial de quelação de metais de transição entre outros (RICE-EVANS et al., 1997).

Os antioxidantes atuam sobre diferentes mecanismos de defesa, os quais tem a função de inibir ou reduzir os danos causados pela ação das espécies reativas e, de acordo com determinado mecanismo, podem ser considerados antioxidantes primários, quando atuam bloqueando reações em cadeia por meio da doação de



elétrons ou hidrogênio às espécies reativas, ou antioxidantes secundários quando atuam retardando a etapa de autoxidação, por meio de complexação com metais e decomposição de hidroperóxidos a espécies não radicalares (RAMALHO e JORGE, 2006; LUZIA e JORGE, 2009; DEL RÉ e JORGE, 2012,). Outros mecanismos incluem a reparação de lesões causadas pelas espécies reativas, corrigindo danos no DNA e reconstituindo membranas celulares, ou ainda um aumento da síntese de enzimas antioxidantes como uma resposta do organismo (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Eles podem ser classificados em sistemas antioxidante enzimático e não enzimático. Entre os antioxidantes enzimáticos temos a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase. A superóxido dismutase catalisa a conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, a catalase e a glutatona peroxidase atuam com o mesmo propósito o de reduzir o acúmulo de peróxido de hidrogênio, no qual a catalase converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água e a glutatona peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BIANCHI e ANTUNES, 1999; BARREIROS et al., 2006; LU, 2013; PANDYA et al., 2013). A ação destas enzimas é de grande importância visto que o peróxido de hidrogênio por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss na presença dos metais cobre e ferro resulta na produção do radical hidroxila (JENSEN, 2003; BARBOSA et al, 2010).

Em adição ao sistema endógeno de defesa temos o sistema não enzimático composto principalmente por antioxidantes de origem dietética, entre eles, vitaminas, minerais e compostos secundários (CERQUEIRA et al., 2007). As vitaminas (C e E) por meio de doação de hidrogênio convertem espécies reativas em espécies mais estáveis, os minerais (zinco) inibem a NADPH-oxidase, enzima esta, envolvida na

produção de espécies reativas e atuam como cofator da enzima antioxidante superóxido dismutase, os carotenóides (beta-caroteno, alfa-caroteno e licopeno), atuam sobre oxigênio singlete impedindo assim reações de propagação da peroxidação lipídica e compostos fenólicos (flavonóides), os quais podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (BIANCHI e ANTUNES, 1999; BARBOSA et al., 2010, DEL RÉ e JORGE, 2012, ABBAS et al., 2014).

### **Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza, sendo constituinte de uma grande variedade de vegetais. Eles são originários do metabolismo secundário das plantas, principalmente por duas rotas metabólicas: a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico, sendo a via do ácido chiquímico responsável pela síntese da maioria dos polifenóis em plantas (Figura 1) (SIMÕES et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2004).

O teor e o perfil dos compostos fenólicos podem ser influenciados por diversos fatores como espécie, estágio de crescimento da planta e estresse ambiental (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Esses compostos atuam na adaptação da planta a condições de estresse ambiental, como alterações climáticas, radiação ultravioleta e herbivoria, além de desempenharem um importante papel como atrativo de polinizadores e dispersores de frutos (TAIZ e ZEIGER, 2004; CHEYNIER et al., 2013).

Os compostos fenólicos possuem pelo menos um anel aromático, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas (SOARES, 2002; MALACRIDA e MOTTA, 2005). Podem ser encontrados na forma livre ou conjugada; quando conjugados se encontram frequentemente sob a forma de ésteres ou amidas (MIRA et al, 2008).

Esses compostos são classificados de acordo com o número de anéis fenólicos que possuem e do tipo de elementos estruturais que se ligam a estes anéis ou entre eles, sendo classificados em ácidos fenólicos, estilbenos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides entre outros (SIMÕES et al., 2001)

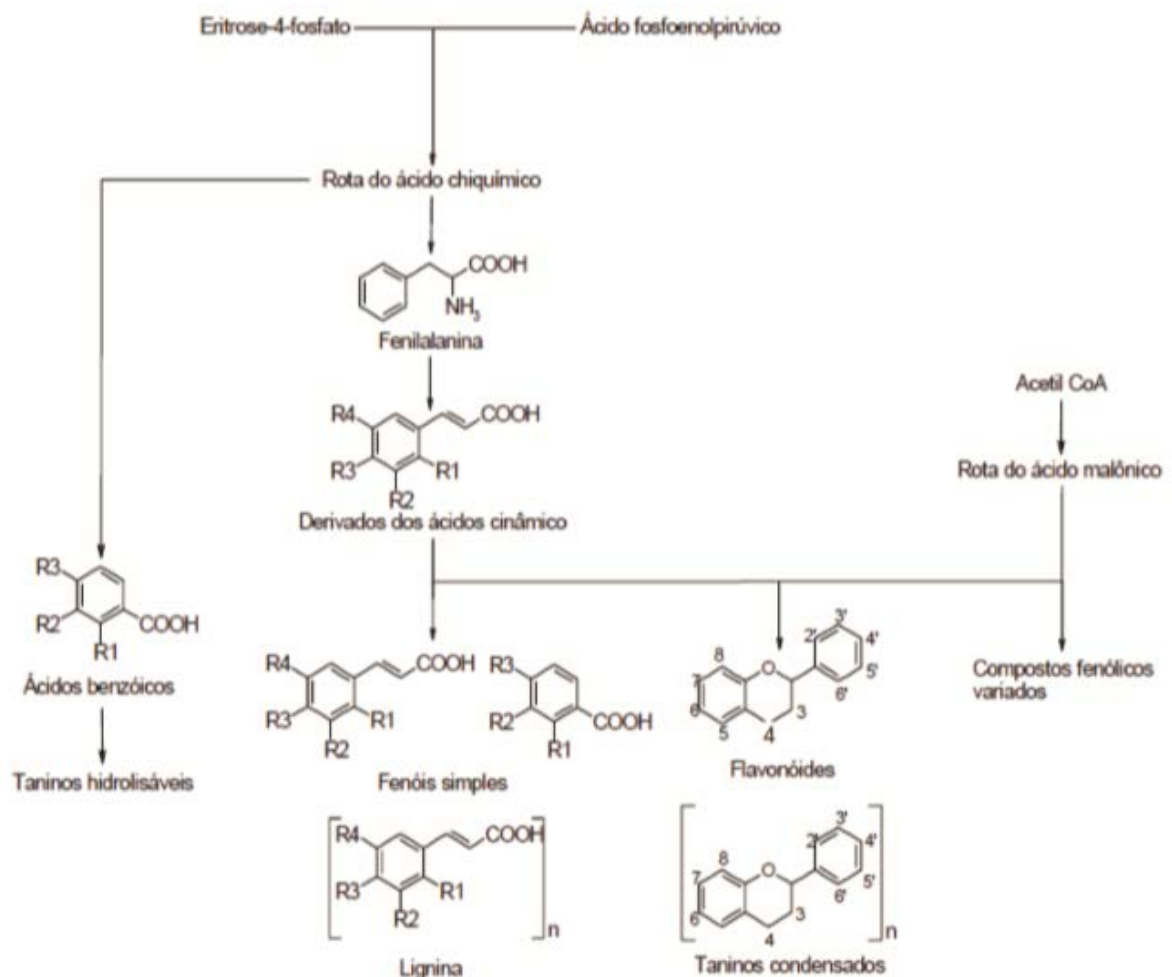


Figura 1. Rota biossintética dos compostos fenólicos.

Dentre os compostos fenólicos destaca-se os flavonoides, que estão amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores das plantas (HEIM et al, 2002). Os flavonoides apresentam uma estrutura básica (C6-C3-C6) constituída de dois anéis aromáticos e ligados por um anel pirano (RICE-EVANS, 2004) (Figura 2). Frequentemente ocorrem como agliconas livres ou glicosídeos conjugados

(RAVISHANKAR et al., 2013), a glicação leva a uma maior solubilidade em água permitindo assim o armazenamento no vacúolo (RICE-EVANS, 2004).

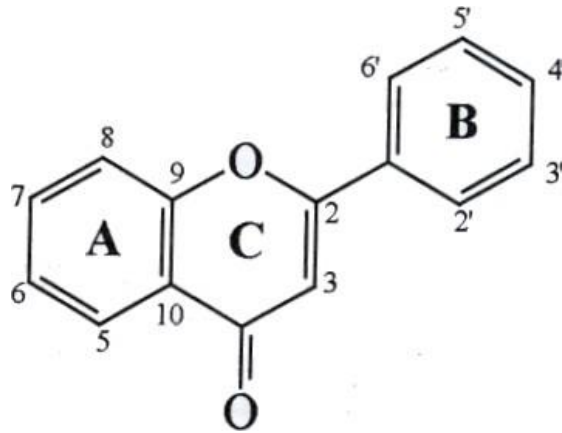


Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides (SIMÕES et al., 2001).

De acordo com as substituições em sua estrutura eles podem ser divididos em várias classes tais como, flavonóis (quercetina), flavonas (rutina), flavanóis (catequina), flavanonas (naringenina), isoflavonas (genisteína) e antocianinas (cianidina) (Figura 3) (SCALBERT et al., 2005).

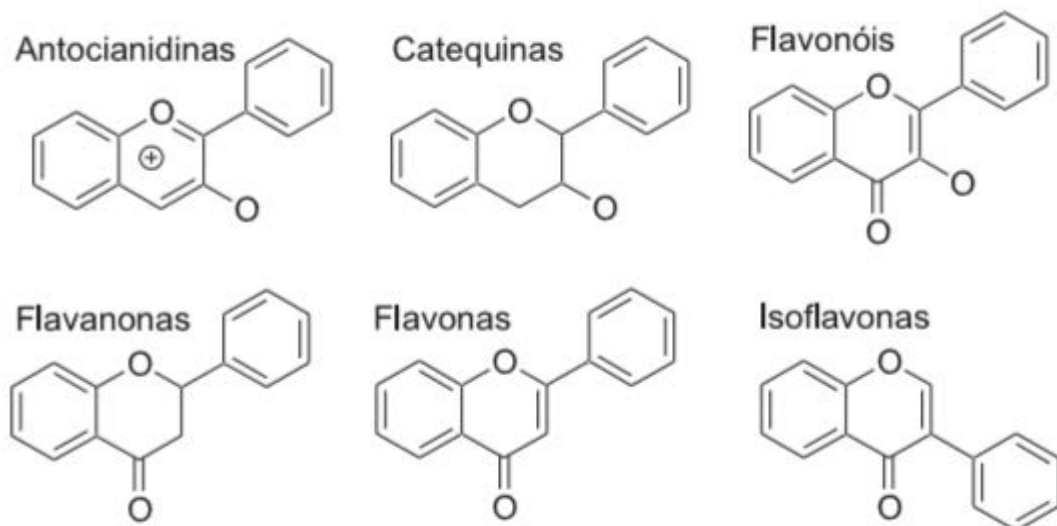


Figura 3. Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (MARÇO et al., 2008).

Uma característica interessante dos flavonoides é sua capacidade de absorção da radiação ultravioleta, protegendo assim as plantas contra os danos causados por essa radiação (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). Além disso, eles atuam também na proteção das plantas contra micro-organismos, insetos e outros animais herbívoros, e também na relação harmônica de insetos e plantas por meio da atração de insetos polinizadores (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Os efeitos benéficos dos flavonoides a saúde residem na sua capacidade antioxidante por meio da transferência de elétrons as espécies reativas de oxigênio, na capacidade queladora de metais e inibidora de enzimas oxidantes, além de ativar enzimas antioxidantes (HEIM et al., 2002). Muitos estudos têm demonstrado os efeitos dos flavonoides sobre os sistemas biológicos, tais como atividade anti-inflamatória, vasodilatadora, antiplaquetária e antimicrobiana (COUTINHO et al., 2009; WOODMAN, 2009, FENG et al., 2012, FU et al., 2013).

### **Gênero *Hymenaea***

O gênero *Hymenaea* é composto atualmente por 14 espécies distribuídas desde o México até a América do Sul podendo ser encontrada também na costa leste da África. No Brasil ocorrem 12 espécies (PESTANA, 2010). Esse gênero é caracterizado entre as leguminosas como um fruto indeiscente, volumoso, cilíndrico ou achatado e apresenta arilo farináceo (BARROSO et al., 1999).

As espécies deste gênero são conhecidas por produzirem resinas, muito utilizada na fabricação de vernizes, cola, incenso e remédios caseiros (BEZERRA et al., 2013; MARANHÃO et al., 2013). Estas resinas são ricas em terpenos e estes são encontrados de acordo com o órgão de produção. Sesquiterpenos são encontrados na resina presente nas folhas, enquanto no tronco e raízes de árvores maduras a

resina é constituída principalmente por diterpenoides (CUNNINGHAM et al., 1973; TAMAYO et al., 2008, NOGUEIRA et al., 2001). Suas espécies fornecem uma madeira de excelente qualidade, utilizadas na fabricação de mobílias e barcos. Além disso, são utilizadas também na recuperação de áreas degradadas, devido à pouca exigência com relação a fertilidade e umidade do solo, a polpa farinácea do fruto é empregada na produção de farinhas, doces, bebidas e biscoitos, pois apresenta elevada capacidade de absorção de água além de alto teor de fibras ricas em substâncias antioxidantes (MATUDA e NETTO, 2005; TAMAYO et al., 2008; BEZERRA et al., 2013).

As espécies de *Hymenaea* são utilizadas também para o tratamento de várias enfermidades. As diferentes partes das plantas sob a forma de chá ou xarope são utilizadas para tratamento de problemas respiratórios, inflamações, dores no estômago e como cicatrizante (SILVA et al., 2012).

### ***Hymenaea courbaril* L.**

A espécie *H.courbaril* apresenta porte arbóreo de cerca de 15m de altura, possui tronco cilíndrico e reto com aproximadamente 2m de diâmetro; casca lisa, dura e cinzenta; folhas alternadas e pecioladas, flores em panículas e frutos indeiscentes, medindo de 10 a 20cm de comprimento (JAYAPRAKASAM et al., 2007).

Em *H. courbaril* var *stilbocarpa* foi encontrado dois diterpenos no extrato da casca da semente, os quais apresentaram atividade biológica (NOGUEIRA, et al., 2001). Além disso, foram isolados desta mesma espécie os compostos biscumarinas (hymenaína e ipomopsina), os quais apresentaram atividade seqüestradora de radicais livres (SIMÕES, 2009), ácidos isolados do fruto (crotomaclina, ácido labda-

13E-en-8-ol-15-óico e ácido (13E)-labda 7, 13 dien-15-óico) apresentaram atividade anti-inflamatória por meio de inibição das enzimas ciclooxygenases e da peroxidação lipídica (JAYAPRAKASAM, et al., 2007).

### ***Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne**

A espécie *Hymenaea stigonocarpa* é conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado, podendo ser encontrada na Caatinga e Cerrado, ocorrendo em solos de fertilidade química baixa e secos (CARVALHO, 2007). Esta espécie apresenta porte arbóreo de cerca de 9m, tronco tortuoso com 30 a 50cm de diâmetro, as cascas medem até 3cm de espessura apresentando coloração pardo-avermelhada, as folhas são alternadas, compostas com 2 folíolos glabros medindo de 8 a 15cm, o fruto é um legume seco, marrom de 6 a 18cm com polpa farinácea amarelada. (CARVALHO, 2007; LORENZI, 2002).

Na medicina popular, diversas partes da *H. stigonocarpa* (casca do caule, fruto, resina e polpa do fruto), são utilizadas para o tratamento de distúrbios respiratórios, anemia, sinusite, úlcera, asma e diarreia, são empregadas ainda, como cicatrizante, fortificante, estimulante de apetite, expectorante, anti-inflamatório e vermífugo (VIEIRA e MARTINS, 2000; SOUZA e FELFILI, 2006).

Estudos fitoquímicos e da atividade biológica de *H. stigonocarpa* ainda são insipientes, porém, atividades como antioxidante, antitermitica, gastroprotetora e antidiarreica têm sido demonstrada para esta espécie (MARANHÃO et al., 2013; ORSI et al, 2012). Além disso, um estudo realizado por Silva et al. (2001) demonstrou que a farinha do fruto desta espécie é rica em fibra alimentar, com predominância de fibras insolúveis.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, S. R. et al. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Food chemistry**, v. 147, p. 10–16, 2014.

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, p. 144–51, 2011.

AGBAI, O. N. et al. Skin cancer and photoprotection in people of color: A review and recommendations for physicians and the public. **Journal of the American Academy of Dermatology**, p.1-15, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2013.11.038>

ASSAF, A. M. et al. Anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial activities of plant extracts used against hematological tumors in traditional medicine of Jordan. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, p. 728–736, 2013.

BALOGH, T. S. et al. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732–742, 2011.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113–123, 2006.

BARROSO, G. M. et al. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999, 443 p.



BEZERRA, G. P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 62–69, 2013.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOUDET, A. -M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722–2735, 2007.

CARVALHO, P. E. R. **Jatobá-do-cerrado-*Hymenaea stigonocarpa***. Colombo: Embrapa Florestas. 2007. 8p. (Circular técnica n.133).

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, p. 566-575, 2011.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441–449, 2007.

CESTARI, T. F.; OLIVEIRA, F. B.; BOZA, J. C. Considerations on photoprotection and skin disorders. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, v. 139, p. S135–143, 2012.

CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant physiology and biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013.

CHOUDHARI, S. K. et al. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. **Oral Oncology**, v. 50, p. 10-18, 2014.

COUTINHO, M. A. S.; Muzitano, M. F.; Costa, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório, **Revista Virtual de Química**, v.1, p. 241-256, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, p. 72–79, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. Resin acids from two amazonian species. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1967–1969, 1973.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 389–399, 2012.

DEMPLE, B. Oxidative Stress and Free Radical Signal Transduction. In: BRADSHAW, R. A; DENNIS, E. A. (Org.). **Handbook of Cell Signaling**. USA: Academic Press, 2010. p. 2137–2143.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.6, p. 11-14, 2004.

FENG, R. et al. Anti-inflammatory flavonoids from *Cryptocarya chingii*. **Phytochemistry**, v. 76, p. 98–105, 2012.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 90-95, 2011.

FRIEDBERG, E. C. The discovery of enzymatic photoreactivation and the question of priority: the letters of Salvador Luria and Albert Kelner. **Biochimie**, v. 81, p. 7–13, 1999.

FU, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. **Food chemistry**, v. 141, p. 1063–1071, 2013.

GIASSON, B. I. et al. The relationship between oxidative / nitrate stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, p. 1264–1275, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374–381, 2007.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American journal of medicine**, v. 91, p. 14S–22S, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford: Clarendon Press. 1999, 704 p.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992.

**Phytochemistry**, v. 55, p. 481–504, 2000.

HARPUT, U. S.; GENÇ, Y.; SARACOĞLU, I. Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. **Food and chemical toxicology**, v. 50, p. 1554–1559, 2012.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HIRATA, L. L., SATO, M. E. O., SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 418-424, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124 p.

JANSEN, R. et al. Photoprotection: part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, p. 853.e1– 853.e12, 2013.

JAYAPRAKASAM, B. et al. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenae courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 105, p. 485–490, 2007.

JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 666-667, p. 387–392, 2003.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. São Paulo: Nova Odessa, 2002, 384 p.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, p. 3143–3153, 2013.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, v. 32, p. 946–949, 2009.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MALACRIDA, C. R.; MOTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 659–664, 2005.

MARANHÃO, C. A. et al. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 9–13, 2013.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218–1223, 2008.

MARQUES, C. D. L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 50, p. 67-80, 2010.

MATUDA, T. G., NETTO, F. M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 353-357, 2005.

MIRA, N. V. M. et al. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 994–1002, 2008.

MOTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

NOGUEIRA, R. T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1153–1157, 2001.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170–179, 2012.

ORSI, P.R. et al. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: a Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 81–90, 2012.

PANDYA, C. D.; HOWELL, K. R.; PILLAI, A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 46, p. 214–223, 2013.

PESTANA, L. T. C. **Estudo taxonômico de *Hymenaea* L.: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae: Detarieae)**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010

PINHO, R. A. et al. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 94, p. 549–555, 2010.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755–760, 2006.

RASHID, K.; SINHA, K.; SIL, P. C. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 584–600, 2013.

RAVISHANKAR, D. et al. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, p. 2821–2831, 2013.

RAZA, A.; DREIS, C. D.; VINCE, R. Photoprotection of DNA (*in vitro*) by acyclothyridine dinucleosides. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, p. 620–3, 2013.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology & medicine**, v. 49, p. 1603–16, 2010.

REZAIRE, A et al. Amazonian palm *Oenocarpus bataua* (“patawa”): chemical and biological antioxidant activity--phytochemical composition. **Food chemistry**, v. 149, p. 62–70, 2014.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RICE-EVANS, C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. **Free radical biology & medicine**, v. 36, p. 827–828, 2004.

SARASWATHY, M.; GONG, S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. **Biotechnology advances**, v. 31, p. 1397–1407, 2013.

SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287–306, 2005.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\alpha$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315S-1321S, 1995.

SILVA, M.R. et al. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 176-182, 2001.

SILVA, M. S.; LEITE, K. R. B.; SABA, M. D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae- Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 673–679, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001, 833 p.

SIMÕES, K. et al. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 59–62, 2009.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUZA, C.D., FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 135-142, 2006.



STEENKAMP, V.; GOUWS, M. C. Cytotoxicity of six South African medicinal plant extracts used in the treatment of cancer. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 630–633, 2006.

STRATHEARN, K. E. et al. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. **Brain research**, v. 1555, p. 60–77, 2014.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 722 p.

TAMAYO, L. M. A., González, D.M.A., Garcés, Y.J. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. **Revista Lasallista de Investigación**, vol. 5, p. 100-111, 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VIEIRA, R. F., MARTINS, M. V. M., Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, p. 13-36, 2000.

WANG, X. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochimica et biophysica acta**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Globocan 2012**: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em:< [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)> Acesso em: 20 mar. 2014.

WOODMAN, O. L. Vasoactivity of Flavonols, Flavones and Catechins. In: PREEDY, V. R. (Org.). **Beer in Health and Disease Prevention**. USA: Academic Press, 2008, p. 843-855.

## Capítulo I

### Industrial Crops and Products

#### **Atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies de *Hymenaea* (jatobá).**

Patrícia Aparecida FIGUEIREDO<sup>1</sup>, Regildo Márcio Gonçalves da SILVA<sup>2</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Assis, SP, Brasil.
2. Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Fitoterápicos, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Assis, SP, Brasil.

## Atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies de *Hymenaea* (jatobá).

### Resumo

Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante e fotoprotetor de diferentes extratos das partes (folhas, casca do fruto, polpa e semente) das plantas *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*, duas espécies utilizadas na culinária e medicina popular brasileira. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH, FRAP e ORAC-FL. O conteúdo de fenóis totais e flavonoides totais foram avaliados por métodos espectrofotométricos. O fator de proteção solar (FPS) das emulsões contendo extrato foram determinados por espectrofotometria no ultravioleta. A maior atividade antioxidante foi detectada no extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*, tanto para o teste do DPPH (78,94% e EC50=149,43 µg/mL) como para o teste FRAP (3073,51 µM Equivalente Trolox/g de extrato). Para o teste ORAC-FL maior potencial antioxidante foi obtido no extrato hidroetanólico da folha de *H. stigonocarpa* (0,56 equivalente trolox). O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou maior conteúdo de fenóis totais (464,34mg Equivalente Ácido Gálico/g de extrato seco) e flavonoides totais (442,25mg Equivalente Rutina/g de amostra). Os extratos das polpas de *H. courbaril* e *H. stigonocarpa* não apresentaram atividade antioxidante. Nenhuma das emulsões contendo os extratos apresentaram FPS significativo. Os resultados sugerem que a espécie *H. courbaril* pode ser considerada uma fonte de compostos fenólicos, além de possuir propriedades antioxidantes de interesse farmacológico.

Palavras-chave: plantas medicinais, compostos fenólicos, fator de proteção solar, *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*

## 1. Introdução

O gênero *Hymenaea* é composto por quatorze espécies, das quais doze ocorrem em diferentes biomas Brasileiros. A maioria das espécies deste gênero apresenta valor econômico, principalmente devido à alta qualidade da sua madeira, resinas, cascas e frutas comestíveis (Rizzini, 197; Lorenzi, 2002). Os frutos apresentam polpa farinácea e são bastante apreciados pelas populações rurais e também são comercializados em mercados e feiras populares, sendo consumidos *in natura* ou na forma de geleia, licor, farinha para bolos, pães e mingaus (Macedo, 1992; Silva et al., 2001). Além de utilização como alimento este gênero destaca-se pelo seu emprego na medicina popular para o tratamento de anemia, diarreia, úlcera, complicações gástricas, problemas renais e pulmonares, leucemia, problemas de próstata e debilidade física (Tamayo et al., 2008; Medeiros et al., 2013).

Espécies do gênero *Hymenaea* são conhecidas popularmente como jatobá, e atualmente inúmeros trabalhos científicos estão sendo realizados com as mesmas, demonstrando seu potencial tanto para indústria civil, farmacêutica como para de alimentos (Vieira e Martins, 2000; Silva et al., 2001; Souza e Felfili, 2006). Em particular para a espécie *H. courbaril*, estudos tem demonstrado que esta espécie apresenta compostos como flavonoides e diterpenoides em suas resinas, folhas, cascas do tronco, polpas do fruto e sementes (Marsaioli et al. 1975; Nogueira et al., 2001; Abdel-Kader et al., 2002, Simões, 2009). Quanto à ação biológica foram descritas atividades como anti-inflamatória, miorrelaxante, inibidora da peroxidação lipídica e antioxidante, (Jayaprakasam et al, 2007; Simões, 2009; Bezerra et al., 2013).

Já a espécie *H. stigonocarpa* apresenta poucos estudos, e estes ainda se encontram na fase inicial para elucidação do seu potencial, em comparação com as outras espécies de *Hymenaea*. Porém, os mesmos relatam a presença de diferentes compostos em seus órgãos vegetativos e reprodutivos como sesquiterpenos, flavonoides, ácido eperuico e ácido copálico (Langenheim e Hall, 1983; Doménech-Carbó et al., 2009; Maranhão et al., 2013). Quanto às atividades biológicas avaliadas foi demonstrado potencial gastroprotetor, antielmintico, antidiarreico e cicatrizante (Orsi, et al., 2012; Maranhão et al., 2013; Orsi et al., 2014)

Atualmente há crescente interesse em antioxidantes naturais, presentes em plantas medicinais e alimentares (Al-Jaber et al., 2011; Krishnaiah et al., 2011; Skrovánková et al., 2012; Abbas et al., 2014), pois estes compostos previnem as células contra danos causados pelo estresse oxidativo, ou seja, quando há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio comparadas a produção de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, preservando assim sua integridade funcional (Rashid et al., 2013; Zhang et al., 2014). A

produção dos radicais livres tem origem do metabolismo celular (Bianchi e Antunes, 1999, Valko et al., 2006; Rao et al., 2011; Choudhari et al., 2014) e pode também ser originados por fatores ambientais como a exposição á raios ultravioleta (Barreiros et al., 2006; Kryston et al., 2011). Desta forma, os antioxidantes auxiliam diminuindo o risco à várias doenças associadas ao estresse oxidativo como doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas, envelhecimento precoce e câncer (Ferreira e Matsubara, 1997; Sanders e Greenamyre, 2013; Scalbert et al., 2005).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e fotoprotetor das espécies *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*, além de determinar o teor de fenóis e flavonoides totais.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nos testes antioxidantes, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), AAPH (dihidrocloridrato do 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)) foram comprados da Sigma (Alemanha). Todos os outros reagentes utilizados neste estudo foram de grau de analítico.

### 2.2. Material Vegetal

As partes de *Hymenae courbaril* e *Hymenaea stigonocarpa* foram coletadas em Novembro de 2012 a Fevereiro de 2013 na região do município de Assis (*H. courbaril* - 22°39'00,66''S e 50°26'15,86''O, altitude 845m; *H. stigonocarpa* - 22°37'18,01''S e 50°27'28,89''O, altitude 941m), São Paulo, Brasil. As partes das plantas (folha, casca do fruto, polpa e semente) foram separadas, limpadas e secas em estufa com circulação de ar (Cienlab, Brasil) a temperatura de 40°C e então trituradas em moedor elétrico (Cienlab, CE-430, Brasil).

### 2.3. Preparação dos extratos

Os materiais secos e moídos (50g) de cada parte das espécies estudadas, foram submetidos aos seguintes procedimentos de extração: (a) extração na proporção 1:10 (p/v) em solução hidroetanólica 70%(v/v) por 24h sendo reextraído por mais 2 vezes. (b) extração na proporção 1:10 (p/v) em metanol por 24h sendo reextraído por mais 2 vezes. Os extratos resultantes

foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (Marconi, MA-120, Brasil) a temperatura de 40°C e os extratos hidroetanólicos, após este processo, foram congelados e posteriormente liofilizados em liofilizador (Liotop, L101, Brasil).

## 2.4. Avaliação da capacidade antioxidante

### 2.4.1. Atividade sequestradora do radical livre DPPH

A atividade sequestradora do radical DPPH foi determinada nos extratos diluídos em álcool etílico absoluto em concentrações entre 25 e 3000µg/mL de acordo com a técnica descrita por Blois, 1958. Uma alíquota de 1mL da solução de tampão acetato (pH 5,5 e 100mM) e 1,25mL de etanol P.A. foram misturados, em seguida, adicionou-se 250µL de solução de DPPH. (500µM) e 50µL das amostras. A mistura foi agitada e permaneceu em repouso por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade. A descoloração do DPPH foi determinado por mensuração da absorbância a 517nm em espectrofotômetro UV-visível (BEL). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A atividade sequestradora do radical DPPH foi expressa em porcentagem sendo calculada de acordo com a seguinte equação: Atividade antioxidante (%) =  $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controle}}] \times 100$ , onde  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância das amostras após 30 minutos e  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle (contêm tudo exceto a amostra). A concentração (µg/mL) da amostra necessária para sequestrar 50% da concentração inicial de DPPH (EC50) foi calculada. Ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

### 2.4.2. Teste do poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP)

O poder antioxidante de redução do ferro foi determinado de acordo com Benzie e Strain, 1996. No escuro o reagente FRAP foi preparado com 25mL de tampão acetato 300mM (pH 3.6), 2,5mL de TPTZ 10mM em solução de HCl a 40mM e 2,5mL de FeCl<sub>3</sub> 20mM. Foram misturados 90µL das amostras na concentração de 500µg/mL ou padrão com 270µL de água ultrapura e 2,7ml do reagente FRAP. Em seguida, foram agitados em vórtex (Marconi) e mantidos em banho-maria (Cienlab) por 30 minutos a 37 °C. Depois de resfriadas as amostras e padrão foram lidas a 595nm em espectrofotômetro UV- visível. Os resultados foram expressos em µM equivalente de Trolox (ET) por g de extrato seco.

### 2.4.3. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL)

O ensaio ORAC-FL foi realizado como previamente descrito por Dávalos e colaboradores (2004), utilizando um leitor de fluorescência em microplacas Synergy HT-

Biotek Instruments (comprimento de excitação 485nm e emissão 520nm). Radicais peroxil foram gerados pela decomposição do AAPH a 37°C. A fluoresceína foi utilizada como sonda fluorescente, onde a perda da fluorescência indica dano a fluoresceína pela reação com radicais peroxil. Neste ensaio, 20µL de amostra (1,56-25µg/mL) ou padrão Trolox (0,25-2,5µg/mL) foram misturados com 50µL de solução de fluoresceína a 0,001mM em microplaca escura de 96 poços, em seguida, foi adicionado 130µL de solução AAPH a 18,5mM, dando início à reação. Foi preparado também um controle utilizando tampão fosfato 75mM em substituição a amostra. A intensidade da fluorescência foi lida a cada 5 minutos por 120 minutos. A área sob a curva (AUC) de cada amostra e padrão foi calculada e o valor de ORAC foi determinado pela divisão do slope da curva de regressão linear da amostra pelo slope da curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em Equivalente Trolox.

#### 2.5. Determinação do conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais foi determinado nos extratos diluídos na concentração de 500µg/mL em álcool etílico absoluto de acordo com o método colorimétrico do reagente fenol Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965) utilizando ácido gálico como padrão. Inicialmente foi adicionado 0,1mL das amostras a 5mL de água destilada e 0,5mL do reagente Folin-Ciocalteu. Na amostra branco, foi misturado 5,1mL de água destilada e 0,5mL do reagente Folin-Ciocalteu. Depois de misturadas, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 3 minutos, em seguida, foi adicionado 1,4mL de solução de carbonato de sódio 25% e 3mL de água destilada. A mistura foi deixada por 1 hora a temperatura ambiente no escuro e a absorbância foi mensurada a 765nm em espectrofotômetro UV-visível. O teor de fenóis totais foi determinado a partir de uma curva de calibração de ácido gálico e expressos como mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato seco. Cada amostra foi testada em triplicata.

#### 2.6. Determinação do conteúdo de flavonoides totais

Os flavonoides totais foram mensurados pelo método de ensaio colorimétrico (Christ e Mueller, 1960). Foram misturados 1mL das amostras na concentração de 500µg/mL com 4mL de etanol a 70% e 0,5mL de solução de NaNO<sub>2</sub> a 5%. Após 6 minutos, foi adicionado 0,5mL de solução AlCl<sub>3</sub> a 10% e 3mL de solução NaOH 1M, seguido por adição de água destilada até obter o volume de 10mL. A mistura foi agitada e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, em seguida, submetida a leitura em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 510nm contra o controle. O controle continha todos os reagentes



exceto a amostra. Os flavonoides foram calculados a partir da curva de calibração de rutina e expressos como mg equivalente rutina (ER) por grama de extrato seco. Cada amostra foi testada em triplicata.

## 2.7. Atividade Fotoprotetora

### 2.7.1. Determinação da absorvância máxima dos extratos

Para determinação da absorvância máxima ( $A_{\text{máx.}}$ ), os extratos secos foram diluídos em álcool etílico absoluto PA (1000mg/L p/v) e foi realizada a varredura entre os comprimentos de onda de 290 a 400nm em espectrofotômetro UV-visível com cubeta de quartzo (1,0cm caminho óptico), para verificar a absorção nas regiões ultravioleta A e B (UVA e UVB). Foi utilizado o álcool etílico absoluto PA como branco.

### 2.7.2. Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)

O FPS *in vitro* foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al, (1986). Como veículo foi utilizado uma emulsão preparada pelo método a frio a partir de uma base autoemulsionante com mistura de 3% de emoliente (Cosmacol ESI – Sasol, North America), 8% de polímero espessante (Aristoflex AVL - Clariant, Brasil), 0,5% de preservante (Chemynol- Chemyunion, Brasil) e água deionizada em quantidade suficiente para preparar 400g de emulsão. Este mesmo veículo foi empregado como padrão, onde foi incorporado 8% (p/p) do filtro químico metoxicinamato de octila (Sigma, Alemanha). Os extratos foram incorporadas a 10% (p/p) tanto em emulsão sem o filtro químico como na emulsão com filtro químico, em seguida elas foram diluídas em álcool etílico absoluto PA na concentração de 0,2mg/mL. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro UV-visível em cubeta de quartzo de 1,0cm caminho óptico, na faixa de 290 a 320nm com intervalos de 5nm. O FPS de cada amostra foi determinado com os dados obtidos pela análise espectrofotométrica usando a equação de Mansur:

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Onde: FC: Fator de correção (=10); EE ( $\lambda$ ): Efeito eritematogênico da radiação no comprimento de onda ( $\lambda$ ); I( $\lambda$ ): Intensidade da luz solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ); Abs ( $\lambda$ ): Leitura espectrofotométrica da absorvância da solução no comprimento de onda relacionado.

## 2.8. Análise estatística

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa BioEstat versão 5.0. A comparação das médias foi realizada por ANOVA e Tukey com nível de significância de  $\alpha \leq 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Atividade sequestradora do radical livre DPPH

Na Tabela 1 estão apresentados os valores do EC50 e estes demonstram que extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou menor valor de EC50 entre as amostras analisadas (149,45 $\mu$ g/mL). De acordo com Sousa et al. (2011) e Mishra et al. (2012) compostos e/ou extratos vegetais que apresentam menores valores de EC50, proporcionalmente demonstram uma maior atividade antioxidante, visto que é necessária menor concentração do extrato para redução de 50% do radical DPPH. Para os extratos metanólicos desta espécie, o extrato da semente também apresentou o menor EC50 (179,43 $\mu$ g/mL). Entretanto, esse valor foi superior ao controle (Ácido gálico - 43,82 $\mu$ g/mL) e ao extrato hidroetanólico da semente desta espécie (Tabela 1). Bezerra et al. (2013) também encontraram atividade antioxidante para os extratos e frações desta espécie, onde o extrato etanólico de *H. courbaril* apresentou EC50= 3,07 $\mu$ g/mL e as frações acetato de etila e metanol apresentaram respectivamente valores de EC50 de 5,05 e 5,12 $\mu$ g/mL. Veggi et al. (2014) também avaliaram a atividade antioxidante da espécie *H. courbaril*, e encontraram EC50 de 200 $\mu$ g/mL (extração por fluido supercrítico).

Para a espécie *H. stigonocarpa* todos os extratos apresentaram valores de EC50 superiores ao controle ácido gálico. Para os extratos hidroetanólicos da espécie *H. stigonocarpa*, o da folha e da casca do fruto não diferiram entre si apresentando os menores EC50 (209,37 $\mu$ g/mL e 235,90  $\mu$ g/mL respectivamente). Porém, esses valores foram superiores ao obtido para o extrato metanólico da folha (EC50= 193,61  $\mu$ g/mL) (Tabela 1). Rocha et al. (2013) também encontraram atividade antioxidante para esta espécie, EC50= 1050 mg/L (extrato etanólico) e EC50= 1554mg/L (extrato aquoso).

Estudos recentes têm demonstrado propriedades antioxidantes das espécies do gênero *Hymenaea*, Dias et al. (2013) avaliaram o potencial antioxidante da fração lipídica da semente e da polpa de *H. courbaril* e encontraram uma correlação entre substâncias bioativas e a ação sequestradora do radical DPPH (0,94 e 0,78 respectivamente). Neste presente estudo é possível observar que outras partes vegetativas (folha e casca do fruto) também apresentam

considerável ação antioxidante e são passíveis de estudos para sua utilização nos diferentes focos industriais.

Em relação a espécie *H. stigonocarpa*, apesar da pouca informação científica sobre esta espécie, Orsi et al. (2012) e Maranhão et al. (2013) demonstraram diferentes atividades biológicas e entre elas, foi verificado a atividade antioxidante de extratos obtidos de diferentes partes vegetais (seiva, polpa do fruto e casca do tronco).

Os extratos hidroetanólicos das sementes de *H. courbaril* e *H. stigonocarpa* apresentaram maior potencial antioxidante quando comparados aos extratos metanólicos das sementes destas espécies, demonstrando assim, a influência do processo extrativo na capacidade antioxidante.

Tabela 1- Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (EC50) dos extratos hidroetanólicos e metanólicos de *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*.

Partes vegetais	Atividade antioxidante ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>H. courbaril</i>		<i>H. stigonocarpa</i>	
	EH	EM	EH	EM
Folha	415,80 <sup>a</sup>	392,05 <sup>a</sup>	209,37 <sup>a</sup>	193,61 <sup>a</sup>
Casca do fruto	428,10 <sup>a</sup>	395,44 <sup>a</sup>	235,90 <sup>a</sup>	236,24 <sup>a</sup>
Semente	149,45 <sup>b</sup>	179,43 <sup>b</sup>	470,55 <sup>b</sup>	2150,25 <sup>b</sup>
Ácido gálico	43,82 <sup>c</sup>			

Valores apresentados como média. Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ).

### 3.2. Teste do poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP)

Conforme Boulekbache-Makhlouf et al, (2013), Benzie e Choi, (2014), os compostos antioxidantes presentes em extratos de origem vegetal podem atuar *in vivo* sobre diferentes mecanismos. Além disso, os métodos para sua avaliação são diversos e podem apresentar interferentes, por isso preconiza-se a utilização de mais de uma metodologia. Diante disso, neste estudo para a avaliação antioxidante dos extratos utilizou-se além do teste do DPPH, o teste do FRAP, pois de acordo com Benzie e Choi, 2014 o teste do FRAP permite uma representatividade maior dos resultados, sendo este de grande importância na ciência nutricional.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do teste FRAP para os extratos das espécies avaliadas. O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou maior potencial de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  (3073,51 $\mu\text{M}$  ET/g de extrato) corroborando assim com o resultado obtido para o teste do sequestro do radical DPPH. Resultado semelhante foi obtido

para o extrato metanólico desta espécie, pois também foi o extrato da semente o que apresentou maior potencial de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  (2797,90 $\mu\text{M}$  ET/g de extrato) quando comparado aos extratos metanólicos da casca do fruto e da folha desta espécie. Contreras-Calderón et al. (2011) encontraram para esta espécie 7,60 $\mu\text{M}$  ET/g de peso fresco da polpa.

Para a espécie *H. stigonocarpa*, o extrato hidroetanólico da casca do fruto apresentou maior potencial de redução do ferro (1716,55 $\mu\text{M}$  ET/g de extrato), diferindo significativamente dos demais extratos hidroetanólicos desta espécie. O extrato hidroetanólico da folha e da semente desta espécie não diferiram significativamente entre si. Quanto aos extratos metanólicos desta espécie, maior potencial de redução do ferro foi obtido para os extratos da folha e casca do fruto, os quais não diferiram entre si (1267,98 e 1271,48 $\mu\text{M}$  ET/g de extrato seco respectivamente) (Tabela 2). Rufino et al. (2010) encontraram altos valores de atividade antioxidante pelo teste FRAP ao avaliar outros frutos nativos do Brasil como camu-camu (2502 $\mu\text{M}$   $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ /g de fruto seco) e acerola (1996 $\mu\text{M}$   $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ /g de fruto seco).

De acordo com Oliveira et al., 2009, existe grande interesse na substituição de antioxidantes sintéticos por naturais devido a sua implicação na saúde e funcionalidade. Isto tem despertado a atenção de indústrias farmacêutica, alimentos e de cosméticos na busca por materiais vegetais para identificação e isolamento de novos compostos bioativos em fontes naturais de antioxidantes.

Tabela 2- Atividade antioxidante pelo método do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) ( $\mu\text{M}$  ET/g de extrato) dos extratos hidroetanólicos e metanólicos de *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*.

Partes vegetais	Atividade antioxidante ( $\mu\text{M}$ ET/g de extrato)			
	<i>H. courbaril</i>		<i>H. stigonocarpa</i>	
	EH	EM	EH	EM
Folha	632,64 $\pm$ 08,20 <sup>a</sup>	1112,63 $\pm$ 53,24 <sup>a</sup>	1404,57 $\pm$ 42,79 <sup>a</sup>	1267,98 $\pm$ 68,60 <sup>a</sup>
Casca do fruto	1274,42 $\pm$ 59,42 <sup>b</sup>	614,31 $\pm$ 21,72 <sup>b</sup>	1716,55 $\pm$ 27,00 <sup>b</sup>	1271,48 $\pm$ 23,31 <sup>a</sup>
Semente	3073,51 $\pm$ 66,73 <sup>c</sup>	2797,90 $\pm$ 28,83 <sup>c</sup>	1372,08 $\pm$ 88,27 <sup>a</sup>	474,69 $\pm$ 51,41 <sup>b</sup>
Polpa	-	-	-	-

- = valor não detectado pelo teste; EH = extrato hidroetanólico; EM= extrato metanólico. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão, Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ).

### 3.2.3. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL)

A figura 1 mostra a curva de decaimento da fluorescência induzida por AAPH, tanto para o controle como para as amostras. A maior concentração de Trolox (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

promoveu uma proteção máxima por aproximadamente 45 minutos antes da intensidade da fluorescência começar a diminuir (figura 1A). O aumento nos valores da AUC no teste ORAC-FL reflete um maior potencial antioxidante em prevenir aos danos dos radicais peroxil induzidos por AAPH (Sáenz et al., 2009). As curvas de decaimento da fluorescência dos extratos da espécie *H. courbaril* revelaram atividade antioxidante para todos extratos comparados ao controle (figura 1B), sendo que maior AUC foi obtida para o extrato hidroetanólico da folha desta espécie. Para os extratos da espécie *H. stigonocarpa* todos também apresentaram AUC superior ao controle, onde o extrato hidroetanólico da folha apresentou maior AUC (figura 1C). Dentre todas as amostras avaliadas, o extrato hidroetanólico da folha de *H. stigonocarpa* apresentou maior potencial antioxidante (0,56 equivalente trolox) e o extrato metanólico da semente de *H. stigonocarpa* apresentou o menor potencial antioxidante (0,07 equivalente trolox). Os extratos hidroetanólico e metanólico da folha de *H. courbaril* apresentaram o mesmo valor (0,34 equivalente trolox). Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados por Xi e colaboradores (2014) onde demonstraram a aplicabilidade do teste ORAC para análise de extratos de polpa de frutos.

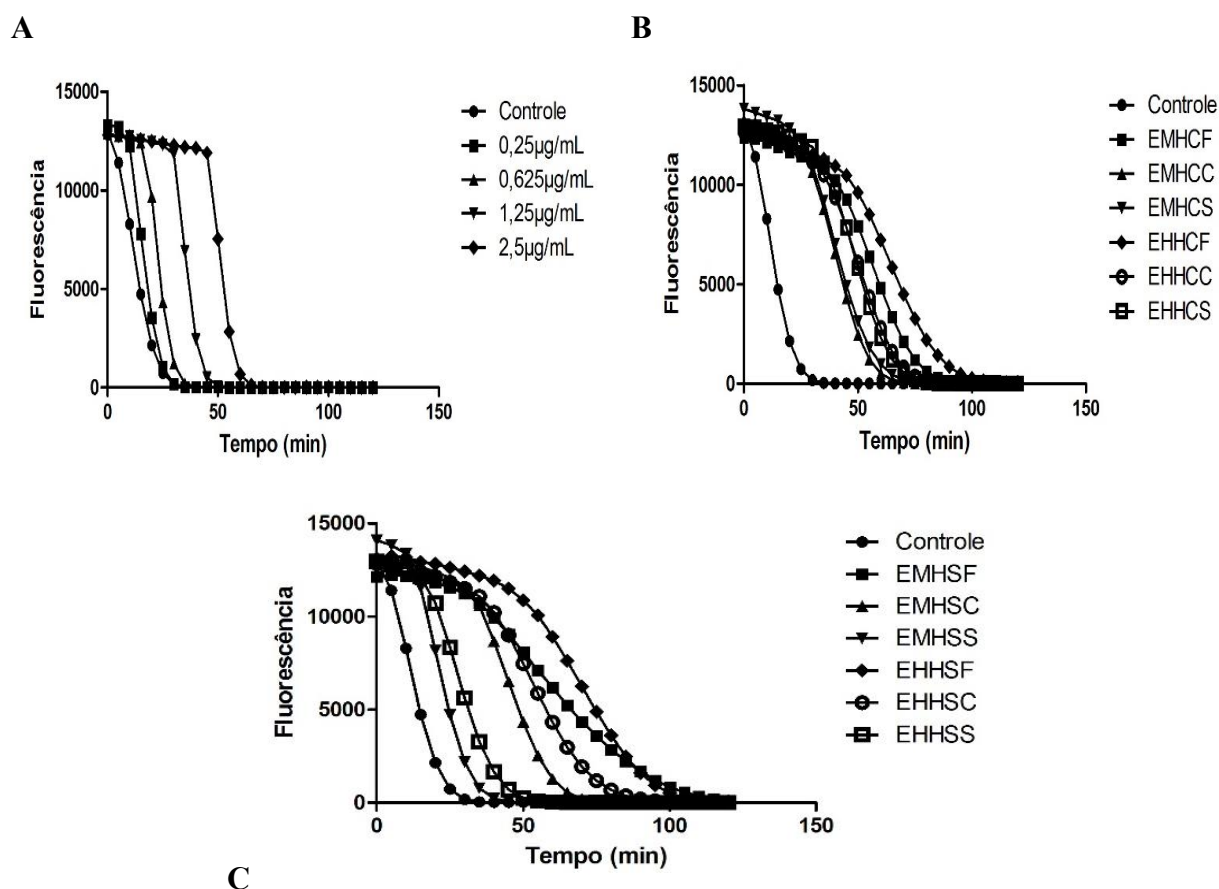


Figura 1. Curvas cinéticas do ensaio ORAC-FL. (A) Curvas cinéticas para padrão Trolox, (B) Curvas cinéticas para os extratos de *H. courbaril* (EMHCF= Extrato metanólico da folha de *H. courbaril*. EMHCC= Extrato metanólico da casca do fruto de *H. courbaril*. EMHCS= Extrato metanólico da semente de *H. courbaril*. EHHCF= Extrato hidroetanólico da folha de *H. courbaril*. EHHCC= Extrato hidroetanólico da casca do fruto de

*H. courbaril*. EHHCS= Extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*). (C) Curvas cinéticas para os extratos de *H. stigonocarpa* (EMHSF= Extrato metanólico da folha de *H. stigonocarpa*. EMHSC= Extrato metanólico da casca do fruto de *H. stigonocarpa*. EMHSS= Extrato metanólico da semente de *H. stigonocarpa*. EHHSF= Extrato hidroetanólico da folha de *H. stigonocarpa*. EHHSC= Extrato hidroetanólico da casca do fruto de *H. stigonocarpa*. EHHSS= Extrato hidroetanólico da semente de *H. stigonocarpa*).

Tabela 3- Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL)

Amostra	ORAC-FL <sup>a</sup>
Trolox	1
EMHCF	0,34
EMHCC	0,16
EMHCS	0,12
EHHCF	0,34
EHHCC	0,28
EHHCS	0,25
EMHSF	0,25
EMHSC	0,27
EMHSS	0,07
EHHSF	0,56
EHHSC	0,36
EHHSS	0,14

<sup>a</sup> Valores expressos como Equivalente Trolox. EMHCF= Extrato metanólico da folha de *H. courbaril*. EMHCC= Extrato metanólico da casca do fruto de *H. courbaril*. EMHCS= Extrato metanólico da semente de *H. courbaril*. EHHCF= Extrato hidroetanólico da folha de *H. courbaril*. EHHCC= Extrato hidroetanólico da casca do fruto de *H. courbaril*. EHHCS= Extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*. EMHSF= Extrato metanólico da folha de *H. stigonocarpa*. EMHSC= Extrato metanólico da casca do fruto de *H. stigonocarpa*. EMHSS= Extrato metanólico da semente de *H. stigonocarpa*. EHHSF= Extrato hidroetanólico da folha de *H. stigonocarpa*. EHHSC= Extrato hidroetanólico da casca do fruto de *H. stigonocarpa*. EHHSS= Extrato hidroetanólico da semente de *H. stigonocarpa*.

### 3.3. Determinação do conteúdo de fenóis totais

O conteúdo total de fenóis encontrado no extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* (464,34mg EAG/g de extrato seco) foi superior aos demais extratos hidroetanólicos desta espécie. Já o conteúdo de fenóis totais dos extratos hidroetanólicos da casca do fruto e da folha não diferiram estatisticamente entre si (211,26 e 208,17mg EAG/g de extrato seco respectivamente). Porém, estes valores foram superiores ao encontrado para o extrato da polpa (3,37mg EAG/g de extrato seco). O teor de fenóis totais dos extratos metanólicos de *H. courbaril* tiveram uma variação significativa de acordo com a parte da planta utilizada, sendo o extrato da semente o que apresentou maior teor de fenóis totais (396,68mg EAG/g de extrato seco) (Tabela 4).

Os extratos hidroetanólicos de *H. stigonocarpa* apresentaram uma variação do teor de fenóis totais em decorrência dos diferentes extratos das partes vegetais utilizadas, sendo que o extrato da folha foi o que apresentou maior conteúdo de fenóis (278,33mg EAG/g de extrato seco). Este valor foi superior ao encontrado por Ramli et al. (2011) em extrato de folhas da

leguminosa *Acacia farnesiana* (209,78 mg EAG/ g de extrato etanólico). Matuda e Netto, 2005, encontraram para a semente de *H. stigonocarpa*, 48mg equivalente catequina/ g de farinha da semente. No presente estudo, o extrato hidroetanólico da semente apresentou teor de compostos fenólicos de 117,73mg EAG/g de extrato. Quanto aos extratos metanólicos de *H. stigonocarpa*, maior teor de fenóis totais foi encontrado no extrato da folha (227,76mg EAG/g de extrato seco). Tanto o extrato hidroetanólico como o metanólico da polpa de *H. stigonocarpa* não apresentaram fenóis totais.

Estudo realizado por Contreras-Calderón et al. (2011) demonstrou alto teor de compostos fenólicos para semente (2013mg EAG/100g de peso fresco) de *H. courbaril*. No presente estudo, também foi verificado elevado teor de fenóis totais para extratos desta parte vegetal, como também para extratos das folhas e casca do fruto (Tabela 4).

Tabela 4- Teor de fenóis totais (mg EAG/g de extrato seco) dos extratos hidroetanólicos e metanólicos de *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*.

Partes vegetais	Fenóis Totais (mg EAG/g de extrato seco)			
	<i>H. courbaril</i>		<i>H. stigonocarpa</i>	
	EH	EM	EH	EM
Folha	208,17±04,04 <sup>a</sup>	236,25±16,04 <sup>a</sup>	278,33±04,53 <sup>a</sup>	227,76±01,86 <sup>a</sup>
Casca do fruto	211,26±01,87 <sup>a</sup>	187,31±03,77 <sup>b</sup>	237,72±08,87 <sup>b</sup>	198,29±02,99 <sup>b</sup>
Semente	464,34±04,62 <sup>b</sup>	396,68±13,16 <sup>c</sup>	117,73±14,54 <sup>c</sup>	35,04±03,55 <sup>c</sup>
Polpa	3,37±04,10 <sup>c</sup>	13,54±01,15 <sup>d</sup>	-	-

- = valor não detectado pelo teste; EH = extrato hidroetanólico; EM= extrato metanólico. Valores apresentados como média±desvio padrão, Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ).

### 3.4. Determinação do conteúdo de flavonoides totais

O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou maior concentração de flavonoides totais entre os extratos avaliados (442,25mg ER/g de amostra) (Tabela 5). Este resultado corrobora com os obtidos para os testes antioxidantes e determinação de fenóis totais. Semelhantemente ao teste de fenóis, a determinação de flavonoides dos extratos hidroetanólicos da folha e casca do fruto não diferiram estatisticamente. Já entre os extratos metanólicos, o maior teor de flavonoides totais foi obtido no extrato da semente (436,54mg ER/g de extrato). Os extratos hidroetanólico e metanólico da polpa de *H. courbaril* não apresentaram flavonoides, diferentemente do observado para o teste de fenóis, indicando assim que os compostos fenólicos encontrados para a polpa possivelmente pertencem a outras classes de compostos secundários. Quanto a espécie *H. stigonocarpa* os maiores teores de flavonoides foram obtidos nos extratos hidroetanólicos da folha e casca do fruto, os quais não

diferiram estatisticamente (296,03 e 305,46mg ER/g de extrato respectivamente).

Mesmo não apresentando atividade antioxidante e teor de fenóis totais, o extrato hidroetanólico da polpa de *H. stigonocarpa* apresentou teor de flavonoides (55,64 mg ER/g de extrato). Quanto aos extratos metanólicos de *H. stigonocarpa*, o maior teor de flavonoides foi obtido no extrato da casca do fruto (396,88mg ER/g de extrato), seguido do extrato da folha e semente. O extrato metanólico da polpa de *H. stigonocarpa* não apresentou flavonoides totais (Tabela 5).

Os flavonoides possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas, dentre estas se destaca a atividade anticâncer. Por isso, diferentes tipos de flavonoides e seus mecanismos de ação têm sido investigados em fontes naturais na busca por substância com potencial de aplicação em diferentes terapias, para as mais variadas doenças (Ravishankar et al., 2013). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram o potencial destas espécies como fonte de flavonoide, além disso, poucos trabalhos científicos investigam ou demonstram o conteúdo flavonoídico de extratos e preparações a partir de espécies do gênero *Hymenaea*.

Tabela 5- Teor de flavonoides totais (mg ER/g de extrato seco) dos extratos hidroetanólicos e metanólicos de *H. courbaril* e *H. stigonocarpa*.

Partes vegetais	Flavonoides Totais (mg ER/g de extrato seco)			
	<i>H. courbaril</i>		<i>H. stigonocarpa</i>	
	EH	EM	EH	EM
Folha	299,22±21,87 <sup>a</sup>	365,75±13,71 <sup>a</sup>	296,03±11,06 <sup>a</sup>	338,52±07,81 <sup>a</sup>
Casca do fruto	276,18±16,80 <sup>a</sup>	322,79±02,29 <sup>b</sup>	305,46±09,41 <sup>a</sup>	396,88±16,52 <sup>b</sup>
Semente	442,25±18,03 <sup>b</sup>	436,54±13,30 <sup>c</sup>	191,06±26,90 <sup>b</sup>	130,14±23,40 <sup>c</sup>
Polpa	-	-	55,64±15,45 <sup>c</sup>	-

- = valor não detectado pelo teste; EH = extrato hidroetanólico; EM= extrato metanólico. Valores apresentados como média±desvio padrão, Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ).

### 3.5. Atividade Fotoprotetora

#### 3.5.1. Determinação da absorbância máxima dos extratos na faixa espectrofotométrica do ultravioleta (UV)

Os espectros de absorção dos extratos da espécie *H. courbaril* mostraram pico máximo de absorção entre 290 e 292nm, (Figura 2). Dentre os extratos avaliados, os extratos metanólico e hidroetanólico da folha apresentaram os maiores picos de absorção (2,92 e 2,85 respectivamente). Para os extratos da espécie *H. stigonocarpa*, os picos máximos de absorção foram entre 290 e 400nm, o extrato hidroetanólico da folha apresentou maior pico de absorção



(2,71) (Figura 3). Os extratos hidroetanólicos e metanólicos da polpa das espécies estudadas apresentaram as menores absorbâncias. De acordo com Widel et al. (2014) as radiações solares UV-A e UV-B são responsáveis por efeitos danosos a saúde humana. A radiação UVA está associada com os efeitos do envelhecimento precoce da pele e a radiação UVB está relacionada ao câncer de pele não-melanoma, devido sua interação direta com o DNA, produzindo mutações nos dímeros de pirimidina (Balogh et al., 2011), por isso é importante a busca por compostos que tenham absorbância nessa faixa espectrofotométrica e que sejam promissoras para o desenvolvimento de produtos com atividade fotoprotetora.

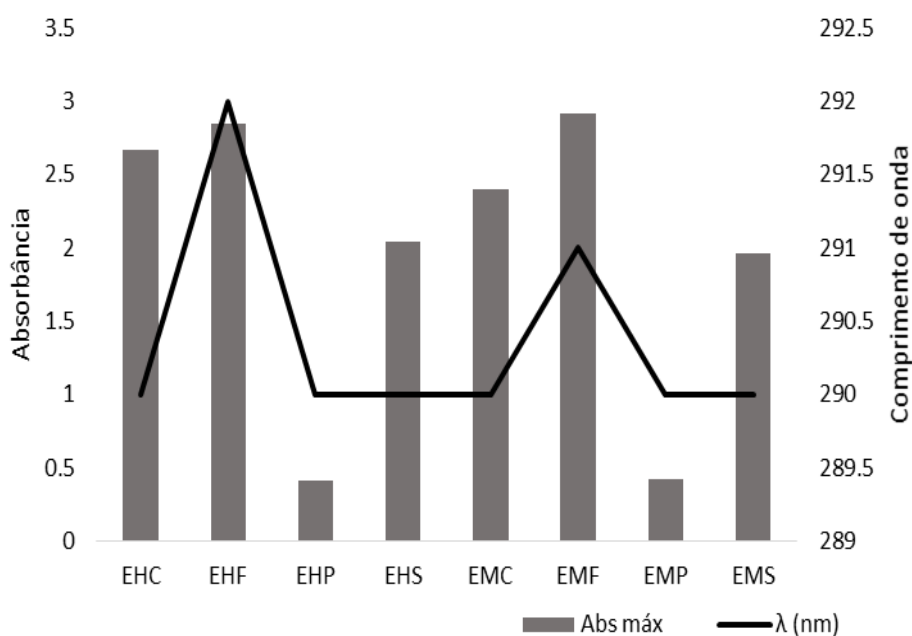


Figura 2- Absorbância máxima dos extratos hidroetanólico e metanólico de *H. courbaril* na concentração de 1000µg/mL na região UV. EHC= Extrato hidroetanólico da casca do fruto. EHF= Extrato hidroetanólico da folha. EHP= = Extrato hidroetanólico da polpa. EHS= Extrato hidroetanólico da semente. EMC= Extrato metanólico da casca do fruto. EMF= Extrato metanólico da folha. EMP= = Extrato metanólico da polpa. EMS= Extrato metanólico da semente.

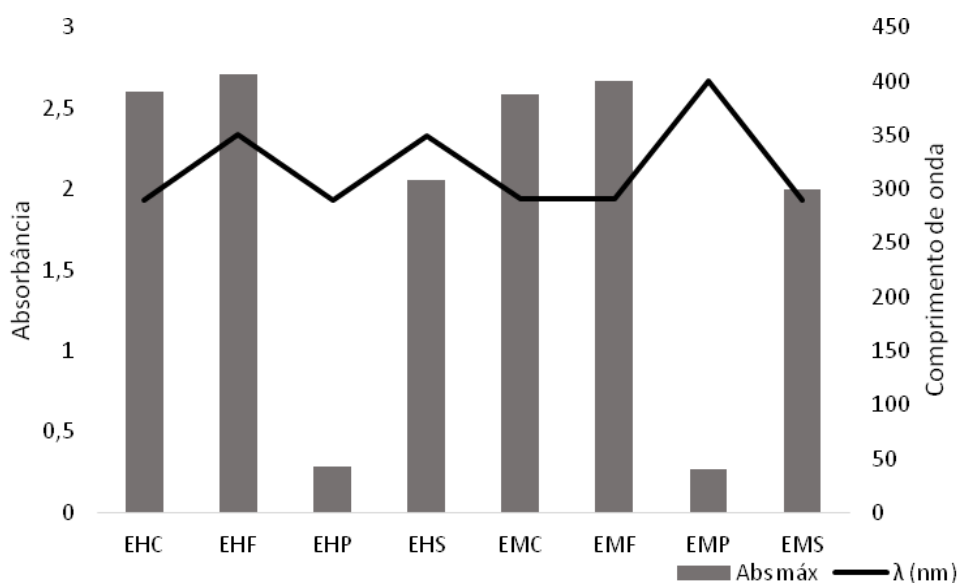


Figura 3- Absorbância máxima dos extratos hidroetanólico e metanólico de *H. stigonocarpa* na concentração de 1000µg/mL na região UV. EHC= Extrato hidroetanólico da casca do fruto. EHF= Extrato hidroetanólico da folha. EHP= Extrato hidroetanólico da polpa. EHS= Extrato hidroetanólico da semente. EMC= Extrato metanólico da casca do fruto. EMF= Extrato metanólico da folha. EMP= Extrato metanólico da polpa. EMS= Extrato metanólico da semente.

### 3.5.2. Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)

Para emulsões contendo apenas extrato, sem a inclusão do ativo de proteção solar (Metoxicinamato de octila), a emulsão do extrato metanólico da semente de *H. courbaril* apresentou o maior valor de FPS (2,20) enquanto que para as emulsões contendo o ativo e os extratos incorporados, maior valor de FPS foi observado para a emulsão do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* (14,56) entre as amostras avaliadas inclusive o padrão (Tabela 6).

Para ser efetivo na prevenção contra os danos da radiação solar, as emulsões contendo filtros solares devem ter uma ampla faixa de absorbância entre 290 a 400nm (Dutra et al, 2004, Mishra et al., 2012). No Brasil, de acordo com legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária os protetores solares devem apresentar FPS de, no mínimo, 6 (ANVISA, 2014). Nenhuma das emulsões que continham apenas os extratos apresentaram FPS superior ou igual a este valor.

Trabalhos realizados por Rosa et al. (2008), Violante et al. (2008), Munhoz et al. (2012) e Souza et al. (2013) demonstram que existe uma ampla variedade de compostos naturais, de origem vegetal, que podem possuir efeitos fotoprotetores e este potencial pode estar correlacionado, principalmente, com ação antioxidante dos mesmos. Além disso, os principais compostos naturais avaliados são representados por compostos fenólicos, e entre estes, os flavonoides. De acordo com Stahl et al. (2006) e Gilaberte e González (2010), os

compostos fenólicos podem acumular e reduzir a penetração da radiação UV-B nas células, algumas evidências indicam ainda que o uso oral de substâncias naturais podem prevenir contra danos na pele causados pela radiação UV, atuando dessa forma como um complemento aos protetores solares tópicos.

Tabela 6- Fator de Proteção Solar (FPS) das emulsões com extratos e da emulsão fotoprotetora padrão.

Partes vegetais	<i>H. courbaril</i>				<i>H. stigonocarpa</i>				
	Hidroetanólico		Metanólico		Hidroetanólico		Metanólico		
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM	
Folha	1,63	14,45	1,39	13,38	1,59	12,86	1,71	12,50	
Casca do Fruto	1,50	13,67	1,68	13,75	1,90	12,11	2,16	14,10	
Semente	1,72	14,56	2,20	12,29	1,90	11,14	1,50	13,36	
Polpa	0,89	14,03	0,79	12,22	1,11	12,35	1,02	13,93	
Emulsão fotoprotetora padrão (emulsão base com metoxicinamato de octila)								14,19	

SM= Emulsão sem metoxicinamato de octila; CM= Emulsão com metoxicinamato de octila

#### 4. Conclusão

Os resultados do presente estudo indicaram que o extrato hidroetanólico da semente da espécie *H. courbaril* apresentou alta atividade antioxidante nos testes DPPH e FRAP, podendo ser considerada uma fonte de compostos fenólicos. Com relação ao potencial fotoprotetor das espécies avaliadas e de acordo com a metodologia empregada, nenhum dos extratos podem ser considerados como ativos fotoprotetores, porém são promissores para avaliação em novas metodologias e para o fracionamento biodirecionado a esta atividade.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/15430-5) pelo suporte financeiro; ao Dr. Rondinelli Donizetti Herculano do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (Assis), Dr. Valdecir Farias Ximenes e doutoranda Luana Chiquetto Paracatu do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (Bauru) pelo apoio nas análises.

#### Referências

Abbas, S.R., Sabir, S.M., Ahmad, S.D., Boligon, A.A., Athayde, M.L., 2014. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). Food Chem. 147, 10–6.

Abdel-Kader, M., Berger, J.M., Slebodnick, C., Hoch, J., Malone, S., Wisse, J.H., Werkhoven, M.C.M., Mamber, S., Kingston, D.G.I., 2002. Isolation and absolute configuration of ent-Halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *J. Nat. Prod.* 65, 11–5.

Al-Jaber, N.A., Awaad, A.S., Moses, J.E., 2011. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. *J. Saudi Chem. Soc.* 15, 293–307.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC N° 30 de 1° de junho de 2012. Regulamento técnico Mercosul sobre protetores solares em cosméticos (Revogação da RES. GMC N° 26/02). Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030\\_01\\_06\\_2012.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.pdf). Acesso em: 19 de Março de 2014.

Balogh, T.S., Pedriali, C.A., Baby, A.R., Velasco, M.V.R., Kaneko, T.M. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova.* 29, 113–123.

Benzie, I.F.F., Choi, S., 2014. Antioxidants in Food: Content, Measurement, Significance, Action, Cautions, Caveats, and Research Needs, in: Henry, J. (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, pp. 1-53.

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–6.

Bezerra, G.P., Góis, R.W.D.S., Brito, T.S., Lima, F.J.B., Bandeira, M.A.M., Romero, N.R., Magalhães, P.J.C., Santiago, G.M.P., 2013. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. *J. Ethnopharmacol.* 149, 62–9.

Bianchi, M.L.P., Antunes, L.M.G., 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* 12, 123-130.

Blois, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181, 1199-1200.

Boulekbache-Makhlouf, L., Medouni, L., Medouni-Adrar, S., Arkoub, L., Madani, K., 2013. Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Ind. Crops Prod.* 49, 668–674.

Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Gadbail, A.R., Sharma, A., Tekade, S., 2014. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncol.* 50, 10-18.

- Christ, B., Mueller, K. H. 1960. On the serial determination of the content of flavonol derivatives in drugs. *Archiv der Pharm.* 293, 1033–1042.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B., 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Res. Int.* 44, 2047–2053.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovéz, C., Bartolomé, B., 2004. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.* 52, 48–54.
- Dias, L.S., Luzia, D.M.M., Jorge, N., 2013. Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. *Ind. Crops Prod.* 49, 610–618.
- Doménech-Carbó, M.T., de la Cruz-Cañizares, J., Osete-Cortina, L., Doménech-Carbó, A., David, H., 2009. Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *Int. J. Mass Spectrom.* 284, 81–92.
- Dutra, E.A., Oliveira, D.A.G.C., Kedor-Hackmann, E.R.M., Santoro, M.I.R.M., 2004. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac.* 40, 381–385.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 43, 61-8.
- Gilaberte, Y., González, S., 2010. Update on photoprotection. *Actas Dermosifi.* 101, 659- 72.
- Jayaprakasam, B., Alexander-Lindo, L.R., DeWitt, D.L., Nair, G. M., 2007. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. *Food Chem.* 105, 485–490.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* 89, 217–233.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711, 193-201.
- Langenheim, J.H., Hall, G.D., 1983. Sesquiterpene Deterrence of a Leaf-Tying Lepidopteran, *Stenoma ferrocaneella*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil. *Biochem. System. Ecol.* 1, 29–36.
- Lorenzi, H., 2002. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil*, segunda ed. Nova Odessa, São Paulo.
- Macedo, J. F., 1992. Frutos brasileiros comercializados na Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG. *Daphne* 2, 53-56.

- Mansur, J.S., Breder, M.N.R., Mansur, M.C.A., Azulay, R.D., 1986. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Bras. Dermat.* 61, p.121-124.
- Maranhão, C.A., Pinheiro, I.O., Santana, A.L.B.D., Oliveira, L.S., Nascimento, M.S., Bieber, L.W., 2013. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 79, 9–13.
- Marsaioli, A.J., Leitão Filho, H.F., Campello, J.P. 1975. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry*, 14, p.1882-1883.
- Matuda TG, Netto FM (2005). Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25:353–357.
- Munhoz, V.M., Lonni, A.A.S.G., Mello, J.C.P., Lopes, G.C., 2012. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 33, 225–232.
- Medeiros, P.M., Ladio, A.H., Albuquerque, U.P., 2013. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: a macroscale investigation based on available literature. *J. Ethnopharmacol.* 150, 729–46.
- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* 130, 1036–1043.
- Nogueira, R.T., Shepherd, G.J., Júnior, A.L., Marsaioli, A.J., Imamura, P.M., 2001. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochem.* 58, 1153–7.
- Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Trevisan, M.T.S., 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, 32, 689-702.
- Orsi, P.R., Bonamin, F., Aparecida Severi, J., Cássia Santos, R., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., Stasi, L.C. Di, 2012. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: a Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J. Ethnopharmacol.* 143, 81–90.
- Orsi, P.R., Seito, L.N., Di Stasi, L.C., 2014. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *J. Ethnopharmacol.* 151, 380–5.
- Ramli, S., Harada, K-i., Ruangrunsi, N., 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxicity Activities of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Leaves Ethanolic Extract. *Pharmacog. Journ.* 3, 50-58.
- Rao, P.S., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamidi, S., 2011. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radic. and Antiox.*, 1, 2-7.

- Rashid, K., Sinha, K., Sil, P.C., 2013. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem. Toxicol.* 62, 584-600.
- Ravishankar, D., Rajora, A.K., Greco, F., Osborn, H.M.I., 2013. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2821–31.
- Rizzini, C.T., 1971. *Plantas do Brasil - árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira*, segunda ed. Edgard Blücher, São Paulo.
- Rocha, M.S., Figueiredo, R.W., Araújo, M.A.M., Moreira-Araújo, R.S.R., 2013. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. *Rev. Bras. Frutic.* 35, 933-941.
- Rosa, M.B., Oliveira, T.G., Carvalho, C.A., Silva, F.D., Carvalho, L.M., Nascimento, P.C., Peres, R.L., 2008. Estudo espectrofotométrico da atividade foto-protetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (jacq.) Cass e *Sonchus oleraceus*. *Rev. Eletr. Farm.* 5, 101–110.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E, Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J., 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemist.* 121, 996–1002.
- Saézn, A.T., Elisia, I., Inni, S.M., Friel, J.K., Kitts, D.D., 2009. Use of ORAC to assess antioxidant capacity of human milk. *J. Food Compos. Anal.* 22, 694–698.
- Sanders, L.H., Greenamyre, J.T., 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 111–20.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287–306.
- Silva, M.R., Silva, M.S., Martins, K.A., Borges, S., 2001. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 21, 176–182.
- Simões, K., Du, J., Pessoní, R.A.B., Cardoso-Lopes, E.M., Vivanco, J.M., Stermitz, F.R., Braga, M.R., 2009. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Phytochem. Lett.* 2, 59–62.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. Jr., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16, 144-158.
- Škrovánková, S., Mišurcová, L., Machů, L., 2012. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants, in: Henry, J. (Eds.), *Advances in food and nutrition research*. Academic Press, pp. 75-139.

- Sousa, M.S.B, Vieira, L.M, Lima, A., 2011. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian J. Food Technol.* 14, 202–210.
- Souza, C.D., Felfili, J.M., 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta bot. Bras.* 20, 135-142.
- Souza, F.P., Campos, G.R., Packer, J.F., 2013. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L.-Acerola. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 34, 69–77.
- Stahl, W., Heinrich, U., Aust, O., Tronnier, H., Sies, H., 2006. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 238–42.
- Tamayo, A., María, L., González, A., María, D., Garcés, J., María, L., Tamayo, A., María, D., González, A., Garcés, Y.J., 2008. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. *Rev. Lasallis. Investig.* 5, 100-111.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. *Chem.-Biol. Interac.* 160, 1-40.
- Veggi, P.C., Prado, J.M., Bataglion, G.A., Eberlin, M.N., Meireles, M.A.A., 2014. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluids* 89, 68–77.
- Vieira, R.F., Martins, M.V.M., 2000. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. *Rev. Bras. Pl. Med.* 3, 13-36.
- Violante, I.M.P., Souza, I.M., Venturini, C.L., Ramalho, A.F.S., Santos, R.A.N., Ferrari, M., 2008. Estudo preliminar da atividade fotoprotetora in vitro de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Rev. Bras. Farm.* 89, 175–179.
- Widel, M., Krzywon, A., Gajda, K., Skonieczna, M., Rzeszowska-Wolny, J., 2014. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 68, 278–287.
- Xi, W., Zhang, Y., Sun, Y., Shen, Y., Ye, X., Zhou, Z., 2014. Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco) pulps and their antioxidants properties. *Ind. Crops Prod.* 52, 466-474.
- Zhang, J., Hou, X., Ahmad, H., Zhang, H., Zhang, L., Wang, T., 2014. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chem.* 145, 57–65.



## Capítulo II

Journal of Medicinal Plant Research

### **Atividade citotóxica de *Hymenaea courbaril* sobre células tumorais.**

Patrícia Aparecida FIGUEIREDO<sup>1</sup>, Regildo Márcio Gonçalves da SILVA<sup>2</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Assis, SP, Brasil.
2. Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Fitoterápicos, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Assis, SP, Brasil.

## Atividade citotóxica de *Hymenaea courbaril* sobre células tumorais.

### Resumo

*Hymenaea courbaril*, é uma espécie utilizada na alimentação e como planta medicinal. Popularmente todas as suas partes (casca do caule, folhas, raízes, frutos e sementes) são utilizadas para tratar diversas enfermidades como úlceras, diarreia, anemia, bronquite entre outros. Este trabalho testou a atividade antioxidante dos extratos metanólico e hidroetanólico das folhas, casca do fruto, polpa e semente de *H. courbaril*, além de avaliar a citotoxicidade do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* sobre células de melanoma murino. Foi realizado também um perfil cromatográfico dos extratos. Para a atividade antioxidante, foi utilizado o método do sequestro do radical DPPH. A citotoxicidade foi avaliada por meio da viabilidade celular, sendo que esta foi determinada pelo ensaio de exclusão do Azul de Tripán após o período de 24 e 48h de incubação. O perfil cromatográfico foi realizado por meio de cromatografia de camada delgada (CCD). O resultado mais significativo para o teste do DPPH foi encontrado para o extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* (78,94%). Os perfis cromatográficos dos extratos indicaram a presença marcante de terpenos para esta espécie. Para o ensaio da citotoxicidade foi observado que o extrato avaliado induziu a morte celular, o qual na concentração de 50µg/mL reduziu em mais de 50% o número de células de melanoma murino B16F10-Nex2 para a período de 24h e 91% para o período de 48h de exposição. Concluiu-se que o extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*, além de exibir atividade antioxidante, pode ser considerada uma fonte com potencial antitumoral.

Palavras-chave: plantas medicinais, antioxidante, citotoxicidade, DPPH e jatobá.

## 1. Introdução

A pesquisa por novas fontes de compostos naturais com atividade biológica tornou-se importante para a descoberta de novas drogas para tratamento do câncer, pois os utilizados atualmente são agressivos e apresentam efeitos adversos as células normais do corpo (Steenkamp e Gouws, 2006; Ochwang'i et al., 2014). Os fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais, tendo as plantas se destacado como sua principal fonte, como por exemplo, os alcaloides do gênero *Vinca* e os diterpenos do gênero *Taxus*, os quais deram origem aos medicamentos vincristina® e paclitaxel® (Cragg e Newman, 2005; Alonso-Castro et al., 2011).

O gênero *Hymenaea* (família Fabacea, Caesalpinoideae) é distribuído na América do Sul e Central, com muitas espécies ocorrendo no Brasil (Lee e Langenheim, 1975). Esse gênero apresenta potencial econômico devido suas casca, seiva, resinas, frutos (casca, polpa e semente) e folhas (Silva et al., 2001; Matuda e Neto, 2005; Tamayo et al., 2008; Simões et al., 2009; Dias et al. 2013) e suas espécies são conhecidas popularmente como jatobá (Tamayo et al., 2008). O jatobá possui propriedades medicinais e suas diferentes partes são utilizadas para tratar gripe, anemia, bronquite, asma, dor de garganta, além da utilização como fortificante, expectorante, hepatoprotetor e vermífugo (Bezerra et al., 2013).

Estudos prévios têm demonstrado as atividades biológicas das espécies de *Hymenaea*, por exemplo, atividade anti-inflamatória de *H. courbaril* que tem sido relatada em estudos com modelo enzimático (Jayaprakasam et al., 2007; Braga et al., 2010). Além disso, alguns estudos têm ainda identificado e isolado compostos com atividade antioxidante e miorrelaxante de *H. courbaril* (Simões et al., 2009; Bezerra et al., 2013). Apesar disso, não há na literatura estudos com esta espécie sobre atividade citotóxica. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade da espécie *H. courbaril* sobre linhagens de células de melanoma.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Material Vegetal

As partes de *H.courbaril* foram coletadas em Novembro de 2012 a Fevereiro de 2013 na região do município de Assis (22°39'00,66''S e 50°26'15,86''O, altitude 845m), São Paulo, Brasil. Suas partes (folha, casca do fruto e semente) foram separadas, limpadas e secas em estufa com circulação de ar (Cienlab, Brasil) a temperatura de 40°C e então trituradas em moedor elétrico (Cienlab, CE-430, Brasil).

## 2.2. Preparação dos extratos

O material seco e moído (50g) de cada parte da espécie estudada foi submetido aos seguintes procedimentos de extração: (a) extração na proporção 1:10 (p/v) em solução hidroetanólica 70% (v/v) por 24h sendo reextraído por mais 2 vezes. (b) extração na proporção 1:10 (p/v) em metanol por 24h sendo reextraído por mais 2 vezes. Os extratos resultantes foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (Marconi, MA-120, Brasil) a temperatura de 40°C, os extratos hidroetanólicos, após este processo, foram congelados e posteriormente liofilizados em liofilizador (Liotop, L101, Brasil).

## 2.3. Atividade sequestradora do radical livre DPPH

A capacidade antioxidante foi mensurada nos extratos diluídos em álcool etílico absoluto na concentração de 250µg/mL de acordo com a técnica descrita por Blois, 1958. Uma alíquota de 1mL da solução de tampão acetato (pH 5,5 e 100mM) e 1,25mL de etanol P.A. foram misturados, em seguida, adicionou-se 250µL de solução de DPPH (500µM) (Sigma) e 50µL das amostras. A mistura foi agitada e permaneceu em repouso por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade. A descoloração do DPPH foi determinado por mensuração da absorbância a 517nm em espectrofotômetro UV-visível (Bel Photonics). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A atividade sequestradora do radical DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação: Atividade antioxidante (%) =  $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controle}}] \times 100$ , onde  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância das amostras após 30 minutos e  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle (contêm tudo exceto a amostra). Os resultados foram expressas como porcentagem de atividade antioxidante. Ácido gálico foi utilizado como controle.

## 2.4. Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando cromatoplaça (20 x 20 cm) de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) como fase estacionária. Aplicou-se nas cromatoplaças cerca de 10-20µL das amostras e dos padrões flavonoides (rutina e quercetina), alcaloides (emeína, solasidina, pilocarpina e cafeína) e terpenoides (alecrim, citronelol e eucaliptol). Para cada classe de compostos foi utilizada determinada fase móvel, para flavonoides utilizou-se clorofórmio-metanol-água (75:23:2), para terpenoides, toluol-acetato de etila (93:7) e para alcaloides, acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10). Desenvolveu-se o cromatograma em percurso de 10cm. A detecção das manchas sobre as placas de CCD foi realizada sob luz UV (365nm) antes e após a nebulização com as soluções reveladoras. O

reagente revelador difenilborato aminoetanol/PEG foi utilizado como revelador para flavonoides. Para revelar os terpenoides foi utilizado o reagente vanilina-ácido sulfúrico e para alcaloides foi utilizado o reagente Dragendorff. Foram calculados os fatores de retenção (Rf) e estes comparados com os padrões.

## 2.5. Avaliação citotóxica

Para o teste de citotoxicidade foi utilizada a linhagem de células de melanoma murino B16F10-Nex2. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo, com pH 7,2, e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 mM de ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico (HEPES) (Gibco), 24 mM de bicarbonato de sódio (Sigma) e 40mg/L de gentamicina, a 37°C em presença de 5% CO<sub>2</sub>.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em microplacas de 96 cavidades para cultura (Corning Costar), onde cada poço recebeu o inóculo de  $2 \times 10^3$  células em 100µL de meio RPMI completo e 100µL de extrato previamente dissolvido em diferentes concentrações (12,5; 25; 50; 100 e 200µg/mL) em DMSO (Dimetilsulfóxido) e RPMI de tal forma que a concentração de DMSO não excedesse 2%. Foi preparado também um controle negativo (N) contendo apenas o meio de cultura com as células B16F10-Nex2.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio da viabilidade celular, sendo que esta foi determinada pelo método de exclusão Azul de Tripán após o período de 24 e 48h de incubação.

## 3. Resultados

### 3.1. Atividade sequestradora do radical livre DPPH

Os resultados da atividade sequestradora de radical DPPH dos extratos na concentração de 250µg/mL mostraram que o extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou maior potencial antioxidante (78,94%), sendo que o mesmo não diferiu significativamente em comparação com o controle (Ácido gálico (80µg/mL) - 79,98%), e o mesmo foi estatisticamente diferente quando comparado com os extratos hidroetanólicos obtidos da casca do fruto e da folha, e estes não diferiram entre si. Semelhantemente o extrato metanólico da semente desta espécie também apresentou o maior potencial antioxidante (66,92%), quando comparado com os extratos obtidos das demais partes vegetativas (folhas e

casca do fruto), que não apresentaram diferença significativa entre si. No entanto, o extrato metanólico da semente apresentou diferença significativa em comparação ao controle. Os extratos da polpa da espécie avaliada não apresentaram atividade antioxidante (Tabela 1).

Tabela 1- Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (%) dos extratos hidroetanólicos e metanólicos de *H. courbaril* (extratos na concentração de 250 µg/mL).

Partes vegetais	Atividade antioxidante	
	<i>H. courbaril</i>	
	EH	EM
Folha	31,39±1,04 <sup>a</sup>	36,21±1,33 <sup>a</sup>
Casca do fruto	30,03±1,45 <sup>a</sup>	31,56±1,89 <sup>a</sup>
Semente	78,94±0,46 <sup>b</sup>	66,92±1,57 <sup>b</sup>
Polpa	-	-
Ácido gálico (80µg/mL)	79,98±1,60 <sup>b</sup>	

- = valor não detectado pelo teste; EH = extrato hidroetanólico; EM= extrato metanólico. Valores apresentados como média±desvio padrão, Médias com letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ).

### 3.2. Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos

Para o cromatograma de alcaloides os extratos hidroetanólico e metanólico da semente de *H. courbaril* não indicaram a presença destes, (Figura 1) porém, os extratos metanólico e hidroetanólico da folha de *H. courbaril* indicaram a presença desta classe de composto com fatores de retenções (Rf) (0,25 e 0,24 respectivamente) próximos ao do padrão solasidina (0,26).

O revelador utilizado para identificação de flavonoides, sob irradiação  $\lambda=365\text{nm}$  permitiu observar a fluorescência de cor amarela e alaranjada no cromatograma, (Figura 2) isso indicou a presença flavonoides nos extratos hidroetanólico e metanólico da folha de *H.courbaril*. Além disso o Rf obtido para esses extratos (Rf=0,16 para ambos extratos) apresentaram valor próximo ao do padrão rutina (Rf=0,18). Os extratos metanólicos e hidroetanólico da semente de *H. courbaril* não indicaram a presença de flavonoides (Figura 2). Apesar de não ter sido calculado o Rf do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*, todos os extratos indicaram a presença de terpenoides (Figura 3).

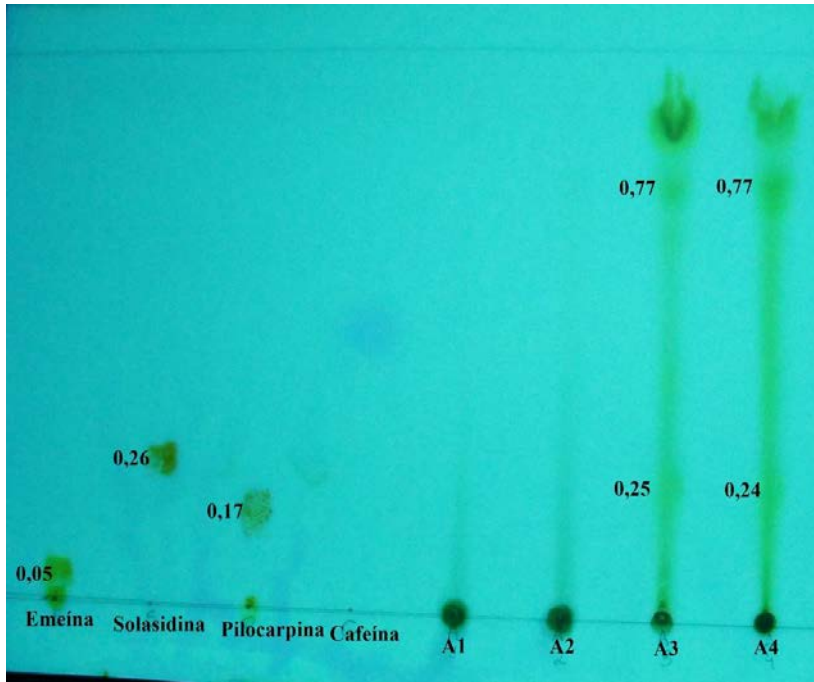


Figura 1 – Identificação de alcaloides por CCD. A1= Extrato metanólico da semente de *H. courbaril*. A2= Extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*. A3= Extrato metanólico da folha de *H. courbaril*. A4=Extrato hidroetanólico da folha de *H. courbaril*.

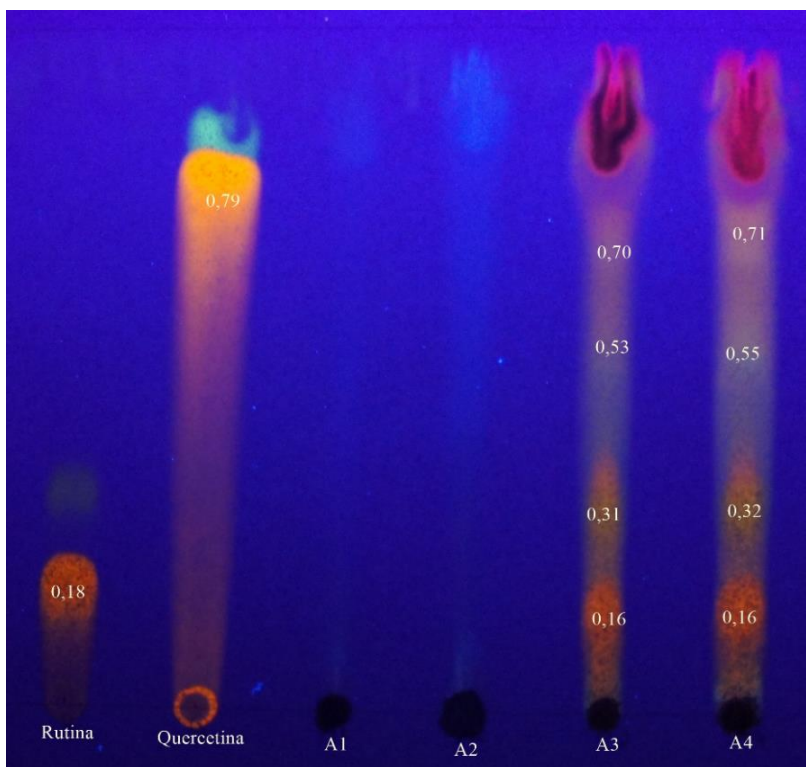


Figura 2 – Identificação de flavonoides por CCD. A1= Extrato metanólico da semente de *H. courbaril*. A2= Extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*. A3= Extrato metanólico da folha de *H. courbaril*. A4=Extrato hidroetanólico da folha de *H. courbaril*.

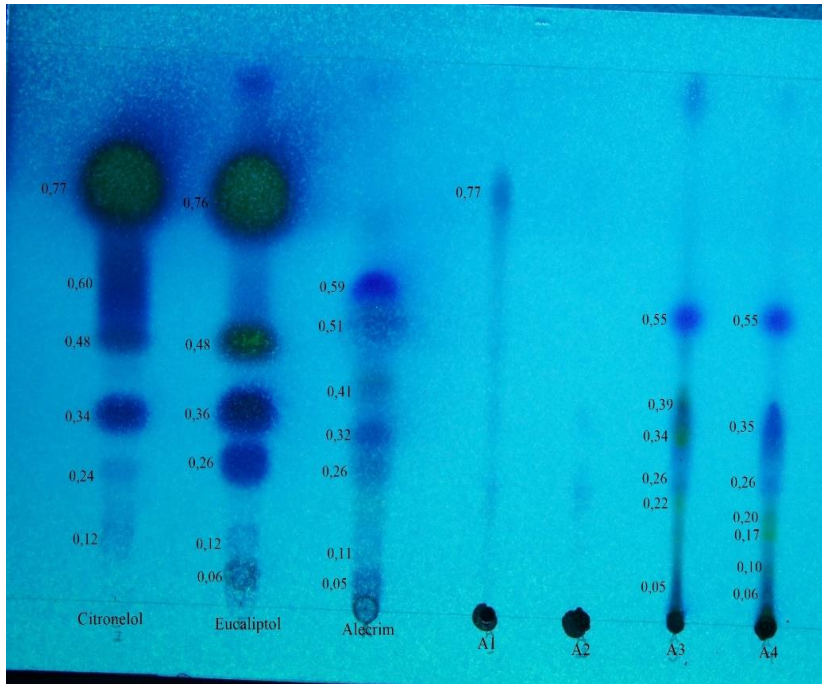


Figura 3 – Identificação de terpenoides por CCD. A1= Extrato metanólico da semente de *H. courbaril*. A2= Extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*. A3= Extrato metanólico da folha de *H. courbaril*. A4= Extrato hidroetanólico da folha de *H. courbaril*.

### 3.3. Avaliação citotóxica

A figura 4 apresenta a comparação entre o efeito citotóxico das diferentes concentrações do extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* nas células de linhagem B16F10-Nex2 após 24 e 48h de incubação. Os resultados revelaram que houve diferença entre as curvas do efeito citotóxico das diferentes concentrações do extrato em comparação as mesmas concentrações do extrato nos dois períodos de incubação. Os resultados obtidos para o período de 24 e 48h de incubação demonstraram uma queda acentuada no número de células, onde o efeito citotóxico foi dose-dependente da concentração do extrato. Para o período de 24h o extrato na concentração de 50µg/mL reduziu em mais da metade o número de células em comparação ao controle negativo (N) (Figura 4). Foi preparado o controle na concentração de 2% de DMSO para verificar se este reagente sozinho apresentava algum efeito citotóxico sobre as células de melanoma murino, o que poderia interferir nos resultados, sendo esta concentração de DMSO igualmente encontrada na amostra de 200µg/mL. Para o período de 24h de incubação o controle DMSO 2% reduziu 12% da viabilidade celular comparado ao controle negativo. Para o período de 48h de incubação, foi observado que o extrato na concentração de 25µg/mL apresentou uma redução de 86% do número de células viáveis e a concentração de 50µg/mL reduziu 91% e pode-se observar comparativamente que



ao passar do tempo o efeito das concentrações se aproximaram, diminuindo assim a diferença dos resultados (Figura 4). Com relação ao controle DMSO 2%, para o período de 48h de incubação houve uma redução de 29% do número de células viáveis, sendo este valor superior ao obtido para o período de 24h. A figura 5 mostra a atividade citotóxica do extrato nas concentrações de 12,5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$  comparadas ao controle negativo para o período de 48h de exposição, demonstrando significativa redução no crescimento de células.

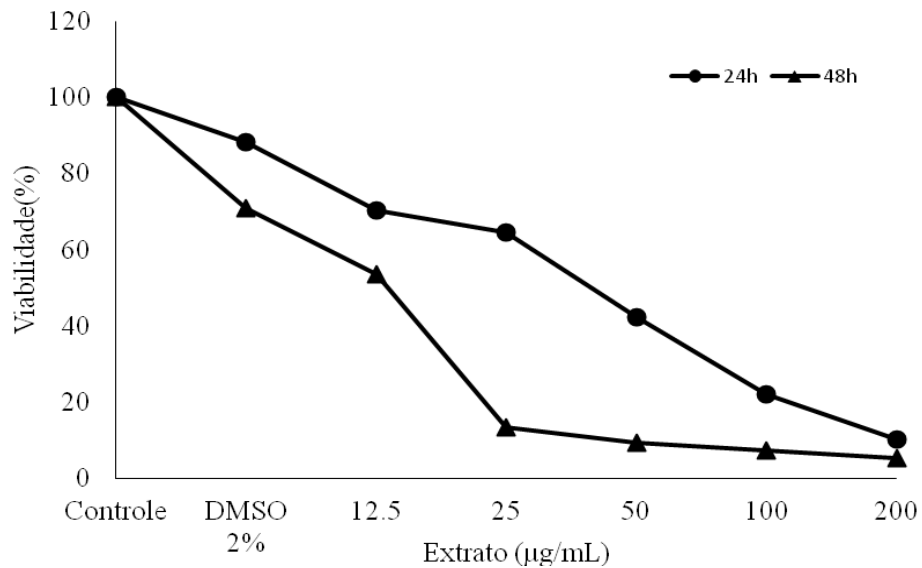


Figura 4 – Ensaio de citotoxicidade do extrato hidroetanólico de *H. courbaril* (12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ ) contra linhagem de células de melanoma murino.

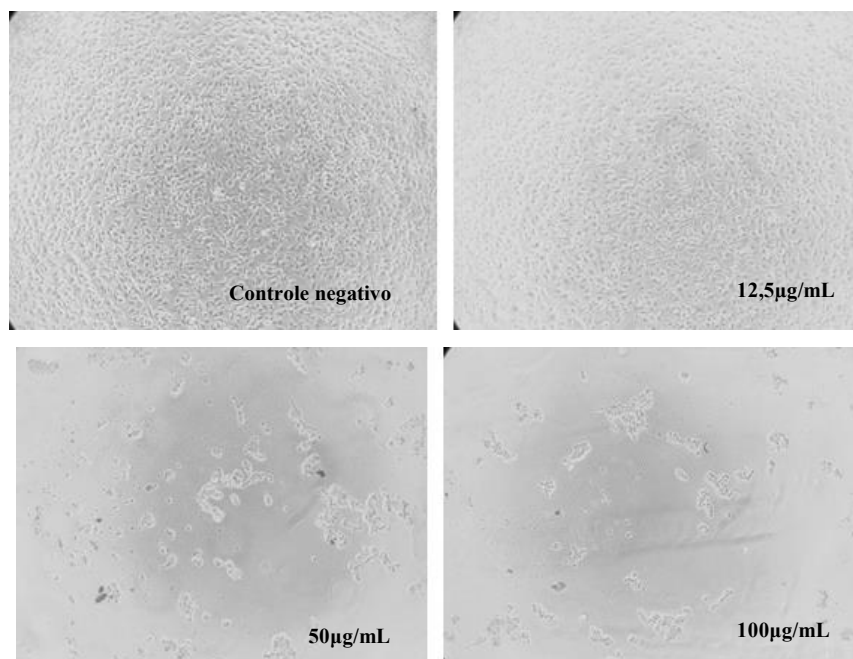


Figura 5- Citotoxicidade em células de melanoma murino para o ensaio de 48h para o controle positivo e as concentrações de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ , 50 $\mu\text{g/mL}$  e 100 $\mu\text{g/mL}$  de extrato de *H. courbaril*.

#### 4. Discussão

A atividade antioxidante de um extrato está relacionada a presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides (Scalbert et al., 2005; 2005b; Sailaja Rao et al., 2011; Li et al., 2013). Neste estudo alta atividade antioxidante foi observada para os extratos da semente de *H. courbaril*, em contrapartida, a CCD não indicou a presença de flavonoides, não corroborando assim os resultados. Por outro lado, estes compostos possivelmente estão presentes nos extratos hidroetanólico e metanólico da folha de *H. courbaril*, pois os mesmos apresentaram na CCD mancha de cor laranja e, de acordo com Wagner e Bladt (1995), flavonóis, como por exemplo rutina apresentam coloração laranja para CCD, além disso Rf obtido para esses extratos apresentaram valores próximos ao do padrão rutina. Na CCD a banda de coloração marrom formada pela reação com o reagente Dragendorff indica a presença de alcaloides (Wagner e Bladt, 1995) o que possivelmente está presente nos extratos da folha de *H. courbaril*. Com relação a terpenoides, o gênero *Hymenaea* é conhecido por ser rico destes compostos, Jayaprakasam et al. (2007) demonstrou isto em seu estudo ao avaliar os frutos de *H. courbaril*, e de acordo com Wagner e Bladt (1995), terpenoides podem ser identificados em CCD pela formação de manchas azul-violeta, sendo estas manchas observadas neste estudo.

Diversos autores têm relatado atividade citotóxica de plantas sobre células de melanoma, Rajasekar et al (2012) demonstraram atividade citotóxica de *Lithospermum erythrorhizon* sobre células B16F10, mesma atividade foi demonstrada por Oliveira et al (2013) ao avaliar o látex de *Synadenium grantii*.

A atividade citotóxica *in vitro* do extrato de *H. courbaril* sobre células de melanoma murino foi relatada pela primeira vez neste trabalho. O teste de citotoxicidade é um método rápido para o screening de produtos naturais e sintéticos com potencial antitumoral (Oliveira et al., 2013), permite determinar o tempo e a concentração necessários para a ocorrência da morte celular em resposta aos tratamentos. Da mesma forma que a variação de tempo pode interferir no efeito de uma determinada concentração da substância, a concentração também pode interferir no tempo para o aparecimento do evento. Isto pode ser observado na figura 4, onde o extrato na concentração de 25µg/mL apresentou para o período de 48h um efeito citotóxico superior em comparação ao efeito obtido para a mesma concentração no período de 24h.

O controle DMSO 2% por ter apresentado efeito citotóxico, embora o menor valor quando comparado as amostras, indica que possivelmente pode interferir nos resultados. O extrato hidroetanólico de *H. courbaril* ainda não foi investigado para a atividade citotóxica

em outras linhagens celulares tanto tumoral como não tumoral, o qual demonstraria se o extrato apresenta efeito seletivo, característica importante para desenvolvimento de novas drogas, limitando assim os dados apresentados neste estudo.

## 5. Conclusão

O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou atividade antioxidante e citotoxicidade sobre as células de melanoma murino B16F10 Nex2. A atividade antioxidante e citotóxica observada para este extrato faz dele uma fonte importante de compostos com atividade biológica, indicando-a como fonte promissora para o desenvolvimento de novos fármacos frente às células tumorais.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/15430-5) pelo suporte financeiro; ao Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, Maria Amábil Sanches e José Gilberto Millani do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP) pelo suporte técnico.

## Referências

- Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* 133:945–72.
- Bezerra GP, Góis RWDS, Brito TS, Lima FJB, Bandeira MAM, Romero NR, Magalhães PJC, Santiago GMP (2013). Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. *J. Ethnopharmacol.* 149:62–9.
- Blois MS (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181:1199–1200.
- Braga FC, Wagner H, Lombardi JA, Oliveira AB (2010). Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine* 6:447–52.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J. (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100:72–79.
- Dias LS, Luzia DMM, Jorge N (2013). Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. *Ind. Crops Prod.* 49:610–618.

- Harput US, Genc Y, Saracoglu I (2012). Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food Chem. Toxicol.* 50:1554–9.
- Jayaprakasam B, Alexanderlindo R, Dewitt D, Nair M (2007). Terpenoids from Stinking toe (*Hymenae courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. *Food Chem.* 105:485–490.
- Lee Y-T, Langenheim JH (1975). Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). *University of California Publications in Botany* 69, 1–109.
- Li S, Li SK, Gan RY, Song FL, Kuang L, Li HB (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* 51:289–298.
- Matuda TG, Netto FM (2005). Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25:353–357.
- Ochwang'i DO, Kimwele CN, Oduma JA, Gathumbi, PK, Mbaria JM, Kiama, SG (2014). Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 151:1040-1055.
- Oliveira TL, Munhoz ACM, Lemes BM, Minozzo BR, Nepel A, Barison A, Fávero GM, Campagnoli EB, Beltrame FL (2013). Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. *Journal of Ethnopharmacology* 150:263–269.
- Rajasekar S, Park DJ, Park C, Park S, Park YH, Kim ST, Choi, YH, Choi YW (2012). *Journal of Ethnopharmacology* 144:335–345.
- Sailaja Rao P, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S (2011). Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals Antioxidants* 1:2–7.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:215S–217S.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005b). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287–306.
- Silva MR, Silva MS, Martins KA, Borges S (2001). Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 21:176–182.
- Simões K, Du J, Pessoni RAB, Cardoso-Lopes EM, Vivanco JM, Stermitz FR, Braga MR (2009). Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Phytochem. Lett.* 2:59–62.
- Steenkamp, V.; Gouws, M. C. (2006) Cytotoxicity of six South African medicinal plant extracts used in the treatment of cancer. *South African Journal of Botany*, 72:630–633.

Tamayo A, María L, González A, María D, Garcés J, Garcés YJ (2008). Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. Rev. Las. Investig. 5:100-111.

Vieira RF, Martins MVM (2000). Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. Rev. Bras. Pl. Med. 3:13-36.

Wagner H, Bladt, S (1995). Plant drug analysis, Springer, Berlin. 384 p.

## CONCLUSÕES GERAIS

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* se destacou por apresentar atividade antioxidante superior aos demais extratos desta espécie e também da espécie *H. stigonocarpa* nos métodos DPPH e FRAP. No teste ORAC-FL o extrato hidroetanólico da folha de *H. stigonocarpa* apresentou maior potencial antioxidante.
- Elevado teores de fenóis e flavonoides totais foram obtidos no extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril*.
- Apesar das espécies avaliadas demonstrarem potencial antioxidante e presença de compostos fenólicos, elas não apresentaram atividade fotoprotetora, visto que nenhum FPS determinado foi satisfatório.
- De acordo com o perfil cromatográfico foi possível observar que a folha da espécie *H. courbaril* apresenta alcaloides, assim como flavonoides. Para o cromatograma de terpenoides, foi possível constatar a presença deste composto em todos os extratos.
- O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou atividade citotóxica sobre células de melanoma murino.