DANIELA GRANJA ARAKAKI

# ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA POLPA DO JATOBÁ-DO-CERRADO (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.*)*

CAMPO GRANDE-MS

2015

DANIELA GRANJA ARAKAKI

# ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA POLPA DO JATOBÁ-DO-CERRADO (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.*)*

Em atendimento à elaboração do trabalho de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, área: Nutrição e Metabolismo.

Orientadora: Profª. Dra. Priscila Aiko Hiane
Co-orientadora: Profª. Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães

Campo Grande-MS

2015

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

DANIELA GRANJA ARAKAKI

# ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO JATOBÁ-DO-CERRADO (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.*)*

Em atendimento à elaboração do trabalho de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, área: Nutrição e Metabolismo.

Resultado _____

Campo Grande (MS) _____de_____de_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof._____

Instituição_____

_____

Prof._____

Instituição_____

_____

Prof._____

Instituição_____

## RESUMO

O metabolismo do oxigênio nas células ocasiona a produção de radicais livres, e se não controlados, podem causar danos, provocando alterações na estrutura e funções celulares, estando envolvido em diversas patologias. Antioxidante pode ser definido como uma substância, que em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação de um substrato. Entre os alimentos que contém antioxidantes naturais, as frutas e os vegetais são os que mais contribuem para o suprimento dietético destes compostos. A flora do Cerrado possui diversas espécies frutíferas com grande potencial agrícola, consumidos pela população local, como o jatobá-do-cerrado. Este estudo teve como objetivo caracterizar a polpa do jatobá-do-cerrado, determinando quantidades de macronutrientes, teores de vitamina C e vitamina A, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquoso, etanólico e hidrocetônico através do método DPPH, quantificar os fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalteau e taninos por Folin-Denis destes extratos; além de determinar o potencial antioxidante *in vivo* do extrato hidrocetônico do jatobá-do-cerrado através da técnica de TBARS. Na caracterização química do jatobá-do-cerrado, o fruto apresentou como principais constituintes glicídios totais e fibras. Para vitamina C foi encontrado valor de 138,78 $mg.100g^{-1}$ e para β-caroteno 115,3 $mg.100\ g^{-1}$. O extrato etanólico apresentou menor poder antioxidante na avaliação *in vitro*, seguido do aquoso e com maior potencial antioxidante no extrato hidrocetônico, com $IC_{50}$ de 618,06 $mgDPPH.g^{-1}$, 117,07 $mgDPPH.g^{-1}$e <26,76 $mgDPPH.g^{-1}$, respectivamente. O mesmo padrão foi seguido na extração de fenóis, onde o extrato etanólico apresentou 444,97 $mgEAG.100g^{-1}$ de fruto, o extrato aquoso 669,64 $mgEAG.\ 100g^{-1}$ e o hidrocetônico 786,18 $mgEAG.\ 100g^{-1}$; e de taninos, onde o extrato etanólico apresentou 728,14 $mgEAT.\ 100g^{-1}$ de fruto, o extrato aquoso 1518,43 $mgEAT.100g^{-1}$ e o hidrocetônico 1838,69 $mgEAT.100g^{-1}$. *In vivo*, o extrato hidrocetônico foi capaz de inibir a peroxidação lipídica em 13,46% para administração de 150 µL/mL/dia, 30,77% para 250 µL/mL/dia e de 62,92% para 500 µL/mL/dia, em relação ao grupo controle, tendo demonstrado um significante potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*.



**Palavras-chave: Bioativos. Ratos. Frutos do cerrado.**

## ABSTRACT

The metabolism of oxygen in the cells causes the production of free radicals, and if it is not controlled, can promote damages that may include changes in the structure and cellular functions, being involved in various diseases. Antioxidant can be defined as a substance which at low concentrations, slows or prevents the oxidation of a substrate. Among the foods that contain natural antioxidants, fruits and vegetables are the main contributors to the dietary supply of these compounds. The Brazilian Cerrado has several fruit species with great agricultural potential, used by the local population, such as jatoba-do-cerrado. This study aimed to characterize the pulp of jatoba-do-cerrado by determining amounts of macronutrients, vitamin C and vitamin A, evaluate the in vitro antioxidant activity of aqueous, ethanol and acetone:water extracts by DPPH method, quantify the total phenols by the Folin-Ciocalteu method and tannins by Folin-Denis of these extracts and to determine the in vivo antioxidant potential of acetone:water extract jatobá-do-cerrado by TBARS technique. On the chemical caracterization of jatoba-do-cerrado, the main constituints were carbohydrates and fiber. It was found value of 138.78 $mg.100g^{-1}$ for vitamin C and 115.3 $mg.100\ g^{-1}$ for β-carotene. The ethanol extract showed lower antioxidant capacity in the in vitro evaluation, followed by the aqueous extract, with higher antioxidant potential on acetone:water extract, with $IC_{50}$ 618.06 $mgDPPH.g^{-1}$, 117.07 $mgDPPH.g^{-1}$ and $IC_{50}$ <26.76 $mgDPPH.g^{-1}$, respectively. The same pattern was followed in the extraction of phenols, where the ethanol extract had 444.97 $mgGAE.100g^{-1}$ of fruit, the aqueous extract 669,64 $mgGAE.100g^{-1}$. 100g-1 and acetone:water extract 786.18. $mgGAE.100g^{-1}$; and tannins, where the ethanol extract had 728.14 $mgTAE.100g^{-1}$ of the fruit, the aqueous extract 1518.43 $mgTAE.100g^{-1}$ and acetone:water extract 1838.69 $mgTAE.100g^{-1}$. *In vivo* the acetone:water extract was able to inhibit lipid peroxidation in 13.46% with administration of 150 µL/mL/day, 30.77% for 250 µL/mL/day and 62.92% for 500 µL/mL/day, in comparison to the control group, having demonstrated significant antioxidant potential *in vitro* and *in vivo*.



**Key-words: Bioactives. Rats. Cerrado fruits.**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da polpa do jatobá-do-cerrado ..... 39

Tabela 2 - Atividade antioxidante, fenóis totais e taninos *in vitro* dos extratos hidrocetônico, etanólico e aquoso da polpa do jatobá-do-cerrado..... 42

Tabela 3 - Massa inicial, massa final e ganho de massa dos grupos (n=8) controle e tratados com suspensão da polpa do jatobá-do-cerrado, extraída com acetona/água (80:20).....47

Tabela 4 – Porcentagem de inibição da oxidação do tecido do cérebro dos ratos, de acordo com a concentração do extrato hidrocetônico do jatobá-do-cerrado (µL/mL//dia) administrada. ..... 49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fruto de jatobá-do-cerrado (a) e farinha de polpa de jatobá (b) .....15

Figura 2 - Árvore do jatobá-do-cerrado .....16

Figura 3 - Formação do radical livre.....17

Figura 4 - Formas radicalar e não-radicalar do DPPH .....22

Figura 5 - Estrutura do ácido ascórbico.....26

Figura 6 - Estrutura de carotenoides acíclicos e cíclicos.....27

Figura 7 - Fluxograma de preparo de amostra e análises para avaliação *in vitro e in vivo* da polpa de jatobá-do-cerrado. .....32

Figura 8 - Fluxograma da preparação dos extratos hidrocetônico, aquoso e etanólico .....33

Figura 9 - Inibição da oxidação do radical livre estável DPPH, de acordo com a concentração dos extratos hidrocetônico, aquoso e etanólico do jatobá-do-cerrado (mL/mL). .....43

Figura 10 - Inibição da oxidação do tecido do cérebro dos ratos, de acordo com a concentração do extrato hidrocetônico do jatobá-do-cerrado (µL/mL/dia) administrada.
. .....48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| BHA | Hidroxianisol butilato |
| BHT | Hidroxitolueno butilato |
| BOD | Biochemical Oxygen Demand |
| C | Controle |
| CAT | Catalase |
| CEUA | Comitê de Ética em Uso de Animais |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazila |
| DRI | Doses Recomendadas de Ingestão Diária |
| ERN | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| ET | Transferência de Elétrons |
| EAG | Equivalentes de Ácido Gálico |
| GSH | Glutationa |
| HAT | Transferência de Átomo Hidrogênio |
| $IC_{50}$ | Coeficiente de Eficiência |
| ORAC | Oxygen Radical Absorbance Capacity |
| SOD | Super Óxido Dismutase |
| T1 | Tratado 1 |
| T2 | Tratado 2 |
| T3 | Tratado 3 |
| EAT | Equivalentes de Ácido Tânico |
| TBARS | Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico |
| TBHQ | *Terc*-butil-hidroquinona |

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| Al | Alumínio |
| Ar | Argônio |
| Ca | Cálcio |
| Cu | Cobre |
| F | Flúor |
| Fe | Ferro |
| g | Grama |
| h | Hora |
| I | Iodo |
| K | Potássio |
| m | Metro |
| Mg | Magnésio |
| mL | Mililitro |
| Mn | Manganês |
| Na | Sódio |
| nm | nanômetro |
| ºC | Graus Celsius |
| v | Volume |
| Zn | Zinco |

**SUMÁRIO**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 14
2.1 Radicais livres ..... 16
2.2 Estresse oxidativo ..... 18
2.3 Atividade antioxidante ..... 19
2.4 Ensaios de capacidade antioxidante ..... 21
2.5 Bioativos ..... 24
2.5.1 Compostos fenólicos ..... 24
2.5.2 Taninos ..... 25
2.5.3 Ácido ascórbico ..... 26
A vitamina C (ácido ascórbico) (Figura 5) é um nutriente hidrossolúvel, essencial ao ser humano, pois não é produzido pelo organismo, sendo envolvida em diversas funções biológicas (VASCONCELOS *et al*., 2007). Esta é cofator de várias enzimas presentes na hidroxilação, pós-tradução do colágeno, na biossíntese de carnitina, na conversão do neurotransmissor dopamina a norepinefrina, na amidação peptídica e no metabolismo da tirosina. Além disso, está envolvida na absorção de ferro, ao reduzir a forma férrica ($Fe^{3+}$) a ferrosa ($Fe^{2+}$) (CERQUEIRA *et al*., 2007) ..... 26
Figura 5 - Estrutura do ácido ascórbico ..... 26
2.5.4 Carotenoides ..... 27
Figura 6 - Estrutura de carotenoides acíclicos e cíclicos ..... 27
3. OBJETIVO GERAL ..... 30
3.1 Objetivos específicos ..... 30
4. MATERIAL E MÉTODOS ..... 31
4.1 Obtenção da matéria-prima ..... 31
4.2 Composição química ..... 32
4.3 Preparo dos extratos ..... 32
4.4 Determinação de atividade antioxidante *in vitro* ..... 34
4.4.1 Método DPPH ..... 34
4.4.2 Quantificação de compostos fenólicos ..... 34
4.4.3 Quantificação de taninos ..... 35
4.4.4 Quantificação de carotenoides ..... 36
4.4.5 Quantificação de ácido ascórbico ..... 36
4.5 Determinação da atividade antioxidante *in vivo* ..... 36

4.6 Análise estatística .....38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....39
5.1 Composição química do fruto .....39
5.2 Atividade antioxidante *in vitro*.....42
5.3 Atividade antioxidante *in vivo* .....46
6. CONCLUSÕES .....52
7. REFERÊNCIAS.....53

## 1. INTRODUÇÃO

O processo oxidativo leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células, entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células também ocasiona a produção de radicais livres. Agentes oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo, e se não controlados, podem causar danos, tais como alterações na estrutura e funções celulares, envolvidos em diversas patologias como câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, dentre outras (ROESLER *et al.,* 2007;DAVID *et al.,* 2010).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação de um substrato (SUCUPIRA *et al.*, 2012). Estes são responsáveis pela inibição e redução de lesões causadas pelos radicais livres nas células (ABRAHÃO *et al.,* 2012).

Entre os alimentos que contém antioxidantes naturais, as frutas e os vegetais são os que mais contribuem para o suprimento dietético destes compostos associados aos efeitos benéficos à saúde (SUCUPIRA *et al.,* 2012).

A flora do Cerrado brasileiro possui diversas espécies frutíferas com grande potencial agrícola, consumidos pela população. Os frutos nativos são consumidos geralmente *in natura* ou sob forma de sucos, licores, sorvetes, geleias e doces diversos. Pesquisas dos frutos da região têm evidenciando seu potencial antioxidante, através da descrição de bioativos presentes, corroborando com achados populares, tais como jambolão, araticum, lobeira, cagaita e pequi (ROCHA *et al,* 2011; FARIA *et al.,* 2011; ROESLER *et al.,* 2007).

O jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*), pertencente à família *Leguminosae,* sendo este, um fruto encontrado naturalmente nas regiões do Cerrado e Cerradão, em solos bem drenados e não inundáveis. O fruto é um legume seco, de cor que varia de marrom-claro ao marrom-escuro. Em cada fruto, se encontra de uma a seis sementes e, envolvendo estas, há o arilo, de coloração amarelo-esverdeado, macio, fibroso-farináceo, com cheiro característico e sabor doce (EMBRAPA *et al.,* 2007; EMBRAPA, 2010).

Este fruto possui potencial de exploração e plantio sendo utilizado na comercialização de subprodutos, como, por exemplo, a farinha extraída do jatobá-do-cerrado (ÁVILA *et al.,* 2010).

Mediante o exposto justifica-se no presente estudo, avaliar os compostos antioxidantes *in vitro* e *in vivo* deste fruto majorando a exploração e conhecimento acerca do fruto, e aumentando o potencial de cultivo e comercialização dos mesmos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Cerrado é um dos maiores e mais importantes biomas do Brasil e América do Sul, presente em diversos Estados brasileiros, com grande biodiversidade. Frutos nativos ocupam lugar de destaque neste ecossistema, pois muitos são comercializados e consumidos *in natura* ou beneficiados por indústrias caseiras (EMBRAPA, 2007).

Este bioma ocupa 25% do território brasileiro, sendo segundo maior bioma da América do Sul, perdendo em tamanho apenas para a Floresta Amazônica (ROESLER *et al.,* 2007). Apresenta aproximadamente 204 milhões de hectares, englobando 12 estados, sendo que sua distribuição é determinada pela atitude, pelas formas de relevo, limitações de fertilidade química do solo e pela sazonalidade pluviométrica (BRASIL, 2002).

Os frutos do cerrado podem apresentar relevância econômica por serem explorados por pequenos agricultores e pela atividade extrativista. Estes frutos apresentam excelentes propriedades sensoriais, mas não foram muito estudados e tem baixa disponibilidade comercial. No entanto, as características sensoriais destes frutos os tornam bastante adequados para consumo *in natura* ou para uso como aditivos alimentares. Além disso, estes frutos têm chamado a atenção dos consumidores, dada a importância que os alimentos nutracêuticos e funcionais tem conquistado no mercado (FINCO; SILVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

O consumo do jatobá pode ser *in natura* ou sob forma de farinha, que deve ser moída ou liquidificada e depois peneirada, para a produção de pães, bolos ou biscoitos. A extração da polpa do jatobá é lenta e de baixo rendimento (ALMEIDA, 1998 *apud* ÁVILA, 2010).

O jatobá-do-cerrado (Figura 1) é uma leguminosa arbórea, da mesma família (*Fabaceae*) do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), do baru (*Dipteryx alata* Vog.), copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) e do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) (EMBRAPA, 2010), possuindo frutos em forma de vagens arredondadas, de casca fina, medindo até três centímetros de espessura. A superfície da casca externa é profundamente sulcada, de coloração pardo-avermelhada, com cristas planas e duras. A casca interna é estratificada, com listras paralelas, claras e escuras. A polpa do jatobá apresenta-se de forma amarelada, com polpa amarelo-pálida,

farinácea, adocicada, comestível, de sabor e aroma característicos (EMBRAPA, 2010).

Figura 1- Fruto de jatobá-do-Cerrado (a) e farinha de polpa de jatobá (b)
Fonte: domínio público

O fruto do jatobá foi caracterizado por Cardoso e colaboradores (2013), apresentou elevado teor de carboidratos (34,1 ± 3,3%) e fibras (44,3 ± 2,3%) e baixo teor de proteínas (5,6 ± 0,4%), de umidade (8,8 ± 1,0%) e de lipídeos (3,8 ± 1,0%). O alto teor de fibras e baixo teor de proteínas em comparação a outras leguminosas foi relacionado pelos pesquisadores ao fato de que a polpa do jatobá é a parte consumida, enquanto que em outras leguminosas, a parte consumida é a semente.

Em cada fruto, pode ser encontrado entre 1 e 6 sementes, sendo estas: globosas, largo-oblongas, obovadas, comprimidas, com ápice arredondado ou levemente truncado e base arredondada, superfície irregular, com algumas depressões (EMBRAPA, 2007).

A árvore do jatobá (Figura 2) é utilizada na produção de diversos produtos, sendo também considerada ornamental e própria para arborização urbana. A madeira é utilizada na construção civil e naval, e no cozimento de sua entrecasca é possível retirar tinta de cor vermelha. Popularmente, o chá da casca do jatobá é utilizado para problemas renais, hepáticos, infecções intestinais e ainda cicatrizante e expectorante, e sua polpa utilizada para se obter efeito laxante (EMBRAPA, 2010).

Figura 2 – Árvore do jatobá-do-cerrado

Fonte: domínio público

Estudo experimental em ratos demonstrou que o extrato metanólico da casca do jatobá apresenta capacidade medicinal para o tratamento de úlceras gástricas e duodenais, além de efeito antidiarreico, corroborando com os achados populares (ORSI *et al*., 2012). Os mesmos achados foram reportados em modelos animais de úlcera induzida por trinitrobenzenosulfônico em ratos (ORSI *et al*., em 2014).

Além do uso medicinal do jatobá-do-cerrado, foi demonstrado possível uso no controle de cupins, devido a presença de flavonóides. Os flavonóides são compostos naturais, parte das defesas naturais de plantas, que apresentam capacidade de controle de cupins e fungicidas. O extrato do cerne da madeira do jatobá demonstrou ser mais eficaz que flavonoides puros, como quercetina e taxofolina no controle destas pragas (MARANHÃO *et al.,* 2013).

## 2.1 Radicais livres

A oxidação é um processo metabólico que ocorre durante a produção de energia (ROESLER *et al*., 2007). É parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo humano, produzindo radicais livres naturalmente ou devido a alguma disfunção biológica (BARREIROS; DAVID, 2006).

Radicais livres são quaisquer espécies que contêm um elétron desemparelhado em sua órbita atômica, se tornando altamente reativo (Figura 3) (PRIOR; WU, 2013). Os radicais livres encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Radicais livres centrados em elétrons desemparelhados em átomos de oxigênio ou nitrogênio são chamados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) (BARREIROS; DAVID, 2006).

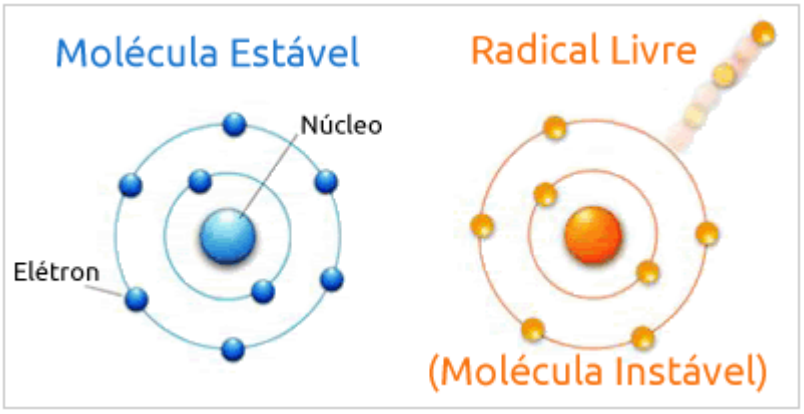


Figura 3 - Formação do radical livre
Fonte: domínio público

As ERO e ERN são termos que abrangem as formas reativas do oxigênio e nitrogênio, incluindo radicais e não-radicais que participam de reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares. Embora as ERO e ERN sejam associadas à oxidação, algumas são agentes redutores em meio biológico, mas também contribuem para reações em cadeia que resultam em dano (CERQUEIRA *et al.,* 2007).

Pró-oxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que possuem capacidade de oxidar moléculas-alvo. Radicais livres são espécies cuja reatividade resulta da presença de um ou mais elétrons desemparelhados, capazes de existência independente em intervalos de tempo variáveis (CERQUEIRA *et al.,* 2007).

Dentre os radicais livres e espécies radicalares ou intermediárias do oxigênio encontradas no organismo, os de maior importância são: Ânion-radical superóxido; radical hidroxila; radicais alcoxila e peroxila; oxigênio singleto; ozônio e peróxido de

hidrogênio. O peróxido de hidrogênio não necessariamente é um radical livre, mas sim um intermediário que, na presença de metais, gera o radical hidroxila, expresso pela equação 1 (Eq.1). Dentre as ERN estão o óxido nítrico; o dióxido de nitrogênio; o cloreto de nitrila e o intermediário peroxinitrito, formado pela reação do ânion-radical superóxido e do óxido nítrico (VASCONCELOS *et al.,* 2007).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + {}^{-}OH + {}^{\bullet}OH \qquad \text{Eq. 1}$$

O radical hidroxila é considerado o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo* e por ser muito reativo. Este radical ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Este radical ainda reage com uma série de endobióticos, causa modificação do DNA, danos nas proteínas e inativação enzimática e peroxidação lipídica (BARREIROS; DAVID, 2006); (VASCONCELOS *et al*., 2007).

O ânion-radical superóxido de forma oposta aos outros radicais livres é inativo. Mas, pode originar o peróxido de hidrogênio, auxiliando na produção do radical hidroxila e também pode reagir com o radical hidroxila, formando o oxigênio singleto (BARREIROS; DAVID, 2006).

Os radicais alcoxila e peroxila são formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica (VASCONCELOS *et al*., 2007).

O oxigênio singleto é o estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou outras reações. Este é uma das espécies mais danosas ao organismo, uma vez que é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do $O_2$ em organismos. O ozônio é capaz de oxidar rapidamente proteínas, DNA e lipídeos (BARREIROS; DAVID, 2006); (VASCONCELOS *et al*., 2007).

## 2.2 Estresse oxidativo

Quando há produção excessiva de ERO e ERN, o organismo necessita dispor de um sistema antioxidante, restabelecendo o equilíbrio. Verifica-se ocorrência de

estresse oxidativo quando há desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante (VASCONCELOS *et al.,* 2007).

O estresse oxidativo está relacionado com a etiologia de diversas patologias, especialmente os vários tipos de cânceres, doenças cardiovasculares e desordens inflamatórias, além de se perceber forte relação com o processo de envelhecimento.

A presença de estresse oxidativo tem demonstrado um importante papel nas respostas imunes. Nas células dendríticas convencionais o estresse oxidativo age tanto como um regulador da resposta inflamatória e da polarização das células T. em contraste, efeitos deletérios foram demonstrados em diversas patologias autoimunes e inflamatórias, incluindo o diabetes tipo 1, asma e doenças inflamatórias intestinais (QIN, *et al.,* 2015).

Os mecanismos pelos quais estas patologias se desenvolvem são geralmente alterações oxidativas de moléculas consideradas críticas, incluindo proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, além de substâncias envolvidas na expressão gênica (PRIOR; WU, 2013), (SILVA *et al*., 2010).

## 2.3 Atividade antioxidante

Antioxidante pode ser definido como uma substância que auxilia na redução da severidade do estresse oxidativo ao formar um radical menos reativo ou pela mitigação dos danos causados pela reação em cadeia em substratos (proteínas, lipídeos, carboidratos ou DNA) por radicais livres (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). Estes são responsáveis pela inibição e redução de lesões causadas pelos radicais livres nas células (ABRAHÃO *et al.,* 2012), inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (RODRIGUES *et al*, 2003).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação através de dois mecanismos: primário e secundário. Os antioxidantes primários, representados pelos compostos fenólicos, podem atuar de duas formas: pela transferência de hidrogênio ou pela transferência de elétrons. Os antioxidantes secundários retardam as reações de autoxidação por meio da complexação de metais, remoção de oxigênio,

decomposição de hidroperóxidos com formação de compostos mais estáveis e regeneração dos antioxidantes primários (SILVA; JORGE, 2011).

Até então, nenhum antioxidante de forma isolada contêm todas as qualidades necessárias para um bom antioxidante: deve ser um composto biológico naturalmente presente em tecidos animais; ser ativo na proteção de moléculas de proteínas e lipídios; ter boa disponibilidade após administração oral ou parenteral; deve ter meia-vida longa; ser ativo espaço intracelular e extracelular e ser capaz de cruzar a membrana celular intacto (OLIVEIRA *et al*., 2009), embora possam trabalhar de forma sinérgica, otimizando seus benefícios.

Em 2011, Halliwell valorizou o efeito dos antioxidantes endógenos em detrimento dos antioxidantes dietéticos, ao relatar que a capacidade antioxidante total de células e tecidos beneficia-se muito mais de antioxidantes como a glutationa (GSH) ou da superóxido dismutase (SOD), enquanto os antioxidantes dietéticos teriam uma função bem menor.

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático, sendo o enzimático representado principalmente pela SOD, que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2$•) a peróxido de hidrogênio $H_2O_2$, e $O_2$, a catalase (CAT) atuando na decomposição de $H_2O_2$ a $H_2O$ e $O_2$ e a glutationa peroxidase, que atua sobre peróxidos em geral, com utilização da GSH como cofator. O sistema não enzimático engloba a GSH, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico, β-caroteno, proteínas de transporte de metais de transição (VASCONCELOS *et al.,* 2007).

Outra classificação que se pode dar aos antioxidantes se diz sobre sua disponibilidade na natureza, podendo ser naturais ou sintéticos. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados estão o hidroxianisol butilato (BHA), o hidroxitolueno butilato (BHT), o galato de propila, a *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e os sorbatos (OLIVEIRA *et al*., 2009).

O uso abusivo de antioxidantes sintéticos é questionado devido ao seu potencial risco, associado a efeitos deletérios e/ou tóxicos no organismo e possivelmente à carcinogênese, além de reduzir a qualidade nutricional dos produtos. O uso do BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores, enquanto que, em humanos esta associação não está clara. O uso de TBHQ foi atribuído a redução dos níveis de hemoglobina e de hiperplasia de células basais. A

aplicação destes antioxidantes foi banida ou limitada em diversos países (RAMALHO; JORGE, 2006); (DING e ZOU, 2012); (FREITAS; FATIBELLO-FILHO, 2010); (ANDRÉ *et al*., 2010).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que o consumo regular de frutas e vegetais está associado à redução da mortalidade e morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis e câncer. Evidências epidemiológicas ainda demonstraram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de substâncias fenólicas. Este efeito protetor tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes (BROINIZI *et al*., 2007); (MELO *et al*., 2008a); (ROCHA *et al.,* 2013).

Desta forma, a substituição de antioxidantes sintéticos pelos naturais pode apresentar benefícios, tanto devido às suas implicações na saúde, quanto na funcionalidade. Os antioxidantes naturais apresentam maior solubilidade em compostos aquosos e lipídicos, além de poderem ser aproveitados em nível preservisionista, ao se utilizar resíduos descartados pela indústria alimentícia (OLIVEIRA *et al*., 2009).

## 2.4 Ensaios de capacidade antioxidante

Os ensaios de capacidade antioxidante *in vitro* podem ser divididos em dois tipos, baseados em suas reações com radicais livres: Ensaios baseados na transferência de átomo hidrogênio (HAT) e reações baseadas na transferência de elétrons (ET). A maioria dos ensaios HAT aplica em uma reação de esquema competitivo, onde o antioxidante e o substrato competem por peróxidos gerados pela decomposição de compostos. O método *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) se enquadra como HAT, enquanto que, métodos DPPH e co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico são métodos ET. O método ORAC tem sido utilizado para determinar a capacidade antioxidante de frutas e vegetais (PRIOR; WU, 2013).

Diferentes métodos de determinação de atividade antioxidante podem gerar resultados distintos por diversas causas, podendo ser influenciada desde a concentração da amostra até pela afinidade dos antioxidantes. Dentre o método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico e o DPPH, o método DPPH tem se

mostrado mais vantajoso, pois o resultado deste não é afetado pela polaridade do substrato (DUARTE-ALMEIDA *et al.,* 2006; CABRAL *et al.,* 2009).

A molécula de DPPH é qualificada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula (Figura 4). Esta deslocalização confere a molécula coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção do etanol em cerca de 520 nm (MOLYNEUX, 2004). Este ensaio baseia-se na capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma substância for capaz de reduzir o DPPH, a hidrazina será obtida com mudança simultânea de coloração violeta a amarelo pálido (DAVID *et al.,* 2010).

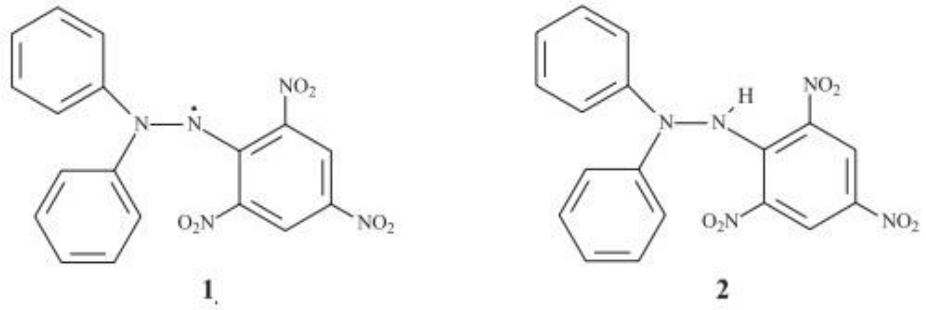


Figura 4 - Formas radicalar e não-radicalar do DPPH
Fonte: David *et al.* (2010).

Verifica-se ainda que não apenas a capacidade de reduzir o radical DPPH foi proposta para avaliar sua atividade antioxidante, mas também a eficiência com que um substrato poderia fazê-lo (concentração e tempo de reação). Um parâmetro introduzido recentemente foi o valor $EC_{50}$ (*Efficient Concentration*) ou valor $IC_{50}$, definido como a concentração de um substrato que gera a perda de 50% da atividade do DPPH (MOLYNEUX, 2004).

Embora o método DPPH seja largamente utilizado pela sua reprodutibilidade, rapidez e simplicidade, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados. As substâncias analisadas podem interferir nos resultados caso seus espectros se sobreponham ao DPPH ao redor de 515 nm, como, por exemplo, nos carotenoides; além de moléculas pequenas terem melhor acesso ao radical, podem apresentar uma atividade maior aparente, quando comparadas a moléculas maiores (DAVID *et al.,* 2010).

Apesar dos ensaios de verificação de capacidade antioxidante serem úteis para avaliar a capacidade antioxidante de alimentos e também utilizada em plasma e tecidos, deve ser percebido que estes testes *in vitro* não necessariamente levam em conta o que acontece com antioxidantes alimentares durante a absorção e metabolismo (PRIOR; WU, 2013).

Existem diversos ensaios de mensuração de capacidade antioxidante e sua eficácia, mas frequentemente, há uma falta de correlação entre os resultados da mesma matéria-prima por ensaios diferentes e do mesmo ensaio em laboratórios diferentes. Isto é justificado, uma vez que múltiplos mecanismos e reações estão envolvidos no processo de estresse oxidativo do corpo humano, deste modo, não há um método simples e universal em que a capacidade antioxidante possa ser avaliada quantitativa e qualitativamente (NIKI, 2010).

Além disso, a capacidade antioxidante total no soro ou plasma é fortemente equilibrada. A interpretação das mudanças da capacidade antioxidante no soro ou plasma depende não apenas do método utilizado na detecção destas mudanças, mas também das condições em que estas mudanças foram determinadas, pois a determinação da capacidade antioxidante reflete um sistema dinâmico (PRIOR; CAO, 1999).

Da mesma forma, embora os marcadores do dano oxidativo em sangue e tecidos humanos tenham sido aperfeiçoados, ainda estão sujeitos ao erro, uma vez que a maioria dos ensaios tem como amostra sangue ou urina, podendo facilmente estes procedimentos serem falhos em pequenos grupos de células ou em organismos individuais (HALLIWELL, 2011).

Dentre os métodos para verificação da atividade antioxidante *in vivo*, incluem-se a determinação da atividade da catalase, determinação da atividade da superóxido dismutase, determinação da atividade da glutationa reduzida e a estimação da peroxidação lipídica. Ainda assim, a avaliação de um único biomarcador ou de apenas alguns, pode não refletir o *status* antioxidante total *in vivo*, podendo ser um dos fatores que leva a conclusões divergentes em pesquisas de antioxidantes (PRIOR; WU, 2013).

A técnica de determinação da peroxidação lipídica é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde a atividade antioxidante

é calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídios, em comparação a um controle (DUARTE *et al.,* 2009).

## 2.5 Bioativos

Compostos bioativos são substâncias capazes de trazer efeitos benéficos à saúde humana, pois auxiliam o sistema metabólico a reduzir o estresse oxidativo e a incidência de doenças cardiovasculares e câncer (XU; CHEN, 2011); (DIAS; LUZIA; JORGE, 2013). Muitos destes antioxidantes naturais exibem uma gama de efeitos biológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica e ações vasodilatadoras (BABBAR *et al.,* 2011).

A maior parte das substâncias biologicamente ativas, como vitaminas e metabólitos secundários (polifenóis, carotenoides, esteroides, glucosinolatos e saponinas) está presente em ervas, frutas e vegetais (DEMBITSKY *et al*., 2011).

Muitas plantas medicinais contêm grandes quantidades de antioxidantes, como os polifenóis, que exercem um importante papel na adsorção e neutralização de radicais livres ou na decomposição de peróxidos produzidos de forma rotineira pelos processos metabólicos e de forma maior, quando sob condições de estresse ambiental. Muitas plantas utilizadas de forma medicinal possuem altos níveis destes compostos, conferindo a elas a capacidade de prevenir diversas doenças (GIORGI *et al.,* 2013).

### 2.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos em frutas e vegetais são os bioativos mais conhecidos pelos benefícios à saúde. Estes são amplamente distribuídos na natureza, com mais de 8000 compostos detectados (SILVA *et al*., 2010). Estão localizados tanto em partes comestíveis como naquelas não comestíveis das plantas e têm sido documentados diversos efeitos biológicos, inclusive atividade antioxidante (BABBAR *et al*., 2011).

Fenóis são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo grupos funcionais (ROCHA *et al*., 2011). Estes atuam como substâncias redutoras, pois interrompem a cadeia da reação de

oxidação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, eliminando-os ou convertendo-os em produtos estáveis, na redução do oxigênio singleto, na quelação de metais, componentes iniciadores da oxidação lipídica (MELO *et al*., 2008b); (OLIVEIRA *et al*., 2011).

Estes compostos são formados a partir do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para seu crescimento e reprodução. Também se originam em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, entre outros (JACQUES; ZAMBIAZI, 2011).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias como: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, ligninas e lignanas (SOUSA *et al*., 2007). Estes compostos são os antioxidantes mais abundantes na alimentação, sendo que sua ingestão média chega a ser dez vezes maior em relação a vitamina C, e 100 vezes maior quando comparados a vitamina E e aos carotenoides (OLIVEIRA *et al*., 2011).

Como os produtos elaborados e *in natura* possuem mais de um tipo de composto fenólico em sua composição, é possível que estes interajam entre si, podendo agir de maneira sinérgica ou antagônica, aumentando ou reduzindo o potencial antioxidante do alimento. Estes compostos também podem interagir com outros bioativos, sendo impossível predizer a atividade antioxidante de um alimento estudando apenas um composto específico, como um flavonóide ou uma determinada vitamina (HIDALGO; SÁNCHEZ-MORENO; PASCUAL-TERESA, 2010).

### 2.5.2 Taninos

Taninos são componentes polifenólicos, de peso molecular relativamente alto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares, sendo capazes de complexar proteínas e outros polímeros (PANSERA *et al.,* 2003; AGOSTINI-COSTA *et al.,*1999).

Os metabólitos secundários encontrados na natureza, de peso molecular variando entre 500 - 5000 Dalton, solúveis em água e são designados taninos hidrolisáveis, sendo estes múltiplos ésteres de ácido gálico e glicose e produtos de suas reações oxidativas (ARAPTSAS, 2012).

Os taninos afetam a qualidade dos alimentos de diversas formas, sendo que a adstringência é a propriedade mais conhecida e estudada. Proteínas salivares ricas em prolina formam complexos com taninos dos alimentos e precipitam, resultando em uma sensação adstringente, percebida como uma sensação difusa de secura e aspereza, não confinada em local específico da língua e boca (GLABASNIA; HOFFMAN, 2006).

Diferentes taninos hidrolisáveis de partes comestíveis ou não, de plantas, demonstraram importante atividade biológica, com propriedades antitumoral, antimutagênica, antidiabética, antiproliferativa, antibacteriana e antimicótica (ARAPTSAS, 2012; BUZZINI *et al.,* 2008).

## 2.5.3 Ácido ascórbico

A vitamina C (ácido ascórbico) (Figura 5) é um nutriente hidrossolúvel, essencial ao ser humano, pois não é produzido pelo organismo, sendo envolvida em diversas funções biológicas (VASCONCELOS *et al*., 2007). Esta é cofator de várias enzimas presentes na hidroxilação, pós-tradução do colágeno, na biossíntese de carnitina, na conversão do neurotransmissor dopamina a norepinefrina, na amidação peptídica e no metabolismo da tirosina. Além disso, está envolvida na absorção de ferro, ao reduzir a forma férrica ($Fe^{3+}$) a ferrosa ($Fe^{2+}$) (CERQUEIRA *et al*., 2007).

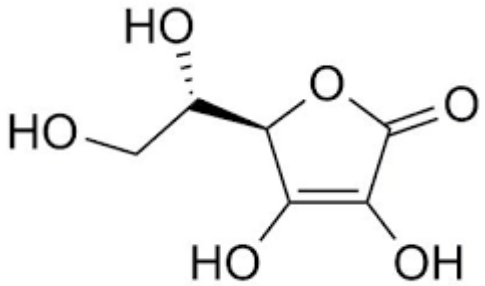


Figura 5 - Estrutura do ácido ascórbico
Fonte: domínio público

Em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C está sob a forma de ascorbato, forma que atua como antioxidante, ao doar um elétron ou um hidrogênio ao radical (VASCONCELOS *et al*., 2007).

Mais de 85% da vitamina C consumida pelo homem é proporcionada por frutas e vegetais, sendo considerada o antioxidante hidrossolúvel mais importante no organismo, capaz de eliminar diferentes espécies de radicais livres, como os radicais super óxido e hidroxila. O ácido ascórbico é o nutriente mais abundante que ocorre naturalmente na dieta diária. Diversas evidências demonstram efeito anticarcinogênico e capacidade de reduzir radicais do tocoferol, voltando à sua forma ativa nas membranas celulares (OLIVEIRA *et al,* 2009; ALMEIDA *et al.,* 2011).

## 2.5.4 Carotenoides

Os carotenoides (Figura 6) são uma família de pigmentos abundantemente encontrados na natureza, responsáveis pela coloração de grande parte de frutas e vegetais, gema do ovo, crustáceos e alguns peixes, variando desde o amarelo até o vermelho vivo (CARVALHO *et al*., 2011). Os animais são incapazes de produzir carotenoides, portanto, devem ser adquiridos através da dieta (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; GAINO E SILVA, 2012).

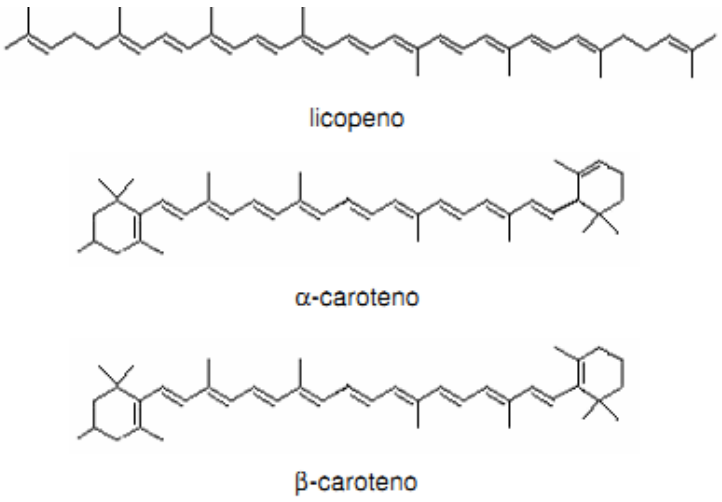


Figura 6 - Estrutura de carotenoides acíclicos e cíclicos
Fonte: Nascimento (2006)

Estes são tetraterpenóides encontrados na floração de plantas, como pigmentos responsáveis pelas cores vermelha, alaranjada e amarela de frutas (SILVA *et al.,* 2014).

Existem mais de 600 carotenoides descobertos e cerca de 50 apresentam atividade biológica como provitamina A, dentre eles, o α-caroteno, o β-caroteno, o ɤ-caroteno e a β-criptoxantina, que previnem a deficiência de vitamina A (ENGELMANN, CLINTON; ERDMAN JR., 2011). Cerca de 40 carotenoides estão presentes na dieta típica humana e, em média, 20 foram identificados no sangue e tecidos humanos (KADIAN; GARG, 2012). Outros carotenoides que não possuem função provitamina A estão sendo investigados, devido à demonstração em estudos que estes compostos possuem potencial antioxidante (como o licopeno), protegendo as células de danos oxidativos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A quantidade de compostos carotenoides é afetada por fatores genéticos e também ambientais, sendo influenciada pela variedade do cultivo, maturação na época de colheita, clima, estação, local de produção, parte da planta utilizada, técnicas de armazenamento e processamento pós-colheita (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

A proteção de organismos contra radicais-livres pelos carotenoides ocorre devido a transferência de energia de uma molécula de oxigênio excitada, para a própria molécula do carotenoide, reagindo principalmente com radicais peróxidos e oxigênio molecular (PEREIRA *et al.,* 2013). Outros mecanismos de efeito protetor à saúde foram relacionados aos carotenoides como modulação do metabolismo carcinogênico, regulação do crescimento celular, inibição da proliferação celular, melhora da diferenciação celular, entre outras (KADIAN; GARG, 2012).

A habilidade dos carotenoides de destruir o oxigênio singleto foi associada ao sistema conjugado de ligação dupla, com a máxima proteção contra os danos causados por esta forma de oxigênio naqueles que possuem nove ou mais ligações duplas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Dietas ricas em fitoquímicos, como compostos fenólicos e carotenoides, especialmente licopeno e β-caroteno, foram relacionados à redução do risco de certos tipos de câncer, inflamação, catarata, degeneração macular e doenças neurodegenerativas (SILVA *et al.,* 2014). O consumo alimentar ou níveis plasmáticos de luteína e zeaxantina foram significantemente correlacionados de modo inversamente proporcional ao risco de degeneração macular, a principal causa de cegueira irreversível na velhice. Estes carotenoides também foram consistentemente associados à redução do risco de catarata (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

O licopeno é considerado o carotenoide com maior capacidade de eliminar o oxigênio singleto, sendo capaz de proteger moléculas lipídicas, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e o DNA contra o ataque de radicais livres, desempenhando um papel essencial na prevenção de doenças (SILVA *et al.,* 2014).

O consumo de licopeno foi relacionado a um risco reduzido de câncer de próstata, enquanto o consumo elevado de β-caroteno foi correlacionado com uma redução do risco de se desenvolver câncer de pulmão (BURNS *et al*., 2003).

A vitamina A (retinol) é essencialmente metade da molécula de um β-caroteno, sendo o carotenoide de maior potencial de transformação em vitamina A e largamente distribuído nos alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Há evidências da função do β-caroteno no tratamento em certos tipos de câncer, como neoplasia cervical intraepitelial, cervical e estomacal. Por outro lado, a suplementação de β-caroteno a fumantes aumentou as taxas de mortalidade em relação ao grupo controle (KADIAN e GARG, 2012).

Misturas de carotenoides têm demonstrado maior atividade inibitória em relação ao β-caroteno isolado em células humanas de neuroblastoma. Além disso, os carotenoides da pimenta mexicana verde (*Capsicum annuum*) foram mais eficientes contra a mutagênese do que apenas o β-caroteno, sugerindo que os outros carotenoides presentes na pimenta atuem de forma sinérgica com o β-caroteno. Desta forma, as dietas com misturas de carotenoides são recomendadas, ao invés de um carotenoide em particular, pois *in vivo* uma grande variedade de radicais livres o microambiente devem ser levados em consideração (KADIAN e GARG, 2012).

## 3. OBJETIVO GERAL

Estudar o potencial nutritivo e a atividade antioxidante da polpa do jatobá-do-cerrado, através de processos *in vitro* e *in vivo*.

### 3.1 Objetivos específicos

- Determinar a composição química da polpa do jatobá;

- Identificar e separar os principais carotenoides, calcular o valor de vitamina A da polpa do fruto e determinar o teor de ácido ascórbico;

- Avaliar *in vitro*, a atividade antioxidante e quantificar compostos fenólicos e taninos das amostras de jatobá, comparando diferentes solventes de extração;

- Verificar o papel antioxidante da polpa do jatobá na proteção contra a lipoperoxidação em ratos da linhagem *Wistar;*

- Avaliar o ganho de massa entre os diferentes grupos de animais estudados.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Obtenção da matéria-prima

Os frutos do jatobá-do-cerrado foram adquiridos comercialmente na cidade de Campo Grande-(MS), (localização -20,4691; -54,6105) no mês de fevereiro de 2014, durante o período de safra do fruto.

Nos laboratórios da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato

i homogeneizada e tamisada (Tamis 40 *mesh*), obtendo-se uma farinha que foi acondicionada em sacos plásticos, armazenadaGrosso do Sul (UTA-CCBS-UFMS) os frutos foram lavados com água e escovados, higienizados com água sanitária (150 ppm), secados ao natural, pesados e despolpados em ambiente escuro, para que não houvesse interferência da luz no conteúdo antioxidante dos frutos.

A polpa separada do fruto jatobá fo em ambiente escuro em geladeira *Biochemical Oxygen Demand* (BOD), sob temperatura de 2ºC e utilizada para as análises.

Parte do fruto foi utilizada para determinação da composição química do fruto e outra parte no preparo de extratos (hidrocetônico, aquoso e etanólico), para determinação de atividade antioxidante e de bioativos.

Após o término das análises *in vitro*, o extrato que apresentou maior potencial antioxidante foi selecionado para utilização nos estudos *in vivo.*

Os procedimentos e análises foram realizadas conforme o fluxograma apresentado na Figura 7.

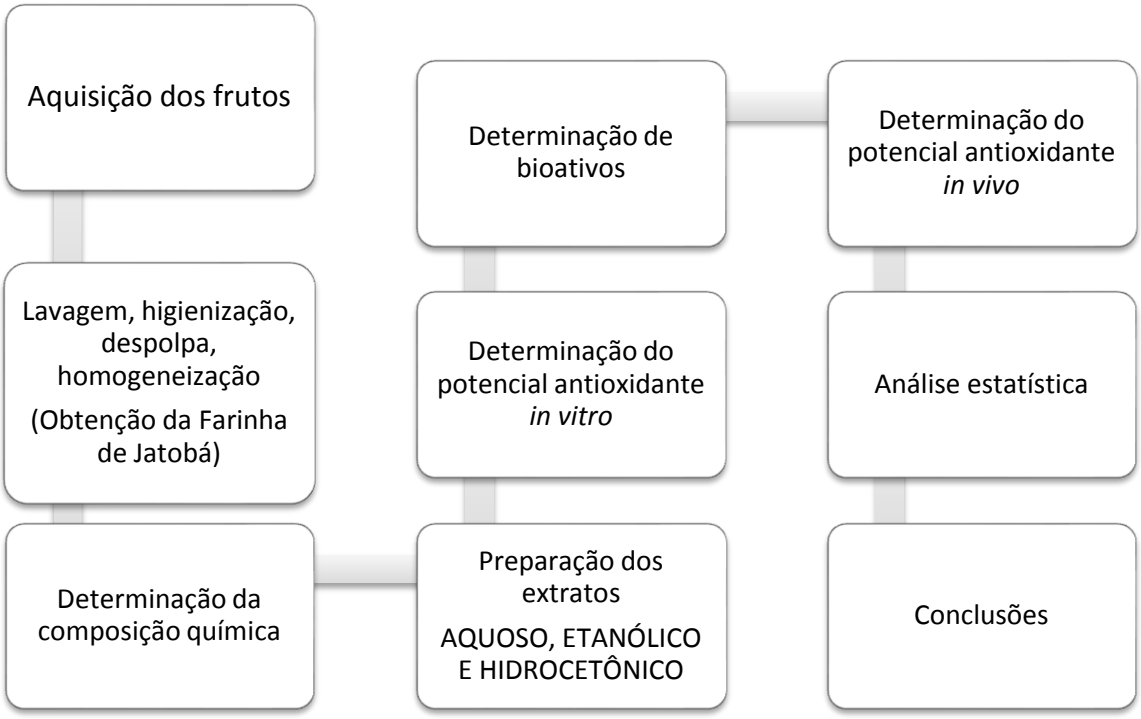


Figura 7 - Fluxograma de preparo de amostra e análises para avaliação *in vitro e in vivo* da polpa de jatobá-do-cerrado.

## 4.2 Composição química

A composição química do fruto jatobá foi realizada pelos métodos padronizados pelo Instituto Adolfo Lutz quanto à determinação de umidade, por dessecação em estufa a 105°C, de cinzas ou resíduo mineral fixo por incineração em mufla, de lipídeos através de extração direta com solvente orgânico em aparelho de Soxhlet, e proteínas por método de micro-Kjeldhal clássico (usando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 5,75), de fibras pelo método de fibra detergente neutro e, de glicídios totais, pelo método da redução de Lane & Eynon, separando-se os açúcares em glicídios redutores, em glicose e glicídios não redutores, em sacarose (BRASIL, 2005). As calorias foram estimadas a partir dos métodos de Merrill e Watt (1973).

## 4.3 Preparo dos extratos

Para determinação da atividade antioxidante *in vitro* foram preparados extratos aquoso, etanólico (em etanol absoluto) e hidrocetônico (água:acetona, 20:80). As extrações foram realizadas com a polpa do fruto. Foram pesados aproximadamente 2,5 g de amostra triturada em béquer e adicionados 15 mL de solvente (água destilada, etanol e acetona 80 %, separadamente, de acordo com o extrato a ser obtido). A mistura de amostra e solvente foi homogeneizada em agitador mecânico por 20 minutos e em seguida, realizou-se a filtração em gazes, apoiadas em funil de vidro, sendo retirados os resíduos retidos na gaze e devolvidos ao béquer. Logo em seguida, foram adicionados mais 15 mL do solvente utilizado para extração, homogeneizando-se a mistura em liquidificador por aproximadamente 20 minutos, filtrando-se em nova gaze, recolhendo o segundo filtrado juntamente com o primeiro e por fim, completando-se para volume conhecido, com o solvente de extração (50 mL), obtendo-se os extratos para análises, estes, diluídos em 1:1 (solvente:extrato) de acordo com fluxograma (Figura 8).

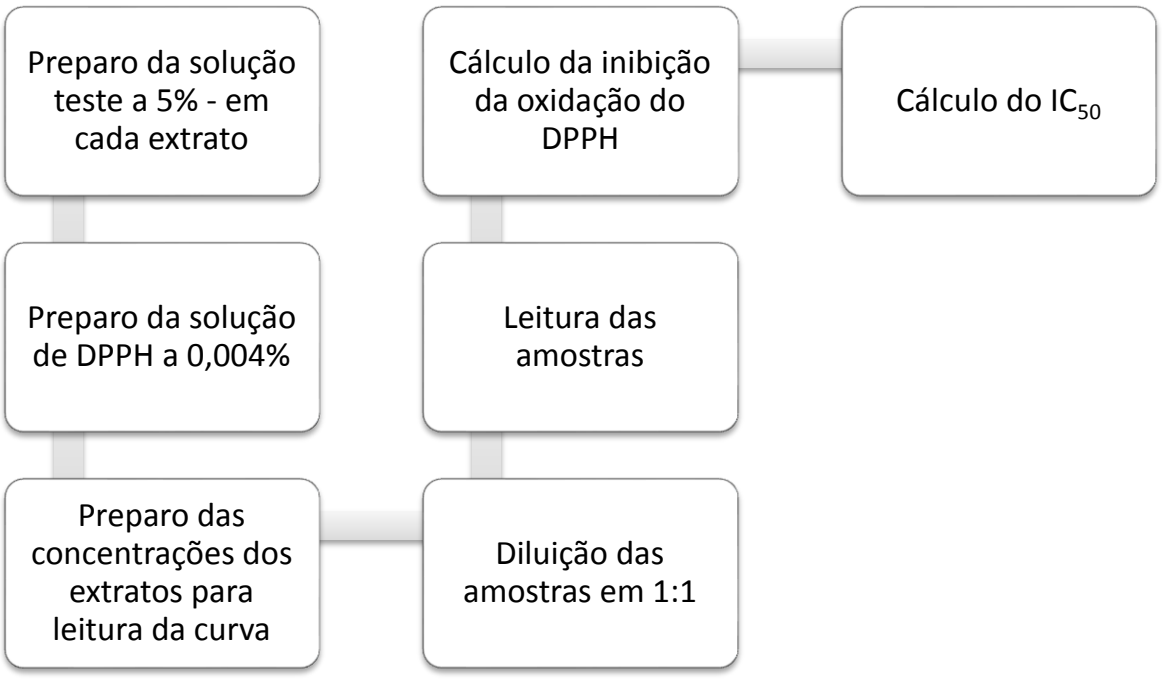


Figura 8 – Fluxograma da preparação dos extratos hidrocetônico, aquoso e etanólico e determinação de atividade antioxidante

## 4.4 Determinação de atividade antioxidante *in vitro*

### 4.4.1 Método DPPH

Para análise de atividade antioxidante foi utilizado o método de sequestro do radical livre estável DPPH. Para isto, diferentes concentrações (100 µL/mL, 60 µL/mL e 20 µL/mL) dos extratos aquoso, etanólico e hidrocetônico foram adicionadas a 1800 µL de solução etanólica de DPPH (0,004% $m.v^{-1}$). Os tubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro. Em seguida, as absorbâncias das amostras foram lidas a 517 nm em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S60PC). O etanol foi utilizado como branco e o controle negativo do teste foi etanol adicionado do mesmo volume da solução de DPPH. Todos os pontos foram analisados em triplicata. O valor médio das absorbâncias apresentadas pelo controle negativo, representa 100% de inibição da oxidação, e através desse dado, pode-se calcular o percentual de inibição de oxidação de cada um dos valores de absorbância obtidos. O decaimento da absorbância das amostras (Aam), correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL), definidos pela equação 2 (Eq. 2) :

$$\% \text{ SRL} = \text{Ac- Aam/Ac x } 100 \qquad \text{Eq. 2}$$

Além disso, foi calculado o $IC_{50}$ definido como a concentração final do extrato requerido para decrescer a capacidade de oxidação do DDPH em 50%, ao se traçar uma linha de tendência em gráfico de dispersão, onde no eixo X encontram-se os valores de concentração de extrato (µg/mL) e no eixo Y a inibição da oxidação do radical DPPH (%) (ROESLER *et al*, 2007).

### 4.4.2 Quantificação de compostos fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos foi determinada por Folin-Ciocalteau, que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos da amostra com formação de um complexo azul, cuja intensidade aumenta a 760 nm. Os extratos aquoso, etanólico e hidrocetônico foram dissolvidos nos mesmos solventes utilizados para atividade antioxidante, a fim de se obter uma concentração de 0,25 $mg.mL^{-1}$ e posteriormente analisados utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteau. A quantidade final de cada extrato foi quantificada por meio de curva padrão preparada com ácido gálico e expressas com equivalentes de ácido gálico (EAG)/g do fruto. Para a reação colorimétrica foi adicionada uma alíquota de extrato (concentração 0,25 $mg.mL^{-1}$) e adicionada 2,5 mL de solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteau a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada a 55ºC em banho-maria por 5 minutos, e a absorbância medida utilizando branco como referência. A quantificação foi realizada em triplicata (ROESLER *et al.*, 2007).

### 4.4.3 Quantificação de taninos

A quantificação de taninos foi realizada por meio da metodologia de Folin-Denis. Os extratos aquoso, etanólico e hidrocetônico foram dissolvidos nos mesmos solventes utilizados para atividade antioxidante, a fim de se obter uma concentração de 0,25 $mg.mL^{-1}$ e posteriormente analisados utilizando-se o reagente de Folin-Denis. A quantidade final de cada extrato foi quantificada por meio de curva padrão preparada com ácido tânico e expressas com equivalentes de ácido tânico (EAT)/g do fruto. Para a reação colorimétrica, foram utilizados 0,5 mL de extrato das amostras, adicionados de 8,0 mL de água destilada, 0,5 mL do reativo de Folin-Denis e 1,0 mL de solução de carbonato de sódio saturado a 35%. As leituras foram realizadas após 30 minutos com faixa de absorbância de 760 nm. Uma mistura de água destilada (8,0 mL), Folin-Denis (0,5 mL) e carbonato de sódio saturado (1,0 mL) foi utilizada como branco para referência. As análises foram realizadas em triplicata (BRASIL, 2005).

4.4.4 Quantificação de carotenoides

A quantificação de carotenoides foi calculada através do método descrito por Rodriguez-Amaya (1989) a partir da extração de pigmentos com solvente orgânico, remoção dos ácidos graxos e outros interferentes por saponificação, separação por cromatografia em coluna aberta e identificação e quantificação por espectrofotometria na luz UV-visível, duplo feixe, obtendo-se espectros de absorção e absorbâncias máximas dos picos separados.

4.4.5 Quantificação de ácido ascórbico

Para esta quantificação foi utilizado o método de Benassi e Antunes (1988) modificado. Foram pesados 5,0 g de polpa de jatobá, dissolvidos em 50 mL de solução de ácido oxálico 1% (m/v). Foi utilizada uma alíquota de 10 mL desta solução do balão para titulação com 2,6-diclorofenolindofenol 0,01% (m/v), previamente padronizado com solução padrão de ácido ascórbico, até atingir coloração rosa.

## 4.5 Determinação da atividade antioxidante *in vivo*

Os procedimentos envolvendo animais de laboratório foram realizados após análise e aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob número de protocolo 526/2013 (Anexo A).

Um novo extrato hidrocetônico foi formulado para aplicação nos animais, visto que a polpa de jatobá apresentou maior potencial antioxidante ao utilizar a mistura água:acetona como solvente de extração. Considerando que o solvente orgânico, acetona, do extrato é tóxico aos animais, este foi evaporado em rotaevaporador e depois reidratado em água destilada.

O extrato foi diluído em três concentrações diferentes: 150 µL/mL; 250 µL/mL e 500 µL/mL. Ratos machos da linhagem *Wistar* desmamados com 21 dias foram utilizados no experimento, sendo necessária uma semana de adaptação, onde os

animais foram adaptados às caixas e grupos, recebendo apenas água e ração. Após adaptação, iniciou-se o experimento, totalizando 30 dias de ensaio.

A distribuição dos animais foi realizada de forma aleatória, da seguinte maneira: 8 animais para o Grupo Controle (C) e 8 animais em cada grupo tratado (extrato de jatobá), nas seguintes concentrações: 150 µL/mL/dia (T1), 250 µL/mL/dia (T2) e 500 µL/mL/dia (T3), totalizando 32 animais, armazenados em caixa de polietileno, com 4 animais por caixa. Os animais foram mantidos com água e ração comercial *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 h e temperatura controlada. Foi administrado 1,0 mL de solução, uma vez ao dia, por gavagem, sendo oferecida apenas água pura para o grupo controle, e, para os grupos tratados os extratos de jatobá nas concentrações estabelecidas, durante 30 dias.

Ao final do experimento foi realizada eutanásia nos animais em câmara de $CO_{2,}$ após sedação com ketamina, 25 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, via intraperitonial (IP). O potencial antioxidante foi avaliado utilizando a comparação da inibição da peroxidação lipídica de um grupo tratado com um grupo controle, no tecido cerebral dos animais, utilizando a técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrita por Duarte e colaboradores (2009), modificada. O tecido cerebral foi mantido congelado em freezer (Indel Ultra Freezer, -86ºC) até o dia das análises. O tecido foi descongelado em temperatura ambiente, homogeneizado em homogeneizador de tecidos. Foram utilizadas amostras de 500 µL do homogeneizado dos cérebros de todos os grupos, adicionados 500 µL de ácido clorídrico a 25% (v/v), e 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v) em hidróxido de sódio a 0,1 M e 45 µL de BHT a 2% (p/v). A mistura foi aquecida em água fervente por 10 minutos, resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 900 rpm x g, por 15 minutos.

As TBARS foram determinadas por $Abs_{535}$ e a concentração obtida utilizando tetraetoxipropano como padrão. A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídios (I%), por comparação ao controle, utilizando a equação 3 (Eq. 3):

$$I\% = (Ac - At)/Ac \times 100 \qquad \text{Eq. 3}$$

Onde:
Ac = absorbância das amostras do grupo controle;
At = absorbância das amostras do grupo tratado.

### 4.6 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foi realizado teste para verificação de distribuição normal, tendo sido constatada essa distribuição, nos testes *in* vitro, foi realizada a análise de variância com aplicação de ANOVA de uma via; e com resultado significativo, foi aplicado teste de normalidade com pós-teste de Tukey ($p$<0,05) para comparação das médias. No teste *in vivo* foi verificada distribuição não normal, tendo sido aplicado o teste de Kruskall-Wallis com aplicação de pós-teste de Dunn.

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 Composição química do fruto

Os valores da composição química do fruto estão reportados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química da polpa do jatobá-do-cerrado

| Constituintes | Valores (%) |
|---|---|
| Umidade | 12,67 ± 0,001 |
| Resíduo mineral fixo | 3,06 ± 0,000 |
| Glicídios redutores | 8,53 ± 0,004 |
| Glicídios não redutores | 26,58 ± 0,007 |
| Glicídios totais | 35,10 ± 0,090 |
| Proteínas | 5,23 ± 0,224 |
| Lipídeos | 2,80 ± 0,002 |
| Fibra Detergente Neutro | 35,46 ± 0,003 |
| Vitamina C mg/100g | 138,78 ± 8,57 |
| β-caroteno µg/100g | 115,27 |
| Calorias* | 190,28 |

*Estimadas a partir da composição nutricional, expressas em kcal/100g de amostra integral

Para o valor de umidade, Cardoso e colaboradores (2013) encontraram valores de 8,8 ± 1,0 % em frutos de jatobá-do-cerrado coletados em Minas Gerais, entre os meses de junho e julho de 2010, estando abaixo do reportado pelo presente estudo. Em relação a frutos comuns como abacate (83,8%), abacaxi (86,3%), banana prata (71,9%) o jatobá apresenta baixo teor de umidade, podendo sua deterioração ser lenta, uma vez que a umidade de um alimento está relacionada à sua estabilidade, qualidade e composição. Alimentos com alta umidade se deterioram de forma mais acelerada dos que os que possuem baixa umidade (EMBRAPA, 2010).

Em relação a outros frutos com baixo teor de umidade, o jatobá apresenta valor superior quando comparado ao chichá (*Sterculia striata* A. St. Hil. & Naud)

(6,95 ±0,02%) e inferior ao tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) (46%) (FERREIRA *et al.,* 2008; SILVA *et al.,* 2008).

A quantidade de resíduo mineral fixo, conhecido como cinzas, é um indicativo da quantidade de minerais que um alimento possui (EMBRAPA, 2010). Para resíduo mineral fixo, os resultados do presente estudo foram semelhantes ao estudo de Cardoso *et al.,* (2013) que relataram valores médios de 3,4 ± 0,1%. Dias, Luzia e Jorge (2013) reportaram valores próximos de 4,53% na polpa do jatobá, em frutos coletados em cidades do interior de Minas Gerais e de São Paulo. Rocha e colaboradores (2013) encontraram valores de resíduo mineral fixo de 5,0 ± 0,8 % em frutos de jatobá coletados no Cerrado piauiense.

Para glicídios redutores foram detectados 8,53 ± 0,004%, e 26,58 ± 0,007% para glicídios não redutores, totalizando 35,10 ± 0,090% de glicídios totais. Dias, Luzia e Jorge (2013) encontraram valores de carboidratos totais de 31,20% em *Hymenaea courbaril*, enquanto que no presente estudo, o valor reportado para carboidratos totais foi de 35,10%. Para este nutriente, Cardoso e colaboradores (2013) encontraram valores de 34,1%, semelhantes aos dados apresentados neste estudo.

Em relação a outros frutos nativos da Região do Cerrado, tais como baru (*Dipteryx alata*) (12,8%) e araticum (*Annona crassiflora*) (12,78%), o jatobá possui elevado teor de glicídios totais, sendo uma porcentagem relevante de glicídios redutores, o que poderia indicar que o fruto possui uma quantidade significante de amido em sua constituição (ÁVILA *et al.,* 2010).

Valores descritos por Sousa *et al.* (2012) para proteínas foram de 10,89%, para amostras de *Hymenaea courbaril*, coletadas no Estado do Ceará. Dias, Luzia e Jorge (2013) encontraram 12,32 ± 0,02% de proteínas para o jatobá (*Hymenaea coubaril*), sendo quase duas vezes superior ao relatado no presente estudo, e ainda superior aos achados de Silva e colaboradores (2001) com 7,60 ± 0,22% para *Hymenaea stigonocarpa*, evidenciando diferenças entre as duas espécies. Cardoso *et al.,* (2013) encontraram valores compatíveis de proteínas, de 5,6 ± 0,4%, também em *Hymenaea stigonocarpa*.

O jatobá possui valor expressivo de proteínas quando comparado a frutas como banana (1,3%) e mamão (0,5%). Entretanto ao se estudar outras leguminosas, o jatobá possui valor inferior, podendo este fato ser explicado pela parte consumida

do jatobá ser a polpa, enquanto que em leguminosas o consumo em geral são as sementes, onde concentram-se a maior parte das proteínas (EMBRAPA, 2010; SILVA *et al*., 2001).

Os valores de lipídeos (2,8 ± 0,002%) vão de encontro aos relatados por Silva *et al.* (2001), na região de Goiânia (GO), com 3,03 ± 0,05% e de Cardoso e colaboradores (2013), com 3,8 ± 1,0% e superiores aos de Dias*,* Luzia e Jorge (2013) com 1,94 ± 0,05%.

Dias*,* Luzia e Jorge (2013) encontraram valor de fibras superior a 50% em *Hymenaea courbaril*, tanto na casca, quanto na polpa, enquanto Cardoso e colaboradores (2013) encontraram 44,3 $\pm$ 2,3% na polpa do fruto, sendo estes valores superiores aos reportados no presente estudo.

De acordo com as DRIs (*Dietary Reference Intakes*) (2005), as quais são referidas como doses recomendadas de ingestão diária de nutrientes, a necessidade de fibras varia entre 19-38 g/dia, dependendo do sexo e idade do indivíduo, concluindo-se que uma porção de jatobá-do-Cerrado (100,0 g) é capaz de suprir a necessidade diária da maioria da população.

Os resultados obtidos na determinação de vitamina C na polpa do jatobá-do-cerrado apresentaram média de 138,78 $\pm$ 8,57 mg/100 g amostra. Este valor descrito foi superior ao encontrado por Dias*,* Luzia e Jorge (2013) com 121,45 $\pm$ 0,65 mg/100 g amostra, e de outros frutos do cerrado como araticum-do-mato (*Rollinia sylvatica* A. St.-Hil.), mandacaru-de-três-quinas (*Cereus hildmannianus* K. Schum.) e do butiazeiro (*Butia capitata* (Mart.) Becc.), com 25-32 mg/100g, em estudo realizado por Pereira e colaboradores (2013). Rocha e colaboradores (2013) encontraram valores de 330,4 ± 61,5 mg/100g, divergentes dos estudos citados anteriormente.

O jatobá estudado pode ser considerado de alto teor de vitamina C, verificando-se que uma porção de 100g de fruto, proporciona 154,2% da ingestão recomendada diária (75-90 mg/dia) (DRI, 2000).

Na determinação de carotenoides, foi possível encontrar o carotenoide principal do fruto, o β-caroteno, mas não foi possível determinar as outras frações, uma vez que estas se apresentaram em quantidades mínimas.

Rocha e colaboradores (2013) encontraram valores de 9,96 $\pm$ 1,23 µg/100g de licopeno e de 110,68 $\pm$ 11,9 µg/100g de β-caroteno em amostras de jatobá-do-

cerrado no Piauí, corroborando com os achados deste estudo, com 115,27 µg/100g para β-caroteno, totalizando 9,60 mg/100g$^{-1}$ de equivalentes de atividade de retinol. Cardoso e colaboradores (2013) encontraram valores divergentes do mesmo fruto coletado em Minas Gerais, com 0,4 ± 0,1 mg/100g$^{-1}$ de β-caroteno e 32,4 ± 9,7 mg/100g$^{-1}$ equivalentes de atividade de retinol, utilizada para expressar o conteúdo de vitamina A. O reduzido valor de carotenoides encontrado no presente estudo foi similar a de outras leguminosas como ervilha, soja, lentilha e feijão; mas reduzido em relação a outros frutos do Cerrado, como cagaita (40,77 mg/100g$^{-1}$) e araticum (4,98 mg/100 g$^{-1}$) para carotenoides totais (CARDOSO *et al.,* 2013).

Elevadas temperaturas e alta exposição à luz solar aumentam a carotenogênese em frutos, e também podem causar fotodegradação dos carotenoides. Frutos do mesmo cultivar produzidos em locais quentes do Brasil (Norte e Nordeste) contêm maiores níveis de carotenoides em relação os de regiões mais amenas (Sul e Sudeste) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

A composição de frutos pode variar de acordo com uma série de fatores como espécie, variedade, cultivo, região, condições climáticas, tempo de coleta, estádio de maturação, condições de armazenamento e processamento. Estes fatores atingem também o teor de vitaminas e compostos fenólicos. (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; MELO *et al.,* 2008a; CARDOSO *et al.,* 2011; SOUZA *et al.,* 2014).

## 5.2 Atividade antioxidante *in vitro*

Os valores de atividade antioxidante, fenóis totais e taninos encontrados na polpa do jatobá estudado estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antioxidante, fenóis totais e taninos *in vitro* dos extratos hidrocetônico, etanólico e aquoso da polpa do jatobá-do-cerrado

| | Hidrocetônico | Etanólico | Aquoso | Valor de *p* |
|---|---|---|---|---|
| Atividade antioxidante ($IC_{50}$ _ mg/mgDPPH)** | < 26,76[a] | 618,06[c] | 117,07[b] | <0,001 |
| Fenóis totais (mgEAG/100g) | 786,18[a] | 444,97[b] | 669,64[a] | <0,01 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Taninos totais (mgEAT/100g) | 1838,69[a] | 518,43[c] | 728,14[b] | <0,01 |

* Letras diferentes na mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p$<0,01) pelo teste de Tukey.
** Menor valor de $IC_{50}$ descreve maior potencial antioxidante, classificados em ordem de maior potencial antioxidante de acordo com as letras.

Extratos hidrocetônico, aquoso e etanólico diferiram significantemente entre si ($p$<0,001) em relação à atividade antioxidante, sendo o extrato hidrocetônico o que apresentou maior poder de inibição de oxidação do radical DPPH, seguido do extrato aquoso e do etanólico.

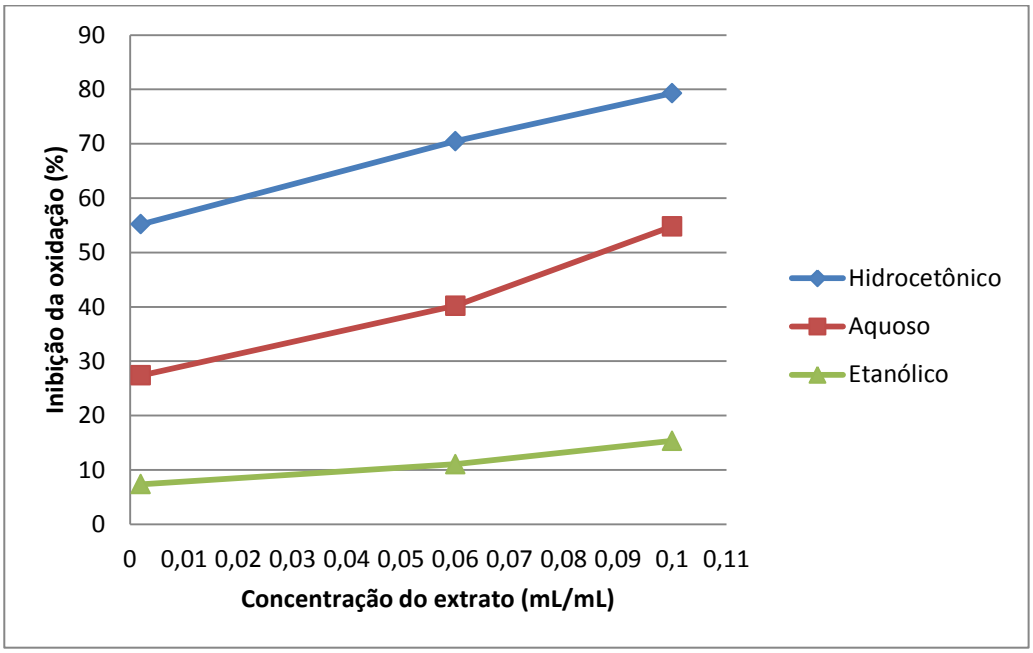


Figura 9 - Inibição da oxidação do radical livre estável DPPH, de acordo com a concentração dos extratos hidrocetônico, aquoso e etanólico do jatobá-do-cerrado (mL/mL).

O extrato hidrocetônico foi capaz de inibir a oxidação do radical livre estável DPPH entre a faixa de 55 - 79,29 %, o extrato aquoso foi capaz de inibir o DPPH em valores entre 26,91 - 54,52% e o etanólico entre 7,51 - 15,25%, quando, os extratos mais concentrados, com concentração de 0,1 mL/mL, inibiram a oxidação com melhor eficiência (Figura 9).

Dias, Luzia e Jorge (2013) encontraram valor de $IC_{50}$ de 5,84 $\pm$ 0,10 µL/mg na fração acetato de etilo da polpa do fruto, menores dos que os encontrados neste

estudo, para todas as extrações. Em relação a demais frutos do Cerrado, o $IC_{50}$ dos extratos aquoso e hidrocetônico foi menor em relação aos encontrados para araticu-do-mato, do butiazeiro e do mandacaru-de-três-quinas, com extrato da polpa misto de metanol (50%) e hidrocetônico (70%) (PEREIRA *et al.,* 2013). Os achados deste estudo ainda apresentaram menores valores de $IC_{50}$, quando comparados com extração etanólica e aquosa de casca e polpa da cagaita (*E. klostzchiana*), (387,47 ± 8,70 e 879,33 ± 11,70) e araticum (49,18 ± 3,13 e 198,28 ± 8,24).

O extrato etanólico demonstrou ser menos eficiente na extração de fenóis que os outros solventes, estatisticamente ($p$<0,01). O extrato hidrocetônico e o aquoso não diferiram significantemente entre si.

Rocha *et al.* (2011) encontrou valores de fenóis totais que variaram entre 105-385 mgEAT/100g na extração hidrocetônica (70%) e de 0,0-252 mgTAE/100g em extração etanólica (95%) para guapeva (*Pouteria gardneriana*), mama-cadela (*Campomanesia* sp.), cagaita (*E. klostzchiana*), cambuçá (*Plinia edulis*), gabiroba (*Campomanesia* sp.), jaracatiá (*Jaracatia spinosa*), pera-do-cerrado (*Eugenia klostzchiana*) e pitanga-do-cerrado (*Eugenia punicifolia*). Estes valores demonstraram que o jatobá-do-cerrado possui alta concentração de fenóis, associada ao seu potencial de atividade antioxidante.

Peres e colaboradores (2013) encontraram valores de fenóis totais na fração de extrato de acetato de etilo da polpa do jatobá com 18 $\pm$ 1,54 µLEAG/mg de extrato, apresentando alta concentração de extração fenólica na polpa, quando comparado com a polpa de outros frutos do Cerrado em extração fenólica, tais como tamarindo (*Tamarindus indica* L.) (183,28 ± 17,37) e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) (183,50 ± 20,40), porém apresentando melhores extrações na casca do fruto.

Rocha e colaboradores (2013) encontraram valores superiores de equivalentes de ácido gálico em extração etanólica, em relação à aquosa (34,1 mgEAG/100g e 25,19 mgEAG/100g, respectivamente). Os valores encontrados por estes autores estão abaixo dos achados no presente estudo e também dos determinados por Dias, Luzia e Jorge (2013) em óleo de polpa de jatobá (343 ± 8,0 mgEAG/100g).

A diferença dos valores encontrados pode ser devido à técnica utilizada, características do fruto (cultivo, clima, estádio de maturação na coleta, particularidades de coleta e armazenamento) e também devido às extrações

realizadas, uma vez que Dias, Luzia e Jorge (2013) realizaram extração a partir do óleo da polpa, e neste estudo, a extração aquosa e hidrocetônica obtiveram melhores valores de potencial antioxidante, demonstrando o caráter polar dos bioativos neste fruto.

A quantidade de fenóis totais dos extratos foi bastante relevante, quando comparada com outros frutos. Fu e colaboradores (2011) analisaram a quantidade de fenóis totais de 62 frutos, encontrando valores entre 11,88 mgEAG/100g e 585,52 mgEAG/100g, com média de 71,80 mgEAG/100g, ressaltando a importância dos achados. O fruto que mais se assemelhou na quantificação o de fenóis totais foi a ameixa vermelha (*Prunus salicina*), com 585,52 ± 18,59 mgEAG/100g.

Para Rufino e colaboradores (2010), o conteúdo de fenóis pode ser classificado como baixo, para valores < 100 mgEAG/100g, intermediários, para valores 100-500 mgEAG/100g e elevados, para valores superiores a 500 mgEAG/100g em matéria fresca. Em matéria seca, o conteúdo de fenóis é classificado como baixo, para valores < 1000 mgEAG/100g; intermediários, para valores entre 1000-5000 EAG/100g e elevados, para valores superiores a 5000 mgEAG/100g, corroborando que os extratos aquoso e hidrocetônico do jatobá-do-cerrado, avaliados no presente estudo, possuem altos valores de fenóis totais.

Os valores de taninos foram representados em miligramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) em 100 g de amostra. Quando comparados, o extrato aquoso, hidroacetônico e etanólico diferiram estatisticamente entre si ($p$<0,01), verificando-se valor superior para o extrato hidroacetônico, seguido pelo extrato aquoso e o etanólico.

Em relação a outros frutos do Cerrado, as extrações apresentaram teor bastante elevadas de taninos, quando comparadas aos resultados obtidos na extração de metanol:água (80:20) para jambolão, reportado por Faria *e* colaboradores (2011), com valores de 3,9 $\pm$ 0,8 mgEAT/100g.

Araptsas (2012) considerou o melhor solvente na extração de taninos a mistura de água e acetona, já que a extração com etanol pode levar à formação de acetato de ácido gálico, corroborando os resultados deste estudo.

Quanto ao uso dos extratos e diferentes tipos de solventes, Dembitsky e colaboradores (2011) encontraram valores estatisticamente significativos para a

diferença de atividade antioxidante do mesmo fruto em diferentes solventes, onde, na manga (*M. indica*), houve melhor atividade antioxidante em extrato aquoso e metanólico, em relação ao extrato cetônico e de hexano, sendo a atividade antioxidante 13 vezes superior em extrato aquoso do que em hexano.

Em estudo de Chavan e Singhal (2013), o extrato hidrocetônico 80% também mostrou maior eficácia em relação a acetona pura ou com maiores concentrações de água em noz de betel (*Areca catechu*), verificando maior atividade antioxidante e maiores concentrações de fenóis totais e taninos, corroborando os resultados encontrados neste estudo. Estes resultados podem estar relacionados à mudança da polaridade dos solventes, auxiliando na dissolução de um grupo de compostos antioxidantes, influenciando na atividade antioxidante.

Spigno e colaboradores (2007) encontraram melhores extrações de compostos antioxidantes (fenóis totais), quando utilizaram solução hidroetanólica como solvente, em comparação com soluções monossolventes, pois apresentaria maior solubilização dos compostos de sementes de uva, sem necessidade de aumentar a temperatura.

### 5.3 Atividade antioxidante *in vivo*

No recebimento dos animais, estes foram pesados. Em relação a massa inicial, não houve diferença significativa entre os grupos ($p$=0,899). No dia anterior ao sacrifício, os animais foram pesados novamente, não havendo diferença significativa entre a massa final entre os grupos ($p$=0,4138), conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Massa inicial, massa final e ganho de massa dos grupos (n=8) controle e tratados com suspensão da polpa do jatobá-do-cerrado, extraída com acetona/água (80:20).

| Grupo/massa (g) | Inicial | Final | Ganho de massa | Valor de *p* |
|---|---|---|---|---|
| Controle | 50,62 ± 2,92 | 281,50 ± 24,04 | 230,88 ± 22,65 | 0,5853 |
| Tratado 1 - 150 µL/mL/dia | 49,50 ± 3,38 | 297,62 ± 25,38 | 230,18 ± 26,50 | |
| Tratado 2 - 250 µL/mL/dia | 49,87 ± 4,08 | 269,12 ± 27,41 | 219,25 ± 28,23 | |
| Tratado 3 - 500 µL/mL/dia | 49,50 ± 3,11 | 267,25 ± 17,65 | 217,25 ± 18,67 | |

*valores considerados estatisticamente significantes quando $p<0,05$

**valores descritos em média ± desvio padrão

Em relação ao ganho de massa, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,5853$), conforme Tabela 3.

Batista e colaboradores (2011) encontraram menor ganho de massa em ratos *Wistar* alimentados com dieta acrescida de jatobá em relação àquelas com base proteica de caseína, isocalóricas e isoproteicas. A este fato atribuíram a palatabilidade da ração, ao teor de fibras encontrados na dieta com jatobá, a quantidade maior de ração oferecida aos animais, necessária para se obter a mesma oferta calórica e, por fim, a presença de fitoquímicos existentes no jatobá. Tais fitoquímicos, como taninos, oxalatos, fitatos e inibidores de protease, podem reduzir a biodisponibilidade de alguns nutrientes, resultando no menor ganho de peso do grupo alimentado com ração de jatobá. O extrato de jatobá apresentou alto valor de taninos, podendo ter influenciado no menor ganho de peso nos grupos tratados.

Tinkov e colaboradores (2014) encontraram valores significantemente diferentes ($p<0,05$) para a massa de animais alimentados com dieta com elevado

teor de lipídeos e animais com mesma dieta e tratados com extrato aquoso de *P. maxima.* Os autores associaram efeitos antiadipogênicos, antidiabéticos, anti-inflamatórios e a capacidade de normalizar a flora intestinal destes animais aos bioativos presentes neste extrato.

O extrato hidrocetônico formulado para aplicação *in vivo* foi testado quanto sua capacidade antioxidante, onde o $IC_{50}$ foi < 26,44mg/mgDPPH.

Após o sacrifício e retirada dos cérebros, a inibição da oxidação do tecido cerebral foi calculada em relação ao grupo controle. Foi possível perceber que a inibição da oxidação foi maior com o aumento da concentração do extrato utilizada, conforme Figura 10.

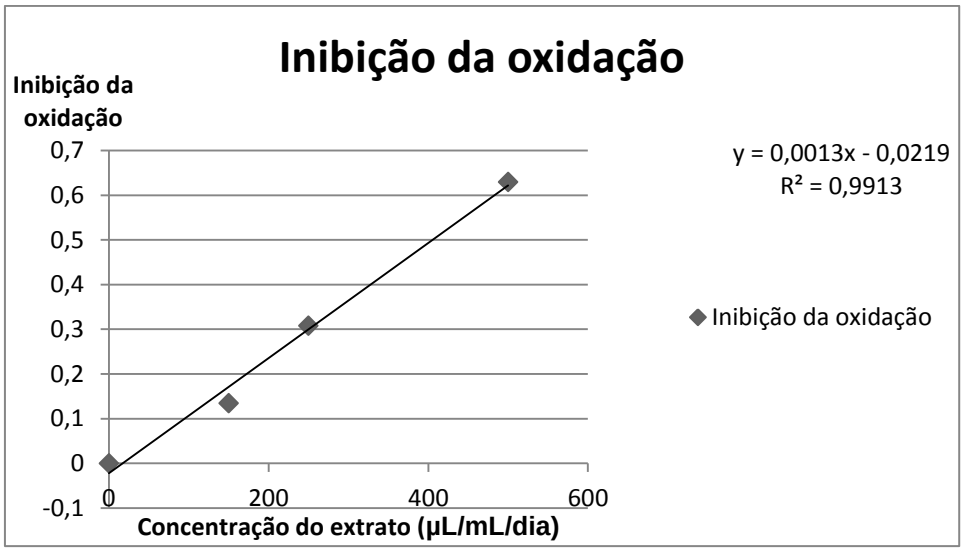


Figura 10 - Inibição da oxidação do tecido do cérebro dos ratos, de acordo com a concentração do extrato hidrocetônico do jatobá-do-cerrado (µL/mL/dia) administrada.

Quando comparados entre si, o grupo controle e o grupo Tratado 1 não diferiram estatisticamente ($p$>0,05), embora o grupo Tratado 1 tenha apresentado maior inibição em valores brutos. A capacidade da inibição do tecido cerebral dos ratos apresentou melhores valores na seguinte ordem: Tratado 3 (T3) > Tratado 2 (T2) >Tratado 1 (T1) > Controle (C), de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4 – Porcentagem de inibição da oxidação do tecido do cérebro dos ratos, de acordo com a concentração do extrato hidrocetônico do jatobá-do-cerrado (µL/mL//dia) administrada.

| Tratamento | Inibição da oxidação |
|---|---|
| Controle | -[c] |
| T1 – 150 µL/mL/dia | 13,46%[c] |
| T2 – 250 µL/mL/dia | 30,77%[b] |
| T3 – 500 µL/mL/dia | 62,92%[a] |

*Letras diferentes representam valores significantemente diferentes (p<0,05) entre si.

Os grupos T2 e T3 foram comparados com o controle, ambos apresentaram diferença significante na inibição da oxidação em relação ao controle ($p$<0,001); quando o grupo T1 foi comparado com o T2, estes apresentaram diferença significativa quanto à inibição da oxidação ($p$<0,05), sendo T2 mais eficiente.

O grupo T3 obteve resultado mais efetivo na inibição da lipoperoxidação em relação ao T2 ($p$<0,05) e ao T1 ($p$<0,001)..

O extrato hidrocetônico do jatobá-do-cerrado apresentou um elevado poder antioxidante *in vivo*, sendo que a atividade antioxidante aumentou de acordo com a dose administrada, ou seja, dose dependente. O uso das doses testadas nos animais equivalem ao consumo de 3,75mg/ml/dia na concentração de 150 µL/mL/dia; 6,25 mg/ml/dia na concentração de 250 µL/mL/dia e de 12,5 mg/ml/dia na concentração de 500 µL/mL/dia, totalizando entre 45 – 155 mL do extrato/dia em humanos, mantedo a concentração de 2,5%, conforme descrito no ensaio *in vitro*.

Em estudo com café (*Coffea arabica*), Duarte e colaboradores (2009) encontraram inibição da peroxidação lipídica de 48,60% no tratamento agudo por 7 dias com ratos *Wistar* e de 53,40% no tratamento crônico (30 dias). Em relação ao tempo de administração, o extrato hidrocetônico do jatobá foi mais eficiente em inibir a peroxidação lipídica, na concentração de 500 µL/dia, sendo capaz de inibir 62,92%. As concentrações 150 µL/dia e 250 µL/dia foram capazes de inibir 13,46% e 30,77% respectivamente, sendo o uso do café mais eficiente.

No extrato aquoso da casca de *S. henningsii* Gilg., Oyedemi, Bradley e Afolaian (2010) encontraram valores dose-dependente na inibição da peroxidação lipídica, no tratamento de oito dias. Este extrato foi capaz de inibir entre 47-58% a peroxidação lipídica, sendo menos eficaz que a maior dosagem do extrato hidrocetônico de jatobá-do-cerrado.

No entanto, a concentração utilizada no preparo do café foi de 10% e os de *S. henningsii* 6%, enquanto a concentração inicial de todos os extratos utilizados foi de 5%. Tais extratos foram diluídos 1:1, tornando a concentração final do extrato de 2,5%. Desta forma, é possível considerar que, mesmo uma baixa concentração do extrato hidrocetônico do jatobá-do-cerrado possui um elevado potencial antioxidante *in vivo*.

Os resultados encontrados neste estudo contrastam com as propostas de Haliwell (2011), que sugere que antioxidantes provindos da dieta raramente podem causar alterações sistêmicas em danos oxidativos, pois foram capazes de reduzir de forma importante a lipoperoxidação do tecido cerebral dos ratos.

Apesar do extrato hidrocetônico ter reportado maior potencial antioxidante *in vitro,* o estudo *in vitro* não leva em consideração situações específicas do estudo *in vivo* como o processo de digestão, absorção e metabolismo; a combinação de fatores que os seres vivos podem estar expostos, como outros fatores metabólicos que podem aumentar ou diminuir o estresse oxidativo (presença de doenças, estresse, combinação de antioxidantes endógenos e consumo de antioxidantes exógenos) (PRIOR; WU, 2013).

Nakajima e colaboradores (2013) encontraram atividade antioxidante no cérebro de ratos alimentados com taninos de acácia (*Acacia podalyriifolia*), em determinação por microdiálise com ressonância magnética eletrônica, porém, este efeito aumentou quando a alimentação com taninos foi combinada com ácido ascórbico.

No presente estudo, não foi possível atribuir o potencial antioxidante dos extratos do jatobá a um único bioativo, uma vez que tanto *in vitro*, quanto *in vivo* o potencial antioxidante eleva-se na presença de mais de um bioativo, pois estes podem agir de forma sinérgica ou antagônica entre si (HIDALGO; SÁNCHEZ-MORENO; PASCUAL-TERESA, 2010). Cerqueira *et al.,* (2007) ressaltaram a importância da presença de diversos antioxidantes, uma vez que um antioxidante é

capaz de reciclar outros antioxidantes. O ascorbato é capaz tanto de atuar diretamente no ciclo oxidativo, como regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na fase lipofílica da membrana (VASCONCELOS *et al.,* 2007). Porém é possível correlacionar que a atividade antioxidante descreveu o mesmo padrão da extração de fenóis taninos totais, ressaltando a importância destes bioativos na capacidade antioxidante destes extratos.

## 6. CONCLUSÕES

O jatobá-do-cerrado é um fruto que possui baixo teor de umidade, é rico em carboidratos, fonte de proteínas, possui baixo teor de lipídeos e elevado teor de fibras. Ainda é rico em vitamina C e mostra baixo conteúdo de β-caroteno (provitamina A) e retinol.

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, sendo que o extrato hidrocetônico apresentou o menor $IC_{50}$, seguido do extrato aquoso e do etanólico. A extração de fenóis e taninos seguiu o mesmo padrão, onde o extrato hidrocetônico apresentou maiores valores de fenóis e taninos, o aquoso e o etanólico.

Não houve diferença significativa de ganho de massa entre os animais tratados e o controle.

O extrato hidrocetônico foi capaz de inibir a peroxidação lipídica do tecido de cérebro dos ratos em todas as concentrações utilizadas, sendo que a inibição da peroxidação lipídica foi dose-dependente.

O extrato hidrocetônico apresentou elevado potencial antioxidante tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, provavelmente devido a sua diversa e elevada concentração de bioativos, que podem agir de forma sinérgica entre si.

## 7. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S.A.; PEREIRA, R.G.F.A.; SOUSA, R.V.; LIMA, A.R. Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de café bebida mole. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 2012. 47 (1): 127-133.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; GARRUTI, D.S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F.A.P.; FEITOSA, T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **B.CEPPA.** 1999. 17 (2): 167-176.

ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; ARRIAGA, A.M.C.; PRADO, G.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIA, G.A. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International.** 2011. 44: 2155-2159.

ANDRÉ, C.; CASTANHEIRA, I.; CRUZ, J.M.; PASEIRO, P.; SANCHES-SILVA. Analytical Strategies to Evaluate Antioxidants in Food: A Review. **Trends in Food Science and Technology.** 2010. 21: 229-246.

ARAPTSAS, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry.** 2012. 135: 1708-1717.

ÁVILA, R.; OLIVEIRA, L.F.; ASCHERI, D.P.R. Caracterização dos frutos nativos dos cerrados: Araticum, Baru e Jatobá. 2010. **Agrotecnologia.** 1 (1): 53-69.

BABBAR, N.; OBEROI, H.S.; UPPAL, D.S.; PATIL, R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International.** 2011**.** 44: 391-396.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova.** 2006. 29 (1): 113-123.

BATISTA, A.G.; ESTEVES, E.A.; DESSIMONI-PINTO, N.A.V.; OLIVEIRA, L.G.; PIRES, S.T.; SANTANA, R.C. Chemical composition of Jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats*. **Alimentos e Nutrição.** 2011. 22 (2): 173-180.

BENASSI, M.T., ANTUNES, A.J. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia.** 1988. 31 (4): 507-13.

BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). EMBRAPA. **Frutas nativas do cerrado brasileiro: aproveitamento alimentar.** Brasília: Embrapa, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4ª ed. Instituto Adolfo Lutz. Brasília, Ministério da Saúde, 2005.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA. A.M.O.; NOVOA, A.J.D.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2007. 27 (4): 902-908.

BURNS, J.; FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. Identification and Quantification of Carotenoids, Tocopherols and Chlorophylls in Commonly Consumed Fruits and Vegetables. **Phitochemestry.** 2003. 62: 939-947.

BUZZINI, P.; ARAPTISAS, P.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; TURCHETTI, B.; PINELLI, P. *et al.* Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** 2008. 8: 1179-1187.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova.** 2009. 32 (6): 1523-1527.

CARDOSO, L.M.; BEDETTI, S.F.; RIBEIRO, S.M.R.; ESTEVES, E.A.; SANT'ANNA, H.M.P. "Jatobá do cerrado" (*Hymenaea stigonocarpa*): chemical composition, carotenoids and vitamins in an exotic fruit from the Brazilian Savannah. **Fruits.** 2013. 68: 95-107.

CARDOSO, P.C.; TOMAZINI, A.P.B.; STRINGHETA, P.C.; RIBEIRO, S.M.R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. **Food Chemistry.** 2011. 126: 411-416.

CARVALHO, A.V.; CAVALCANTE, M.A.; SANTANA, C.L.; ALVES, R.M. Características Físicas, Químicas e Atividade Antioxidante de Frutos de Matrizes de Cajazeira no Estado do Pará. **Alimentos e Nutrição.** 2011. 22 (1): 45-53.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova.** 2007. 30 (2): 441-449.

CHAVAN, Y.V.; SINGHAL, R. S. Separation of Polyphenols and Arecoline from Arecanut (Areca Catechu L. by Solvent Extraction, Its Antioxidant Activity, and Identification of Polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 2013. 93: 2580-2589.

DAVID, J.; ALVEZ, C.Q.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. 2010. 33 (10): 2202-2210.

DEMBITSKY, V.M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S. *et al.* The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International.** 2011. 44: 1671-1701.

DIAS, L.S.; LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Physicochemical and Bioactive Properties of *Hymenaea courbaril* L. Pulp and Seed Lipid Fraction. **Industrial Crops and Products.** 2013. 49: 610-618.

Dietary Reference Intake. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies. 2000. Atualizada em 11/02/2015; acesso em 18/02/2015. Disponível em: http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Tables/recommended_intakes_individuals.pdf

Dietary Reference Intake. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies. 2005. Atualizada em 11/02/2015; acesso em 18/02/2015. Disponível em: http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Tables/recommended_intakes_individuals.pdf

DING, M.; ZOU, J. Rapid Micropreparation Procedure for the Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Determination of BHT, BHA and TBHQ in Edible Oils. **Food Chemistry.** 2012. 131: 1051-1055.

DUARTE, S.M.S. ABREU, C.M.P.; MENEZES, H.C.; PAULA, F.B.A.; PEREIRA, R.G.F.A.; GOUVÊA, C.M.C.P. Efeito da bebida de café descascado sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2009. 29 (4): 703-708.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2006. 26 (2): 446-452.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Jatobá-do-cerrado. Circular Técnica. Colombo. 2007.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Jatobá-do-cerrado: composição nutricional e beneficiamento dos frutos. Documentos: Embrapa cerrados. Planaltina, DF, ago. 2010.

ENGELMANN, N.J.; CLINTON, S.K.; ERDMAN JR., J.W. Nutritional Aspects of Phytoene and Phytofluene, Carotenoid Precursors to Lycopene. **Advances in Nutrition: An International Review Journal.** 2011. 2: 51-61.

FARIA, A.F. MARQUES, M.C.; MERCADANTE, A.Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry.** 2011. 126: 1571-1578.

FERREIRA, E.S.; LUCIEN, V.G.; AMARAL, E.S.; SILVEIRA, C.S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart)*. **Alimentos e Nutrição.** 2008. 19 (4): 427-433.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. **Sports Medicine.** 2006. 36 (4): 327-358.

FINCO, F.D.B.A.; SILVA, I.G., OLIVEIRA, R.B. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of three native fruits from brazilian savannah (cerrado)*. **Alimentos e Nutrição.** 2012. 23 (2): 179-185.

FREITAS, K.H.G.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous Determination of Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Food Samples Using a Carbon Composite Electrode Modified With $Cu_3(PO_4)_2$ Immobilized in Polyester Resin. **Talanta.** 2010. 81: 1102-1108.

FU, L. XU, B.T.; XU, X.R.; GAN, R.Y.; ZHANG, Y.; XIA, Z.Q. *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry.** 2011. 129: 345-350.

GAINO, N.M. e SILVA, M.V. Disponibilidade de carotenoides nos domicílios brasileiros. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição.** 2012. 37 (3): 227-244.

GIORGI, A.; PANSERI, S.; MATTARA, M.S.; ANDREIS, C.; CHIESA, L. M. Secondary metabolites and antioxidant capacities of *Waldheimia glabra* (Decne.) Regel from Nepal. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 2013**.** 93: 1026-1034.

GLABASNIA, A e HOFMANN, T. Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European Oak Wood (*Quercus robur* L.) and Quantitative Analysis in Bourbon Whiskey and Oak-Matured Red Wines. **Journal of Agriultural and Food Chemestry**. 2006. 54: 3380-3390.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis ? **Trends in Pharmacological Sciences.** 2011. 32 (3).

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry.** 2010. 121: 691-696.

JACQUES, A.C.; ZAMBIAZI, R.C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp). **Semina: Ciências Agrárias.** 2011. 32 (1): 245-260.

KADIAN, S.S.; GARG, M. Pharmacological Effects of Carotenoids: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.** 2012. 3 (1): 42-48.

MARANHÃO, C.A. PINHEIRO, I.O.; SANTANA, A.L.B.D.; OLIVEIRA, L.S.; NASCIMENTO, M.S.; BIEBER, L.W. Antitermitic and Antioxidant Activities of Heartwood Extracts and Main Flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration & Biodegradation.** 2013. 79: 9-13.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; ARAÚJO, C.R. Teor de Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante de Polpas Congeladas de Frutas. . **Alimentos e Nutrição.** 2008b. 19 (1): 67-72.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.. Capacidade Antioxidante de Frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** 2008a. 44 (2): 193-201.

MERRILL, A.L.; WATT, B.K. Energy values of foods: basis and derivation. **Agricultural Handbook.** 1973. 74: 106p.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol**., 2004. 26 (2): 211-219.

NAKAJIMA, A. UEDA, Y.; MATSUDA, E.; SAMESHIMA, H.; IKENOUE, T. Enhancement of In Vivo Antioxidant Ability in the Brain of Rats Fed Tannin. **Neurochemical Research.** 2013. 38: 1360-1364.

NASCIMENTO, P. **Avaliação da retenção de carotenoides de abóbora, mandioca e batata doce.** 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine.** 2010. 49: 503-515.

OLIVEIRA, A.C. VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Química Nova.** 2009. 32 (3): 689-702.

OLIVEIRA, D.S.; AQUINO, P.P.; RIBEIRO, S.M.R.; PROENÇA, R.P.C.; SANT'ANA, H.M.P. Vitamina C, Carotenoides, Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante de Goiaba, Manga e Mamão Procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum.** 2011. 33 (1): 89-98.

ORSI, P.R. SEITO, L.N.; STASI, L.C. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Tropical Medicinal Plant with Intestinal Anti-inflammatory Activity in TNBS Model of Intestinal Inflammation in Rats. **Journal of Ethnopharmacology.** 2014. 151: 380-385.

ORSI, P.R.; BONAMIM, F.; SEVERI, J.A.; SANTOS, R.S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *et al. Hymenaea stigonocarpa* a Mart. ex Hayne: A Brazilian Medicinal Plant with Gastric and Duodenal Anti-ulcer and Antidiarrheal Effects in Experimental Rodent Models. **Journal of Ethnopharmacology.** 2012. 143: 81-90.

OYEDEMI, S.O; BRADLEY, G; AFOLAYAN, A.J. In -*vitro* and -*vivo* antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology.** 2010. 4 (2): 70-78.

PANSERA, M.R.*;* SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, R.T. *et al.* Análise dos taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 2003. 13 (1): 17-22.

PEREIRA, M.C. STEFFENS, R.S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P.F.; RIOS, A.O.; VIZZOTO, M. *et al.* Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis.** 2013. 29: 19-24.

PEREIRA, R.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetaise beneficios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity.** 2012. 3 (4): 146-152.

PERES, M.T.L.P.; LOPES, J.R.R.; SILVA, C.B.; CÂNDIDO, A.C.S.; SIMIONATTO, E.; CABRAL, M.R.P. *et al.* Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica.** 2013. 27(4): 836-846.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine.** 1999. 27 (11-12): 1173-1181.

PRIOR, R.L.; WU, X. Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. **American Journal of Biomedical Sciences.** 2013. 5 (2): 126-139.

QIN, T.; YIN, YINYAN.; YU, QINGHUA.; YANG, Q. Bursopentin (BP5) Protects Dendritic Cells from Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress for Immunosuppression. **PLOS One.** 2015. 10 (2): 1 - 16.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova.** 2006. 29 (4): 755-760.

ROCHA, M.S.; FIGUEIREDO, R.W.; ARAÚJO, A.M.A.; MOREIRA-ARAÚJO, R.S.R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura.** 2013. 35 (4): 933-941.

ROCHA, W.S.; LOPES, R.M.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura.** 2011. 33 (4): 1215-1221.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição.** 2003. 16 (3): 315-320.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrient Analysis.** 1989. 5: 191-225.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. **Journal of Food Composition and Analysis.** 2010. 23: 726-740.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis.** 2008. 21: 445-463.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** 2007. 27(1): 53-60.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry.** 2010. 121: 996-1002.

SILVA, A.C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde.** 2011. 13: 375-384.

SILVA, L.M.R.; FIGUEIREDO, E.A.T.; RICARDO, N.M.P.S.; VIEIRA, I.G.P.; FIGUEIREDO, R.W.; BRASIL, I.M. *et al.* Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry.** 2014. 143: 398-404.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias.** 2010. 31 (3): 669-682.

SILVA, M.R.; LACERDA, D.B.C.L.; SANTOS, G.G.; MARTINS, D.M.O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural.** 2008. 38 (6): 1790-1793.

SILVA, M.R.; SILVA, M.S.; MARTINS, K.A.; BORGES, S. 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.** 2001. 21 (2): 176-182.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.S.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova.** 2007. 30 (2): 351-355.

SOUSA, E.P.; SILVA, L.M.M.; SOUSA, F.C.; FERRAZ, R.R.; FAÇANHA, L.M. Caracterização físico-química da polpa farinácea e semente do jatobá. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.** 2012. 7 (2): 117-121.

SOUZA, V.R.; PEREIRA, P.A.P.; SILVA, T.L.T.; LIMA, L.C.O.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry.** 2014.156: 362-368.

SPINGO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering.** 2007. 81: 200-208.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. 2012. 14 (4): 263-269.

TINKOV, A.A.; NEMERESHINA, O.N.; POPOVA, E.V.; POLYAKOVA, V.S.; GRITSENKO, V.A.; NIKOROV, A.A. *Plantago maxima* leaves extract inhibits adipogenic action of a high-fat diet in female *Wistar* rats. **European Journal of Nutrition.** 2014. 53: 831 – 842.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.N.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova.** 2007. 31 (3): 669-682.

XU, H.; CHEN, J. Commercial quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity of 12 cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 2011. 30 (5): 1323-1338.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
**Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA**

# C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 526/2013 da Pesquisadora Priscila Aiko Hiane, referente ao projeto de pesquisa "Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* da água pomba (*Melicoccus lepidopetalus*)", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 20 de setembro de 2013.

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 23 de setembro de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
http://www.propp.ufms.br/ceua
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184