

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DA TIROSINASE DE
JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne)

Autor: Aildo Rodrigues de Miranda
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Rio Verde - GO
Fevereiro – 2012

**DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DA TIROSINASE DE JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne)**

Autor: Aildo Rodrigues de Miranda

Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *campus* Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias.

Rio Verde - GO

Fevereiro - 2012

Miranda, Aildo Rodrigues de.

Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante e inibitória de tirosinase de Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.). Aildo Rodrigues de Miranda. Rio Verde-GO, 2012.

39 f. il.

Dissertação apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano-Campus Rio Verde, como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Orientador: Doutor Carlos Frederico de Souza Castro

1. Conteúdo fenólico - antioxidante. 2. Inibição - tirosinase. 3. Jatobá do Cerrado - *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne 4. Pigmentação da pele - melanina. I. Título. II. Dissertação. III. Mestrado.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DA TIROSINASE DE JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne)

Autor: Aildo Rodrigues de Miranda

Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias – Área de concentração Ciências
Agrárias – Ciências Agrárias

APROVADO em 16 de fevereiro de 2012.

Dr. Ana Lúcia Alves de Arruda

Avaliadora externa

Membro - Universidade Católica Dom Bosco

Dr. Juliana Rodrigues Donadon

Avaliadora interna

Membro - IFGoiano/ Rio Verde

Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Presidente da banca

Membro - IFGoiano/ Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu a vida e ricamente tem abençoado essa minha caminhada. Ao senhor Deus, toda minha honra, glória e louvor.

A nossa senhora Aparecida do qual sou devoto, ela que sempre foi e será minha intercessora junto ao pai eterno.

Em especial ao meu querido e saudoso filho Francescolly Martins Miranda (*in memorian*) e meu querido e saudoso pai Juvenal Rodrigues de Miranda (*in memorian*). A minha mãe Ilda Rodrigues de Miranda, por ter me concebido biologicamente a vida, pelo apoio moral, estímulos de força nos momentos de desânimos e tristezas.

A minha esposa Luzia de Paiva Martins, em especial, pois o seu incentivo teve participação direta na matrícula do exame de seleção do PPGCA. Ao meu filho Ayrthon Martins Miranda e sua namorada Kellen Coutinho, pelo apoio incondicional nas horas mais difíceis da minha pesquisa.

Ao professor Dr. Carlos Frederico de Souza de Castro, detentor da mais alta expoência de conhecimento no campo da pesquisa científica e tecnológica pela sua ilibada conduta ética e humana, proporcionou-me o maior dos privilégios ao conceder-me a carta de orientação. Obrigado, muitíssimo obrigado, pela orientação sábia, paciente, gradual, progressiva e pela conduta rigorosa de ensinamentos sob a qual enriqueci substancialmente meus conhecimentos no campo tecnológico científico.

Aos meus professores, membros da banca que se colocaram a disposição para a avaliação deste trabalho, muitíssimo obrigado. A todos os colegas e as novas amizades, ao longo destes vinte e quatro meses, com dedicação.

BIOGRAFIA DO AUTOR

AILDO RODRIGUES DE MIRANDA, filho de Juvenal Rodrigues Miranda e Ilda Rodrigues Miranda nasceu dia 30 de abril 1958 em Rio Verde-GO.

Em 1989 graduou em Biologia pela Universidade de Rio Verde, FESURV, Rio Verde.

Em 2000 ingressou no Programa Pós Graduação *Lato Senso* em Química pela Universidade Federal de Lavras, UFLA em Lavras, defendendo em 2001.

Em 1979, iniciou-se no magistério como professor do Colégio Integrado Albert Einstein mantido pela Universidade de Rio Verde, FESURV. No ano de 1990 assumiu carreira de magistério de nível superior na mesma universidade onde se encontra atualmente.

Em fevereiro de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação *strictu senso* em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano-*Campus* Rio Verde, submetendo-se a dissertação intitulada: Determinação do Conteúdo Fenólico e Avaliação da Atividade Antioxidante e Inibitória da Tirosinase de Jatobá (*Hymenaea Stigonocarpa* Mart. ex Hayne) á defesa em 16 de fevereiro de 2012.

ÍNDICE

Página

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. Conteúdos fenólicos.....	1
2. Radicais livres.....	4
3. Atividade antioxidante.....	5
4. Pigmentação da pele.....	6
5. Plantas medicinais do Cerrado.....	9
OBJETIVOS.....	16
Objetivo Geral.....	16
Objetivos Específicos.....	16
Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase de jatobá (<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne).....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	18
Material e métodos.....	20
Resultados e discussão.....	24
Conclusão.....	26
Agradecimentos.....	27
Referências.....	27
CONCLUSÃO GERAL.....	28
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	29

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1. Classe de polifenóis.....	3
Tabela 2. Teor de conteúdos fenólicos do extrato bruto extraídos de folhas de Jatobá do cerrado (<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne).....	24
Tabela 3. Atividade antioxidante dos extratos brutos de folhas de Jatobá do Cerrado (<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart.) (IC 5 ^o ppm).....	25
Tabela 4. Efeito inibitório dos extratos brutos de folhas de Jatobá do Cerrado (<i>H. Stigonocarpa</i> Mart.) sobre a atividade de enzima tirosinase.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Área de distribuição do bioma Cerrado.....10

Figura 2. Características de jatobá-do-cerrado.....11

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Cu ⁺²	Íon cúprico
DPPH.....	2,2 Difenil 1- Picrilhidrazil
E.B.E.....	Extrato bruto etanólico
E.D.T.A.....	Ácido etilenodiaminotetracético
E.B.H.....	Extrato bruto hexânico
EAGg ⁻¹ ms.....	Equivalente de ácido gálico por grama de matéria seca
Fe.....	Ferro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
mg.....	Miligramas
mM.....	Milimolar
nm.....	Nanômetro
O ₂ ⁻	Superóxido
O ₂	Gás de oxigênio
OH.....	Íon de hidroxila
pH.....	Potencial hidrogeniônico
ppm.....	Parte por milhão
Q.....	Radical semiquinona
U/mL.....	Unidade por mililitro
µL.....	Microlitro

RESUMO

Espécies de Jatobá são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Estudos quimiotaxonômicos têm relacionado o gênero *Hymenaea* como fonte potencial de compostos fenólicos, taninos, flavonóides, os quais apresentam propriedades biológicas de defesas contra herbivoria, coloração de flores, frutos e sobre tudo destaca a atividade antioxidante. Ocorrem cerca de 15 espécies no gênero *Hymenaea*. Dessas espécies 13 ocorrem no Brasil. A espécie *H. Stigonocarpa*, que ocorre na Floresta Estacional Semidecidual, atinge até 30m de altura. O material botânico (folhas), foi colhido de árvores da área de cerrado de preservação ambiental do *campus* universitário FESURV – Universidade de Rio Verde – GO, seco em uma estufa de circulação forçada a 42°C por 2 dias. Submetido à extração com hexano, (extrato bruto hexânico), e extração com etanol absoluto (extrato bruto etanólico). A determinação do conteúdo fenólico foi realizada com o reativo Folin Ciocalteau, verificando ser o extrato bruto etanólico (E.B.E) o que apresentou a maior concentração (235,7mg EAGg⁻¹ ms). Na avaliação da atividade captadora de radical, empregando o radical livre DPPH, novamente o extrato etanólico demonstrou atividade antioxidante mais elevada (IC₅₀ = 19 ± 0,1 ppm), enquanto que o controle BHT apresentou uma capacidade antioxidante de 181± 6 ppm. Para o procedimento de quelação de íons cúprico, o extrato bruto etanólico testado não demonstrou tal capacidade. Para o procedimento de inibição da enzima tirosinase, o extrato bruto etanólico testado, após 30 e 60 minutos apresentou-se inibição de 38 e 48% respectivamente.

Palavras-chave: *H. Stigonocarpa*, compostos fenólicos, antioxidantes, radical livre, ERO

ABSTRACT

Jatoba species are traditionally used to treat various diseases. Chemotaxonomic studies have linked the genus *Hymenaea* as a potential source of phenolic compounds, tannins, flavonoids, which have biological properties of defenses against herbivory, color of flowers, fruits and above all highlights the antioxidant activity. There are approximately 15 species in the genus *Hymenaea*. Of these 13 species occur in Brazil. The species *H. Stigonocarpa*, which occurs in the semi deciduous forest reaches up to 30m high. The botanical material (leaves) were collected from trees in the savannah area of environmental preservation on campus FESURV - University of Rio Verde - GO, dried in a forced circulation oven at 42° C for 2 days. Subjected to extraction with hexane (hexane crude extract), and extraction with absolute ethanol (ethanolic crude extract). The determination of phenolic content was performed using the Folin Ciocalteu reagent, and the crude ethanol extract (CEE) presented the highest concentration (235.7 mg⁻¹ EAGg⁻¹). In assessing the activity of, using the DPPH free radical, again the ethanolic extract showed higher antioxidant activity (IC₅₀ = 19 ± 0.1 ppm). For the process of chelation of cupric ions, the crude ethanol extract tested showed no such capability. For the process of inhibiting the enzyme tyrosinase, the crude ethanol extract tested, after 30 and 60 minutes, presented inhibition of 38 and 48% respectively.

Key words: *H. Stigonocarpa*, phenolic compounds, antioxidants, free radical, ROS.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Conteúdos fenólicos

A ação dos compostos antioxidantes está relacionada à diminuição de eventos oxidativos que podem contribuir para patofisiologia de várias doenças, que podem ser prevenidas, com a ingestão de antioxidantes presentes nas mais variadas frutas e vegetais e em diversas quantidades. Dentre os compostos antioxidantes, destacam-se os ácidos fenólicos presentes nas formas livres ou complexadas (Rockenbach et al., 2008). É utilizado o método de Folin-Ciocalteu para quantificar flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos presentes nas amostras (Roesler, 2007).

Os compostos fenólicos ganharam bastante destaque atualmente em função de suas elevadas atividades antioxidantes. Na natureza entre os vários grupos de compostos bioativos, os polifenóis e os carotenóides se destacam em função de suas atividades antioxidantes. Os polifenóis são produtos secundários do metabolismo vegetal, constituem um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, de natureza hidrofílica, com mais de 10.000 estruturas conhecidas, Tabela 1 (Dalvi, 2008).

Encontra-se no fruto *Physalis*, alto conteúdo de fenólicos totais e considerável atividade antioxidante com destaque para os ácidos salicílico e protocatequínico comparáveis a diversas outras frutas consumidas no Brasil, podendo ser considerado uma boa fonte de compostos antioxidantes naturais (Rockenbach et al., 2008).

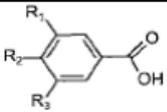
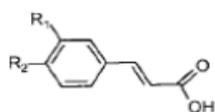
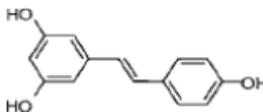
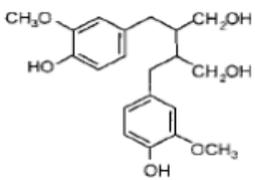
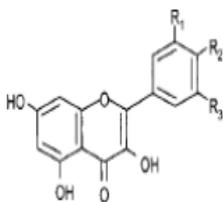
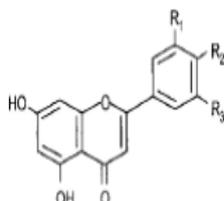
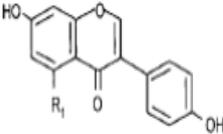
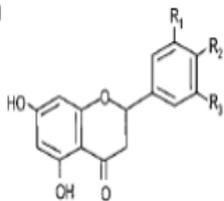
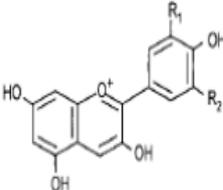
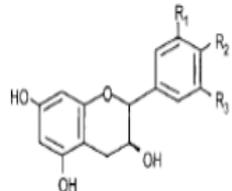
Os extratos etanólicos de cascas e sementes das frutas do cerrado brasileiro como: extratos etanólico e aquoso de casca de pequi, extratos etanólico de semente de cagaita, de semente e casca de araticum e de casca de banha de galinha possuem melhores fontes e maior capacidade antioxidante. Essas frutas avaliadas ficam localizadas em

região que está sendo devastada para áreas de pastagens, pois existem poucas pesquisas e pouco custo destes recursos uma vez que sua preservação traz vários benefícios e valorização do cerrado para aplicação de antioxidantes naturais nos setores farmacêuticos, cosméticos e nutricionais (Roesler, 2007).

Podendo exercer proteção contra danos oxidativos em membranas a vitamina E é um potente antioxidante em meio lipídico e contribui para a manutenção e regeneração de outras substâncias antioxidantes. Em seu trabalho foi verificado que os animais que receberam dieta isenta de vitamina E apresentaram pior resposta ao dano oxidativo causado pela dietilnitrosamina e a suplementação de vitamina E não foi capaz de conferir proteção, sendo que outros fatores podem estar envolvidos na resposta metabólica a dietilnitrosamina (Chiarello et al., 2010).

Os Compostos fenólicos são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas, flores e pela qualidade dos alimentos, também estão largamente presentes na natureza como componentes naturais da madeira, lignina e tanino. No meio ambiente encontra-se um grande número de poluentes com estrutura fenólica e derivados como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos devido a sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais (Rosatto et al., 2001).

Tabela 1 A. Classe de polifenóis (Dalvi, 2008).

Classes/Subclasses	Exemplos	Fontes Alimentares	Estrutura química
Ácidos Fenólicos			
<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos Hidroxibenzóico 	<p>Ácido gálico ($R_1 = R_2 = R_3 = OH$)</p> <p>Ácido vanílico ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$)</p>	Morango, amora, caqui, framboesa	
<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos Hidroxicinâmico 	<p>Ácido cumárico ($R_1 = OH$)</p> <p>Ácido cafêico ($R_1 = R_2 = OH$)</p> <p>Ácido Ferúlico ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$)</p>	Cafê, kiwi, cereja, berinjela	
Estilbenos	Resveratrol	Vinho tinto	
Lignanos	Secoisolariciresinol	Linhaça	
Flavonóides			
<ul style="list-style-type: none"> • Flavonóis 	<p>Kaempferol ($R_2 = OH$; $R_1 = R_3 = H$)</p> <p>Quercetina ($R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$)</p>	Cebola, brócolis, tomate cereja, alho poró	
<ul style="list-style-type: none"> • Flavonas 	<p>Luteolina ($R_1 = R_2 = OH$)</p> <p>Apigenina ($R_1 = H$; $R_2 = OH$)</p>	Salsa, aipo	
<ul style="list-style-type: none"> • Isoflavonas 	<p>Daidzeína ($R_1 = H$)</p> <p>Genisteína ($R_1 = OH$)</p>	Soja	
<ul style="list-style-type: none"> • Flavanonas 	<p>Naringenina ($R_1 = H$; $R_2 = OH$)</p> <p>Hesperetina ($R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$)</p>	Laranja, limão, grapefruit	
<ul style="list-style-type: none"> • Antocianidinas 	<p>Cianidina ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)</p> <p>Malvidina ($R_1 = R_2 = OCH_3$)</p>	Amora, jabuticaba, cereja, morango	
<ul style="list-style-type: none"> • Flavanóis 	<p>Catequina ($R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$)</p> <p>Galocatequina ($R_1 = R_2 = R_3 = OH$)</p>	Chocolate, chá verde, vinho tinto, damasco	

2. Radicais livres

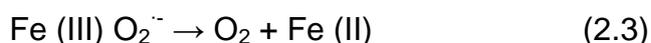
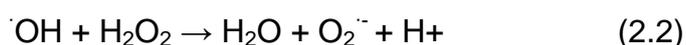
Os radicais livres e outros oxidantes possuem um papel essencial responsável pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas que acometem toda a população. Um radical livre é um grupamento átomo, íon ou molécula livre, e que contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais energético. Alguns exemplos de espécies de radicais livres são o oxigênio singlete, radical superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico, peroxinitrito, radical semiquinona (Souza et al., 2007; Roesler, 2007). São moléculas instáveis altamente reativos. A sua ativação pode causar processos traumáticos nos tecidos pelo desencadeamento de diversas cadeias de reações. Se um radical reage com um não radical, é produzido um novo radical livre (Córdova & Navas, 2000).

Os inibidores dos danos causados pelo excesso de radicais livres são os agentes antioxidantes. Diversos compostos antioxidantes controlam a produção de radicais livres nos seres vivos que podem ser de origem endógena como o superóxido dismutase ou serem oriundos da dieta ou de outras fontes como os tocoferóis, ácido ascórbico, polifenóis, selênio e carotenóides (Souza et al., 2009).

No interior das mitocôndrias é utilizado o oxigênio no processo de respiração, onde intervém no metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos, liberando-se água, dióxido de carbono e catabólitos diversos e energia calórica produzida. A produção de radicais livres é uma seqüela do aumento do consumo de oxigênio que ocorre com o exercício físico e guarda uma estreita relação com o dano muscular. O aumento do consumo de oxigênio, a depleção dos substratos energéticos, a diminuição da cadeia respiratória, a elevação da temperatura corporal e a isquemia relativa que se produz durante a contração muscular estão relacionados com a peroxidação (Córdova & Navas, 2000).

Precisa haver mais pesquisas e uma definição de doses e de protocolos de tratamento no uso de vitaminas e outros antioxidantes na prevenção patológica. As pesquisas têm demonstrado ausência de benefícios ou mesmo prejuízos na suplementação com vitaminas sobre o desenvolvimento de vários tipos de tumores, pois com a aplicação farmacológica pode haver interferências juntamente com os mecanismos celulares, alterações na atividade enzimática e estruturas de membranas (Bianchi & Antunes, 1999).

O radical hidroxil pode ser formado por meio da redução do peróxido de hidrogênio na presença de íons de Ferro (II) e Cobre (I) (reação 2.1) que foi descrita pela primeira vez em 1894, quando H.J.H. Fenton verificou a oxidação de ácido tartárico na presença de hidrogênio (Fenton, 1894). Anos depois, muitos estudos de Haber, Weiss, Wilstätter e Barb revelaram a continuação dessa reação por meio da redução do Fe (III) a Fe (II) pelo superóxido formado no meio reacional (reações 2.2 a 2.4) (Liochev & Fridovich, 2002). A reação 2.4, catalisada pelos íons metálicos, é determinada reação de Haber-Weiss e representa a soma das equações 2.1 e 2.3.



3. Atividade antioxidante

As frutas cítricas são conhecidas como fontes constituintes de antioxidantes que apresentam várias ações benéficas ao ser humano, ajudam a diminuir incidência do envelhecimento e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais.

Não existe uma única fruta que contenha um alto teor de todos os compostos de interesse. Para conhecer melhor a capacidade antioxidante de uma fruta, faz-se necessário isolar e quantificar o maior número de compostos bioativos presentes em diferentes solventes, assim como também utilizar o maior número de métodos possíveis para avaliar a sua atividade antioxidante (Duzzioni et al., 2010).

Foi relatado que na polpa dos frutos de umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) existem baixos teores de ácido ascórbico e de carotenóides totais, inferiu-se que a ação antioxidante exibida possa ser da presença dos compostos fenólicos. Para a extração de compostos bioativos com aplicação em alimentos como antioxidante natural as cascas desidratadas de frutos maduros são promissoras, sendo necessário testar sua ação em diferentes alimentos e testes toxicológicos (Melo & Andrade, 2010).

Devido à presença de substâncias fenólicas a atividade antioxidante do extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens* demonstrou que o extrato bruto é mais ativo, quando comparada com o padrão do ácido gálico. A atividade antioxidante deve estar relacionada à presença dessas substâncias fenólicas (Silva et al., 2007).

Há poucos estudos realizados quanto à estabilidade de compostos fenólicos. Em alguns estudos, a cocção facilitou a extração desses compostos e, portanto, foram registrados maiores quantidades nas hortaliças cozidas (Campos et al., 2008).

4. Pigmentação da pele

A melanina é o pigmento responsável pela coloração da pele, possui peso molecular alto, é de coloração castanho denso, quanto mais concentrado a quantidade de melanina mais escura a cor da pele. A tirosina é um aminoácido essencial no processo biossintético da melanina. A tirosina sofre atuação química da tirosinase, complexo enzimático cúprico-proteico, sintetizado nos ribossomos e transferido, através do retículo

endoplasmático para o aparelho de Golgi, sendo aglomerado em unidades envoltas por melanossomas (Miot et al., 2009).

A melanina está diretamente associada aos sistemas de proteção contra as agressões solares, dessa forma todas as vezes que as incidências UVA e UVB oferecem algum perigo por uma maior exposição solar, a produção de melanina será aumentada por estimulação direta ou indireta. Os melanossomas normalmente são responsáveis pela proteção do núcleo, agrupando-se ao seu redor a fim de proteger o material genético, além de proteger a coloração da pele, pêlos e cabelos a melanina também atua como filtro solar, refletindo a radiação solar (Gonchoroski & Côrrea, 2005).

A genética da pigmentação cutânea ainda é um enigma. As combinações de genes podem formar cores do extremo preta ao extremo branca, ficando assim entre os dois extremos tons intermediários. Apesar de a dermatologia utilizar sistemas de classificação para a cor de pele, não é possível a padronização. O sistema mais usado de classificação para a cor da pele é o de Fitzpatrick o qual define o fenótipo. Nos indivíduos de cor negra a concentração de melanina na epiderme é maior sem que haja diferença no número de melanócitos, são mais pigmentados. Com os grânulos de melanina maiores, apesar de apresentarem o mesmo tipo de queratina, possuem diferenças na composição dos aminoácidos, com deficiência de serina e treonina e excesso de tirosina, fenilalanina e amônia (Alchorne & Abreu, 2008).

Nas temporadas de férias de verão a busca de uma pele bronzeada, bonita e mais atraente, pode oferecer algumas armadilhas que pode ter um custo muito alto para a saúde, pois alguns raios, como por exemplo, UVA, o qual promove a oxidação dos precursores incolores da melanina, através de uma pigmentação direta e imediata sem eritema. Os raios UVB, normalmente deixam a pele mais vermelha, promovem uma pigmentação indireta, próprio da maior concentração de melanócitos ativos com

sequência da estimulação da tirosinase, provocando eritema actínico (Gonchoroski & Côrrea, 2005).

A utilização de muitos fármacos sobre a pele tem por finalidade preservar suas características naturais. Um fator de desconforto são as discromias que podem ser representadas por manchas mais claras que são hipocromias ou mais escuras hiperpigmentações, do que a coloração normal da pele, produzindo um resultado estético desagradável (Gonchoroski & Côrrea, 2005).

As hiperpigmentações são distúrbios de pigmentação que tem origem numa produção exagerada de melanina. As manchas na pele podem surgir devido a fatores como envelhecimento, alterações hormonais, inflamações, alergias e exposição solar, dentre outros. São muitas as substâncias utilizadas no tratamento de hiperpigmentações, sendo utilizadas de forma isoladas ou associadas a algum tipo de creme, como por exemplo, a hidroquinona, o ácido glicólico, o ácido retinóico e o ácido kójico como agentes clareadores e avaliados no tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória (Gonchoroski & Côrrea, 2005).

Atualmente os pesquisadores estão em busca de novos agentes clareadores a fim de melhorar a estética e auto-estima das pessoas. Os agentes clareadores podem agir por diferentes mecanismos de ação, mas todos ligados à produção ou transferência de pigmentos, ou seja: destruição seletiva dos melanócitos; inibição da formação de melanossomas e alteração de sua estrutura; inibição da biossíntese de tirosinase; inibição da formação de melanina; interferência no transporte dos grânulos de melanina; alteração química da melanina; degradação de melanossomas e queratinócitos (Gonchoroski & Côrrea, 2005).

5. Plantas medicinais do cerrado

Nos últimos vinte anos no Brasil, país com a maior diversidade vegetal do mundo, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente. Um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, as pesquisas com plantas medicinais deviam ser incentivadas. Afinal elas poderiam levar à reorganização das estruturas de uso de recursos naturais devido aos planos de manejo que teriam de estar intimamente associados e à elevação do PIB, visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos (Fernandez, 2006).

Pode-se considerar medicamento fitoterápico aquele cujos componentes terapeuticamente ativos são exclusivamente parte de plantas (raízes, caule, folhas e flores) ou derivados vegetais (extratos brutos, sucos, óleos, ceras e resinas) não tendo em sua composição a inclusão de substâncias ativas isoladas de outras origens, nem associações destas com extratos vegetais. Nos casos em que ocorrer da planta medicinal só conter uma substância ativa, esta terá sobre o organismo humano um efeito mais benéfico que o produzido pela mesma substância obtida por síntese química. A prática da fitoterapia tanto quando se faz uso, e ainda mais quando se recomenda precisa estar alicerçada na experiência e no conhecimento científico comprovado. A Organização Mundial de Saúde relata que 11% dos 252 medicamentos considerados como essenciais são originados a partir de plantas (Gurib-Fakim, 2006).

O bioma cerrado possui árvores de troncos tortuosos, arbustos de formas bizarras, dispostas isoladamente sobre um extrato de gramíneas, caracterizam esta região de paisagem monótona. O grande incremento no uso de plantas para fins medicinais, neste final de século tem provocado um interesse renovado pelo conhecimento estrutural detalhado das espécies que formam um conjunto de milhões de indivíduos com suas naturais variações biológicas que atingem em maior ou menor grau, tanto sua morfologia quanto a sua composição química, portanto, o estudo detalhado de uma espécie busca

conhecer sua estrutura obtendo resultados que forneçam um amplo conhecimento da mesma, sua plasticidade fenotípica, colaborando para a taxonomia do grupo a que pertence, para estudos ecológicos de populações e comunidades e verificar através da análise anatômica estruturas que possam conter fitoquímicos como se pode observar na Figura 1 (Matos, 1997).

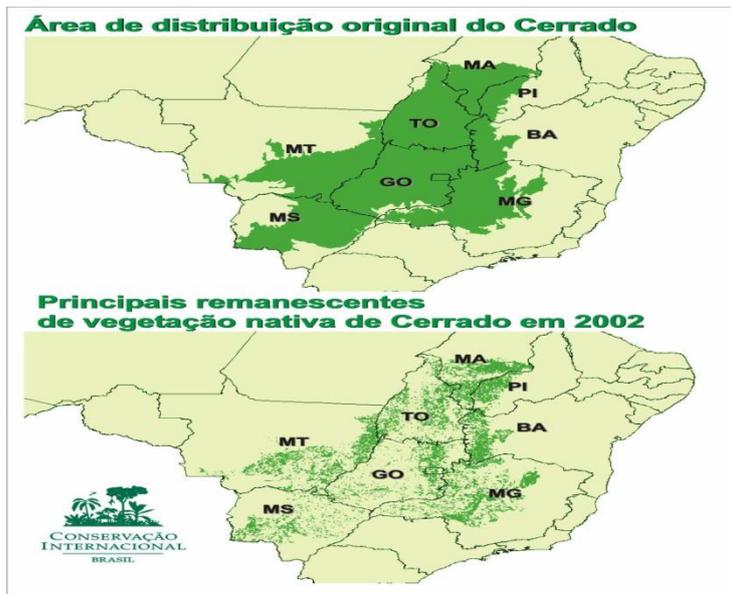


Figura 1. Área de distribuição do bioma Cerrado (ISPN, 2012).

O bioma Cerrado deve ser considerado área prioritária de pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais. É uma região do Brasil muito representativa em extensão e riquezas que está sendo muito devastada e possui várias plantas com potencial medicinal e uma desta é o jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne).

De acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist, a posição taxonômica de *Hymenaea stigonocarpa* obedece à seguinte hierarquia:

Divisão: *Magnoliophyta (Angiospermae)*

Classe: *Magnoliopsida (Dicotyledonae)*

Ordem: *Fabales*

Família: *Caesalpinaceae (leguminosae: Caesalpinioideae).*

Gênero: *Hymenaea*

Espécie: *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne

Nomes vulgares por Unidades da Federação: jatobá-capão e jatobá-da-casca-fina, na Bahia; jatobá e jatobá-da-casca-fina, no Ceará; jatobá-açu, em Mato Grosso; jatobá e jatobeiro, em Mato Grosso do Sul. Jatobá e jatobá-do-campo, em Minas Gerais; jataí-de-piauí, jatobá-de-casca-fina, jatobá-de-vaqueiro e jatoba, no Piauí; jatobá do cerrado, no estado de São Paulo.

Etimologia: o nome genérico *Hymenaea* deriva do grego (*hymen*), deus do matrimônio, e faz alusão aos dois folíolos pareados das folhas (Carvalho, 2006).



Figura 2. Características de jatobá-do-cerrado (Tatagiba, 2011).

A - Jatobá-do-cerrado com cerca de cinco metros de altura, núcleo Rural Boa Esperança II, Distrito Federal, 14/10/06;

B - Ritidoma (casca) do jatobá-do-cerrado;

C - Folhas alternas, bifolioladas (compostas por dois folíolos) características dos jatobás.g

Entre as quinze espécies do gênero *Hymenaea*, destaca-se também o *Hymenaea courbaril*. (Lee e Langenheim, 1975), amplamente distribuída no Caribe e toda a América do Sul. Os frutos são de 10 – 20 cm comprimento e 4 – 6 cm de diâmetro e contém uma

polpa em pó. Eles são consumidos pela população local e usado como ingrediente de mingau de aveia, pratos regionais e bebidas (Arckoll 1984; Witsberger, Current & Archer, 1982).

O estudo mais recente mostrou que a farinha da fruta é rica em fibras e pode ser usada na preparação de lanches saudáveis (Chang et. al, 1998). Pouca pesquisa foi realizada sobre os constituintes químicos da parte comestível.

A casca, resina e folhas da planta *H. courbaril* tem sido utilizados para o tratamento da artrite, asma, bronquite e reumatismo (Duke & Wain, Plantas Medicinais do Mundo. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hymenaeacourbaril.html#20medicine%ofolk). O exsudado da resina do *H. courboril* mostrou potente atividade inibitória da peroxidação de lipídios (Braga et. al, 2000). A resina tem ricas fontes de diterpenos ácidos carboxílicos. Investigações anteriores revelou vários dipertenóides nos extratos das folhas de *H. courbaril*. (Abdel-kader et al., 2002; khoo & Oehischlager, 1973; Marsaioli, Leitão Filho & De Paiva Campello, 1975; Nogueira et. al, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-Kader, M., Berger, J. M., Slebodnick, C., Hoch, J., Malone, S., Wisse, J. H., et al. (2002). Isolation and absolute configuration of enthalimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the suriname rain forest. *Journal of Natural Products*, 65, 11–15.

ALCHORNE, M.M.A.; ABREU, M.A.M.M. Dermatologia na pele negra. **An Bras Dermatol**, v. 83 n.1, p. 7-20, 2008.

ARCKOLL, D. B. (1984). Some leguminous trees providing useful fruits in the north of Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasilia*, 19, 231–234.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 2, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRITO, H. O. et al. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n.3, p. 180-184, 2008

BRAGA, F. C., Wagner, H., Lombardi, J. A., & De Oliveira, A. B. (2000). Screening of Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine*, 6, 447–452.

CAMPOS, F.M. et al. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p.481-490, 2008.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa informações tecnológicas, 2006. 627 p.

CHANG, Y. K., Silva, M. R., Gutkoski, L. C., Sebio, L., & Da Silva, M A. A. P. (1998). Development of extruded snacks using jatoba´ (*Hymenaea stigonocarpa* Mart) flour and cassava starch blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 59–66.

CHIARELLO, P.G. et al. Ausência de vitamina e na dieta aumenta o dano oxidativo causado pela dietilnitrosamina em ratos. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 297-303, 2010.

CÓRDOVA, A.; NAVAS, F.J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, n. 5, p. 204-208, 2000.

DALVI, L.T. **Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*)**. 2008, 129 f. (Mestrado em Nutrição Humana) Faculdade de Ciência da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

DIAS, B.F.S. Cerrados: uma caracterização, p. 11-25, In: B.F.S. Dias (Coord.). Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis. Brasília: **Fundação Pro-Natureza**, 1996.

DUKE, J.A. & Wain, K.K. Medicinal Plants of the World. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hymenaea_courbaril.html#Folk%20Medicine.

DUZZIONI, A.G. et al. Determinação da atividade antioxidante e de constituintes bioativos em frutas cítricas. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 643-649, 2010.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. Porto Alegre: **Biodiversidade Artigos**, 2003.

FELFIFI, J.M. Padrões de diversidade do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro. In: Araújo, E.L. et al. (eds.) **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. UFRPE, Recife, p. 62-67, 2002.

FERNANDES, José Martins. Educação Ambiental em Ação. **Jatobá (*Hymenaea courbaril* L. – leguminosae, caesalpinioideae): uso medicinal, cultivo e contribuições para a espécie**, 18, 1678-0701, 2006. Disponível em <<http://www.revistaea.org/artigo.php?idartigo=424&class=19>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2012.

GONCHOROSKI, D.D.; CÔRREA, G.M. Tratamento de hiperemia pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Infarma**, v.17, n. 3/4, p. 84-88, 2005.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27:: 1-93. 2006.

ISPN. Disponível em: <http://www.ispn.org.br/o-cerrado/o-cerrado-esta-desaparecendo/>. Acesso em: 12 de janeiro de 2012.

KHOO, S. F., & Oehlschlager, A. C. (1973). Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. *Tetrahedron*, 29, 3379–3388.

LEE, Y. T., & Langenheim, J. H. (1975). Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae) (Vol. 69). Chemistry of California Press Ltd., pp. 1–109.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The Haber-Weiss cycle- 70 years later: an alternative view. **Redox Report**, v. 7, n. 1, p. 55-57, 2002.

MARSAIOLI, A. J., Leitaõ Filho, H., & De Paiva Campello, J. (1975). Diterpenes in the bark of *Hymenaea coubaril*. *Phytochemistry*, 14, 1882–1883.

MATOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica experimental. 2. Ed. Fortaleza: **Edições UFC**, 1997.

MELO, E.A.; ANDRADE, R.A.M.S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.

MIOT, L.D.B. et al. Fisiopatologia do melasma. **An Bras Dermatol.**, v. 84, n. 6, p. 623-35, 2009.

NOGUEIRA, R. T., Shepherd, G. J., Laverde, A., Jr., Marsaioli, A. J., & Imamura, P. M. (2001). Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry*, 58, 1153–1157.

ROCKENBACH, I.I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 271-276, 2008.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROSATTO, S.S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Revista Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

SILVA, M.A. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p.319 - 324, 2007.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TATAGIBA, F. Disponível em: <http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatoba.html>.
Acesso em: 19 de dezembro de 2011.

WISTSBERG, D., Current, D., & Archer, E. (1982). Arboles del Parque Deininger. Ministerio de Educación, El Salvador, pp. 146–147.

OBJETIVOS

A biodiversidade da flora do Cerrado brasileiro se compara a savana africana, porém muito pouco se aproveitou até hoje de suas potencialidades fitoquímicas, por falta de mais pesquisas científicas a cerca desse bioma hoje quase totalmente descaracterizado.

OBJETIVO GERAL:

Levando-se em conta a importância dos antioxidantes presentes nas plantas, na prevenção de danos oxidativos causados pelos radicais livres, este trabalho visa avaliar o conteúdo fenólico, atividade antioxidante, com potencial quelação do íon cobre II e inibição da tirosinase presente no extrato bruto da folha de jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Produzir os extratos vegetais brutos;
- ✓ Proceder atividade antioxidante nos extratos vegetais brutos;
- ✓ Testar atividade de quelação de íons metálicos de transição;
- ✓ Averiguar atividade inibitória da enzima tirosinase nos extratos vegetais brutos.

Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne)

RESUMO: Espécies de Jatobá são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Estudos quimiotaxonômicos têm relacionado o gênero *Hymenaea* como fonte potencial de compostos fenólicos, taninos, flavonóides, os quais apresentam propriedades biológicas de defesas contra herbivoria, coloração de flores, frutos e sobretudo destaca a atividade antioxidante. Ocorrem cerca de 15 espécies no gênero *Hymenaea*. Dessas espécies 13 ocorrem no Brasil. A espécie *H. Stigonocarpa*, que ocorre na Floresta Estacional Semidecidual, atinge até 30m de altura. O material botânico (folhas), foram colhidas nas árvores da área de cerrado de preservação ambiental do *campus* universitário FESURV – Universidade de Rio Verde – GO, seco em uma estufa de circulação forçada a 42°C por 2 dias. Submetido à extração com hexano, (extrato bruto hexânico), e extração com etanol absoluto (extrato bruto etanólico). A determinação do conteúdo fenólico foi realizada com o reativo Folin Ciocalteau, verificando ser o extrato bruto etanólico (E.B.E) a que apresentou a maior concentração (235,7mg EAGg⁻¹). Na avaliação da atividade captadora de radical, empregando o radical livre DPPH, novamente o extrato etanólico demonstrou atividade antioxidante mais elevada (IC₅₀ = 19 ± 0,1 ppm). Para o procedimento de quelatação de íons cúprico, o extrato bruto etanólico testado não demonstrou tal capacidade. Para o procedimento de inibição da enzima tirosinase, o extrato bruto etanólico testado, após 30 e 60 minutos apresentou-se inibição de 38 e 48% respectivamente.

Palavras-chave: *H. Stigonocarpa*, compostos fenólicos, antioxidantes, radical livre, ERO_s

ABSTRACT: Determination of phenolic content and evaluation antioxidant activity and inhibition of tyrosinase JATOBÁ (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne).

Jatoba species are traditionally used to treat various diseases. Chemotaxonomic studies have linked the genus *Hymenaea* as a potential source of phenolic compounds, tannins, flavonoids, which have biological properties of defenses against herbivory, color of flowers, fruits and above all highlights the antioxidant activity. There are approximately 15 species in the genus *Hymenaea*. Of these 13 species occur in Brazil. The species *H. Stigonocarpa*, which occurs in the semi deciduous forest reaches up to 30m high. The botanical material (leaves) were harvested from trees in the savannah area of environmental preservation on campus FESURV - University of Rio Verde - GO, dried in a forced circulation oven at 42° C for 2 days. Subjected to extraction with hexane (hexane crude extract), and extraction with absolute ethanol (ethanolic crude extract). The determination of phenolic content was performed using the Folin Ciocalteu reagent, by checking the crude ethanol extract (CEE) that had the highest concentration (235.7 mg of gallic acid / g of SBS). In assessing the activity of radical pickup, using the DPPH free radical, again the ethanolic extract showed higher antioxidant activity (IC₅₀ = 19 ± 0.1 ppm). For the process of chelation of cupric ions, the crude ethanol extract tested showed no such capability. For the process of inhibiting the enzyme tyrosinase, the crude ethanol extract tested after 30 and 60 minutes presented inhibition of 38 and 48% respectively.

Key words: *H. Stigonocarpa*, phenolic compounds, antioxidants, free radical, ROS

INTRODUÇÃO

A ação dos compostos antioxidantes está relacionada à diminuição de eventos oxidativos que podem contribuir para patofisiologia de várias doenças, que podem ser prevenidas, com a ingestão de antioxidantes presentes nas mais variadas frutas e vegetais e em diversas quantidades. Dentre os compostos antioxidantes, destacam-se os ácidos fenólicos presentes nas formas livres ou complexadas (Rockenbach et al., 2008). É

utilizado o método de Folin-Ciocalteu para quantificar flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos presentes nas amostras (Roesler, 2007).

Os radicais livres e outros oxidantes possuem um papel essencial responsável pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas que acometem toda a população. Um radical livre é um grupamento átomo, íon ou molécula livre, e que contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais energético. Alguns exemplos de espécies de radicais livres são o oxigênio singlete, radical superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico, peroxinitrito, radical semiquinona (Souza et al., 2009; Roesler, 2007). São moléculas instáveis altamente reativos. A sua ativação pode causar processos traumáticos nos tecidos pelo desencadeamento de diversas cadeias de reações. Se um radical reage com um não radical, é produzido um novo radical livre (Córdova & Navas, 2000).

As frutas cítricas são conhecidas como fontes constituintes de antioxidantes que apresentam várias ações benéficas ao ser humano, ajudam a diminuir incidência do envelhecimento e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. Não existe uma única fruta que contenha um alto teor de todos os compostos de interesse. Para conhecer melhor a capacidade antioxidante de uma fruta, faz-se necessário isolar e quantificar o maior número de compostos bioativos presentes em diferentes solventes, assim como também utilizar o maior número de métodos possíveis para avaliar a sua atividade antioxidante (Duzzioni et al., 2010).

A melanina é o pigmento responsável pela coloração da pele, possui peso molecular alto, é de coloração castanho denso, quanto mais concentrado a quantidade de melanina mais escura a cor da pele. A tirosina é um aminoácido essencial no processo biossintético da melanina. A tirosina sofre atuação química da tirosinase, complexo enzimático cúprico-proteico, sintetizado nos ribossomos e transferido, através do retículo

endoplasmático para o aparelho de Golgi, sendo aglomerado em unidades envoltas por melanossomas (Miot et al., 2009).

Atualmente os pesquisadores estão em busca de novos agentes clareadores a fim de melhorar a estética e auto-estima das pessoas. Os agentes clareadores podem agir por diferentes mecanismos de ação, mas todos ligados à produção ou transferência de pigmentos, ou seja: destruição seletiva dos melanócitos; inibição da formação de melanossomas e alteração de sua estrutura; inibição da biossíntese de tirosinase; inibição da formação de melanina; interferência no transporte dos grânulos de melanina; alteração química da melanina; degradação de melanossomas e queratinócitos (Gonchoroski & Côrrea, 2005).

O Brasil possui cinco áreas de grande abundância de plantas nativas, estando entre elas o bioma Cerrado (Neto & Moraes, 2003).

As folhas de *H. stigonocarpa*, são alternadas, compostas bifolioladas e pecioladas, com estípulas caducas. Os folíolos são curtos peciolulados e subsésseis. O limbo mede de 6 a 23,5 cm de comprimento e 3,5 a 7 cm de largura, elíptico a ovado-reniforme, de pergaminoso a coriáceo, frequentemente com pontuações translúcidas.

Levando-se em conta a importância dos antioxidantes presentes na plantas, na prevenção de danos oxidativos causados pelos radicais livres, este trabalho visa avaliar o conteúdo fenólico, atividade antioxidante, com potencial quelação do íon cobre II e inibição da tirosinase presente no extrato bruto da folha de jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Folhas de *H. Stigonocarpa* foram coletadas em Rio Verde, entre os meses de novembro a fevereiro de 2011. O material foi identificado pelo Ecologista ambiental Claudio Costa Barbosa, professor da Universidade de Rio Verde – GO, onde localiza-se a área de cerrado de preservação ambiental, com as coordenadas 17° 47'17.85"S, 50° 57'57.65"O, elevação 785m. As folhas de Jatobá foram identificadas no Herbário Jataiense (HJ2852).

Preparo dos extratos brutos vegetais

Após a secagem em estufa de circulação forçada a 42°C por dois dias, folhas de *H. Stigonocarpa* foram submetidas à extração com hexano, obtendo o extrato bruto hexânico (E.B.H); compreendendo os compostos fenólicos de caráter apolar. A seguir iniciamos a extração com etanol absoluto, obtendo o extrato etanólico bruto (E.E.B), compreendendo os compostos fenólicos de caráter polar. Os extratos brutos foram concentrados. Todas as etapas de extrações foram conduzidas em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos no extrato bruto etanólico (E.B.E.) e no extrato bruto hexânico (E.B.H.) foi realizado baseado no método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Meda et al., 2005), com algumas modificações.

Uma curva padrão de ácido gálico ($35 - 350 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em etanol foi utilizada para quantificar o teor de compostos fenólicos.

Soluções de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do EBH e EBE em etanol foram preparadas e alíquotas de 0,1 mL foram adicionadas a 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, e 2 mL de solução de bicarbonato de sódio a 15%. Após um período de 2 horas, as observâncias foram medidas em 750 nm.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Avaliação de atividade antioxidante

A ação antioxidante da *H. Stigonocarpa* foi analisada pela capacidade dos antioxidantes presentes na amostra captarem o radical livre DPPH (2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazina), conforme a metodologia descrita por Melo et al. (2006), e controle com BHT. Diferentes volumes das soluções de EBH e EBE a 200 µg.mL⁻¹ foram adicionadas a 4 mL de uma solução da DPPH em etanol (20 µg.mL⁻¹). A solução foi mantida ao abrigo da luz e, após 30 minutos, sua observância foi medida a 517 nm.

Todas as medidas foram feitas em triplicata.

Para avaliar a atividade captadora de radical, foi obtida a porcentagem de inibição, conforme a equação:

$$\% DPPH_{seq} = \frac{Abs(Controle) - [Abs(amostra) - Abs(compensação)]}{Abs(Controle)} \times 100$$

Procedimento para Quelação de íons Cúprico Cu²⁺

Conforme descrito por Khatib (2005) com adaptações, para a quelação de íons cúprico Cu²⁺, foi preparado uma solução padrão de ácido Kójico 1000 ppm uma solução a 1000 ppm do complexante sal diossódico ou do ácido Etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.), solução tampão fosfato (pH 6,8), solução de sulfato cúprico pentahidratado a 1000 ppm e solução do extrato bruto etanólico das folhas de jatobá a 1000 ppm. O espectrofotômetro foi ajustado para leituras de absorvância na faixa entre 260 a 500 nm, com varredura de 5 em 5 nm, em triplicatas utilizando-se cubetas de quartzo. Inicialmente 500 µL da solução do extrato etanólico, 500 µL da solução padrão de ácido kójico e 2 mL da solução tampão fosfato (pH 6,8), foram incubadas. Em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro na faixa entre 260 a 500 nm. Após essa leitura adicionou-se 100 µL da solução de sulfato cúprico pentahidratado, e realizou-se novamente a leitura na mesma faixa de absorvância e por fim adicionou-se 100 µL da solução do complexante E.D.T.A.

e, então novamente fez-se a leitura também na mesma faixa de absorvância, dessa forma sendo possível verificar a formação ou não de quelantes através das medidas de absorvância.

Procedimento para ensaio de inibição de tirosinase

Conforme descrito por Khatib (2005) com adaptações, a enzima tironase de cogumelo e a L-tirosina foram adquiridos da Sigma Chemical e Vetec respectivamente. A enzima tirosinase 2500 U/mL foi diluída em água destilada para 100 mL de solução. As demais soluções foram: solução padrão de ácido Kójico 1000 ppm, solução de extrato etanólico da folha de jatobá a 1000 ppm, solução tampão fosfato pH 6,8 e solução de L-tirosina a 2 mM. De forma geral, 500 µL de tampão fosfato, 2 mL da enzima tirosinase e 50 µL da amostra da solução do extrato etanólico ou sem (etanol no lugar do extrato da folha) e outra com o padrão ácido kójico, foram misturadas, obtendo-se assim 3 soluções testes separadas em triplicata. Depois de 5 minutos, adicionou-se 2 mL da solução 2 mM de L-tirosina. O espectrofotômetro foi ajustado para leitura em absorvância a 475 nm, para duas leituras em função do tempo uma a 30 minutos e outra a 60 minutos.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrão de três ensaios independentes. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR. Dados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Hymenaea* é reconhecido como fonte de compostos fenólicos, sendo que a espécie objeto deste estudo, *H. stigonocarpa* apresentou considerável quantidade desta categoria de substância. A determinação dos conteúdos fenólicos presentes nas amostras de extrato bruto hexânico e extrato bruto etanólico, foram feitas por meio de

espectrofotometria no comprimento de onda a 750 nm, utilizando o método de Folin-Ciocalteu com modificações. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolações da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por gramas de extrato ($\text{Absorv\~{a}ncia} = 0,0012 * \text{mgEAG g}^{-1} - 0,0067$; $R^2 = 0,999$).

Como se pode observar na Tabela 1, o extrato etanólico apresentou maior quantidade de conteúdos fenólicos em relação ao extrato hexânico. De acordo com Lima e colaboradores (2004), os autores concluíram que o broto de feijão-mungo possui considerável quantidade de fenólicos totais, onde a extração foi mais eficiente com o uso de água à temperatura ambiente. O extrato aquoso desse vegetal, com maior teor de fenólicos totais, exibiu ação antioxidante, proporcionando como a sua ingestão efeitos benéficos para a saúde. Observou-se uma relação positiva do conteúdo fenólico se comparada com os extratos brutos etanólicos de frutos da planta *H. courbaril* (Calderon José Contreras et al; 2010), *T. brasilienses*, *C. macrophyllum*, *T. Fagifolia* e *Q. grandiflora* (Sousa et al., 2007).

Tabela 2. Teor de conteúdos fenólicos do extrato bruto extraídos de folhas de Jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne).

Extrato bruto	Fenóis totais (mg EAG g ⁻¹)
Extrato etanólico	235,7 ± 1,9
Extrato hexânico	166,9 ± 4,2

A concentração de 19,1±0,1 ppm da amostra do extrato etanólico bruto que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH, está representada na Tabela 2, e também a concentração de 60,7±0,6 ppm da amostra do extrato hexânico bruto que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH e para o BHT 181± 6 ppm. De acordo com a tabela 2, o extrato bruto etanólico, apresentou um maior poder de seqüestro do radical livre estável DDPH, o que nos permite concluir que os fenólicos de maior atividade antioxidante pertencem ao grupo dos fenólicos hidrossolúveis polares. O extrato

bruto etanólico de folhas de jatobá tabela 2 apresentou maior capacidade de seqüestro do radical livre DPPH do que os extratos brutos etanólicos de folhas das plantas *T. brasiliensis*, *C. macrophyllum*, *T. fagifolia* e *Q. grandiflora* respectivamente (Sousa et al., 2007). Os dados obtidos para a atividade antioxidante pelo método do seqüestro do radical livre DPPH indicam que os compostos secundários com atividade antioxidante concentram-se preferencialmente nos extratos polares (etanólico e aquoso) das folhas de *Solanum paniculatum*, provavelmente tendo como constituintes polifenóis e flavonóides (Ribeiro et al, 2007). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Souza et al., 2007).

Tabela 3. Atividade antioxidante dos extratos brutos de folhas de Jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % (ppm).

Extrato bruto	Quantidade do extrato bruto folha (ppm)
Extrato etanólico	19,1 ± 0,1 a
Extrato hexânico	60,7 ± 0,6 b
BHT	181 ± 6 c

Letras minúsculas iguais indicam equivalência estatística pelo SISVAR.

Ambos ao nível 5% de significância.

O ácido kójico 5 hidroxil- 2 hidroximetil - 4 pirona, é uma substância natural produzida por fungos e bactérias, de propriedades antimicrobianas e com excelente poder de quelação de íons cúprico (inativação da tirosinase) e conseqüentemente pela ação inibitória da formação da melanina. O poder inibitório do ácido kójico é do tipo competitivo, ou seja, quela o íon cúprico do sítio ativo da enzima, provocando assim o desarme da enzima tirosinase. Dessa forma nos permite deduzir que o poder inibitório apresentado nesse trabalho de pesquisa com fenólicos extraídos de folhas de Jatobá do cerrado tem

poder de inibição da tirosinase não competitivo segundo os dados da tabela 3. A pigmentação da pele depende da natureza química da melanina, da atividade da tirosinase nos melanócitos e da transferência da melanina aos queratinócitos vizinhos (Gonchoroski & Côrrea, 2005).

Tabela 3. Efeito inibitório dos extratos brutos de folhas de Jatobá do Cerrado (*H. Stignocarpa* Mart.) sobre a atividade da enzima tirosinase.

	Enzima pura (Ativação)	Enzima + extrato etanólico bruto folha (inibição)	Enzima + ácido kójico (inibição)
Após 60 minutos	100 % a	48 % b	-2 % c

Letras minúsculas iguais indicam equivalência estatística pelo SISVAR.
Ambos ao nível 5% de significância.

CONCLUSÃO

Os estudos realizados com o extrato bruto etanólico e hexânico, obtidos das folhas de Jatobá do cerrado, demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi mais elevado no extrato bruto etanólico o que explicaria a maior ação captadora do radical livre DPPH, por compostos fenólicos hidrossolúveis da classe de substâncias polares, provalmente tendo como constituintes polifenóis e flavonóides.

Os resultados obtidos nesta pesquisa servirão como referência para as futuras investigações relacionadas à utilização de extratos vegetais de plantas do cerrado para o tratamento de doenças relacionadas à hiperpigmentação da pele, uma vez que clareadores de custo benefício baixo como é o caso da hidroquinona, que requer cuidados especiais na sua utilização, por outro lado o ácido kójico com ação potente clareadora e alto poder de inibição da tirosinase, porém possui custo benefício de purificação altíssimo.

O bioma cerrado com uma biodiversidade riquíssima em fauna e flora vem sendo descaracterizado a passos largos, correndo-se o risco de alguma espécie vegetal ser

extinta sem ao menos de se conhecer o seu verdadeiro potencial fitoquímico com poderes de curas de doenças.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - *Campus* Rio Verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GONCHOROSKI, D.D.; CÔRREA, G.M. Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Infarma**, v.17, n. 3/4, p. 84-88, 2005.

CALDERON; José Contreras; Lilia Calderón-Jaimes; Eduardo Guerra-Hernández ; Belén García-Villanova. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia, p. 3, 2010.

KHATIB, S.; NERYA, O.; MUSA, R.; SHMUEL, M.; TAMIR, S.; VAYA, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2, 4-substituted resorcinol moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.13, p. 433-441, 2005.

LIMA, V.L.A.G. et al. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 53-57, 2004.

Meda et al. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem**, v. 91, p. 571-577.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p. 639-644, 2006.

RIBEIRO, S.R. et al. Avaliação da atividade antioxidante de *solanum paniculatum* (*solanaceae*). **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 11, n. 3, p. 179-183, 2007.

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

CONCLUSÃO GERAL

Os estudos realizados com os extratos brutos etanólico e hexânico, obtidos das folhas de jatobá do cerrado, demonstraram que a concentração de compostos fenólicos foi mais elevada no extrato bruto etanólico; o que explicaria a sua maior ação captadora do radical livre DPPH e com poder inibitório sobre a enzima tirosinase.

Isto indica a presença de polifenóis hidrossolúveis polares no extrato bruto etanólico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Extrair taninos hidrossolúveis da resina, folhas e fazer procedimento de quelação com íons cúpricos e procedimentos inibitórios da enzima tirosinase.