



**ESTADO DE MINAS GERAIS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**



---

**LUCIENE BARBOSA DA ROCHA**

**FRACIONAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
FOTOPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DO FRUTO DO  
PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense Camb.*)**

**Montes Claros  
Março de 2011**

**LUCIENE BARBOSA DA ROCHA**

**FRACIONAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE  
E FOTOPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DO  
FRUTO DO PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense Camb.*)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Montes Claros.

**Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aclécio Melo**

**Montes Claros, Minas Gerais  
2011**

## AGRADECIMENTO

A Deus, por nos dar esta vasta natureza com uma infinidade de mistérios a serem desvendados.

Aos meus pais, que em todo momento me deram o apoio necessário pra chegar até aqui. Aos meus irmãos e cunhados, pelo entendimento e pelo apoio nos diversos momentos em que precisava estar isolada por causa dos estudos.

Aos meus sobrinhos, que compreenderam, com tão pouca idade, os momentos em que não pude estar com eles e por renovarem a alegria de nossa família.

Ao meu noivo – quase marido – por simplesmente ser um homem incrível, companheiro e por fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Aclécio, pela paciência e dedicação ao trabalho que nos propusemos a realizar. E por me ensinar a prestar atenção nos detalhes.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas de Unimontes, pelos ensinamentos e por terem tornado possível a realização deste sonho.

Aos amigos de laboratório, presentes e aos que já passaram, pelo auxílio, pelos momentos de companheirismo e amizade.

A Prof. Dr. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa da Universidade Federal de Alfenas, por permitir que eu realizasse parte dos meus experimentos em seu laboratório.

A pesquisadora Ilka Nacif de Abreu do Scottish crop research Institute, SCRI, pelas análises em sistema LC-MS.

Aos meus amigos de trabalho, da E.E. Fernão Dias, por respeitarem este momento e me apoiarem no que foi necessário.

Enfim, a todos aqueles – amigos e familiares – que de alguma forma tornaram possível a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	v
<b>Lista de Tabela</b> .....	vi
<b>Abreviaturas</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Material e Métodos</b> .....	7
2.1. Obtenção e preparo do material de estudo .....	7
2.2. Preparo do extrato etanólico.....	7
2.3. Quantificação do rendimento dos extratos .....	8
2.4. Avaliação da Atividade Antioxidante .....	8
2.5. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais .....	9
2.6. Fracionamento do extrato.....	10
2.7. Cromatografia em camada delgada .....	10
2.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	11
2.9. Identificação da composição química da fração de maior pureza.....	11
2.10. Avaliação da Capacidade Fotoprotetora .....	11
2.11. Avaliação da Citotoxicidade .....	12
2.12. Quantificação de Ácido Gálico, composição centesimal da casca do fruto e rendimento de massa seca da casca do fruto .....	14
2.13. Análise Estatística .....	15
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	16
3.1. Determinação de compostos fenólicos e fracionamento do extrato.....	16
3.2. Avaliação da Atividade Antioxidante .....	21
3.3. Avaliação da Atividade Fotoprotetora e efeito Citotóxico .....	24
3.4. Potencial de uso da casca do fruto do pequi .....	28
<b>4. Conclusão</b> .....	30
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	31

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Atividade Antioxidante m função da concentração do Extrato Bruto Seco (A) e Extrato Bruto Fresco (B)..... 17
- Figura 2: Cromatograma em camada delgada contendo as frações 4, 5, 6 7, 8 e 9 obtidas na cromatografia em coluna de sílica gel., respectivamente. Fase móvel: butanol:água:ácido acético (75:9:6). Revelação em vapor de iodo..... 18
- Figura 3: Perfil cromatográfico obtido por cromatografia liquide de alta eficiência de amostras do extrato bruto (A) e frações (fração 4 – B e fração 5 – C) do extrato etanólico da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). ..... 19
- Figura 4: Espectro de massa obtido em sistema LC-MS feito para amostra da fração mais pura obtida da casca do fruto do pequi (A) e ácido gálico comercial (B). ..... 20
- Figura 5: Atividade Antioxidante em função da concentração de ácido fállico comercial (A), da fração 4 (B), da quercetina (C) e do extrato bruto (D)..... 23
- Figura 6: Porcentagem de morte celular de células MCF-7, quando colocadas em contato com a fração, o extrato bruto e o ácido gálico comercial em diferentes concentrações, por 24 e 48 horas. A – ácido gálico (24h), B – ácido gálico (48h), C – extrato bruto (24h), D – extrato bruto (48h), E – Fração 4 (24h) e F – fração 4 (48h). ..... 26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – CE <sub>50</sub> das amostras testadas com seus respectivos intervalos de confiança .....	23
Tabela 2 – Fator de Proteção Solar das amostras testadas com seus respectivos intervalos de confiança.....	24
Tabela 3: DL <sub>50</sub> – em µg/mL – a células MCF-7 para o ácido gálico comercial, a fração 4 e o extrato bruto. ....	27

## RESUMO

O pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.) é encontrado em quase todo o Cerrado brasileiro, sendo uma importante fonte de renda para as populações nativas. Novas pesquisas têm revelado no pequi, importância farmacológica e nutricional dado ao alto teor de compostos fenólicos. Tendo em vista agregação de conhecimento, valorização da biodiversidade nacional e identificação do potencial de plantas com possível ação antioxidante e fotoprotetora, este trabalho objetivou fracionar e avaliar o potencial antioxidante e fotoprotetor do extrato hidroetanólico da casca do fruto do pequi e traçar perspectivas para ampliação da exploração da espécie. Para isso, foram realizadas extrações, purificações e quantificações de substâncias com essas propriedades. Inicialmente, através do uso de técnicas cromatográficas e de partição líquido-líquido foram realizadas a purificação e identificação da principal substância antioxidante. Posteriormente foram realizados ensaios para avaliar a capacidade antioxidante por meio da redução do radical DPPH, a capacidade fotoprotetora pela determinação do fator de proteção solar e o efeito citotóxico em meio de cultivo de células cancerígenas. Conforme análise por espectrometria de massa a principal substância encontrada na fração de melhor atividade antioxidante é o ácido gálico, sendo observada uma CE50 para atividade antioxidante de 2,85 µg/mL. O fator de proteção solar da fração mais pura obtida a partir da casca do fruto do pequi foi de 14,43, sendo o melhor fator obtido dentre as substâncias testadas. Em ensaio de citotoxicidade a células cancerígenas esta fração mostrou DL<sub>50</sub> de 0,3852 µg/mL para exposição por 24 horas e 0,2547 µg/mL para exposição por 48 horas. Em estimativa de produção de ácido gálico pela exploração das cascas dos frutos de pequis em um hectare de Cerrado nativo, foi possível obter aproximadamente 1,95 kg dessa substância, o que renderia, sem considerar custos, aproximadamente R\$1.950,00. Com isso, foi possível identificar o ácido gálico como substância presente na casca do fruto do pequi em quantidades consideráveis e que possui propriedades antioxidante e de fotoproteção. Assim, reforça-se potencialidades do pequi, sobretudo a partir da exploração da casca do fruto, que atualmente é considerado um resíduo e demonstra que outras formas de exploração de áreas nativas de Cerrado tem potencial para ser tão lucrativas quanto à sua exploração para produção agrícola.

Palavras Chave: Pequi, antioxidante, fotoprotetor, ácido gálico, citotoxicidade.

## ABSTRACT

The tree Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) is found in almost all of the Brazilian Cerrado, being an important source of income for the local populations. New researches have revealed its pharmacological and nutritional importance, due to its high level of phenolic contents. With the goal of knowledge aggregation, valorization of national biodiversity and identification of the potential of plants with possible antioxidant and photo-protecting action, this work had as its goals to fractionate and evaluate the antioxidant and photo-protecting potential of the hydroethanolic extract of the Pequi fruit peel, and to trace perspectives for the amplification of the exploration of this species. To that effect, there were performed extraction, purifications and quantifications of substances with those properties. Initially, the main antioxidant substance was identified through the use of chromatographic techniques and liquid-liquid separation. Afterwards there were performed trials to evaluate the antioxidant capacity through the reduction of the DPPH radical, the photo-protecting capacity through determination of the solar protection factor and cytotoxic effect in cancer cells culture. According to spectrometry mass analysis, the main substance found on the fraction with better antioxidant activity is Gallic acid, being observed a  $CE_{50}$  for an antioxidant activity of 2.85  $\mu\text{g/mL}$ . The solar protection factor of the purest fraction obtained from the Pequi fruit peel was 14.43, being the best factor among the tested substances. On the cytotoxicity trial, the cancer cells showed  $DL_{50}$  of 0.3852  $\mu\text{g/mL}$  in a 24-hour exposure time and 0.2547  $\mu\text{g/mL}$  in 48-hour exposure time. In an estimation of Gallic acid production through the exploration of the Pequi fruit peel in one hectare of native Cerrado, it was calculated to be possible to obtain approximately 1.95 kg of that substance, which would provide, not considering costs, about R\$ 1.950,00. Therefore, it was possible to identify the Gallic acid as a substance present on the shell of the Pequi fruit in considerable quantities, and that it possesses antioxidant and photo-protecting properties. So, the potentialities of the Pequi tree are reinforced, especially from the exploration the fruit peel, which is currently considered a residue. It was also shown that other ways of exploration of the native areas of Cerrado have potential for being as lucrative as its exploration for agricultural production.

Keywords: Pequi, antioxidant, photo-protector, Gallic acid, cytotoxicity.



## 1. INTRODUÇÃO

Juntamente com o cenário atual da bioprospecção, faz-se necessário sistematizar o estudo de espécies com características importantes para a prevenção e tratamento de doenças que preocupam a população humana. O uso de antioxidantes tem se tornado de grande importância na preparação de alimentos funcionais e como aditivos para produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios (Lindley, 1998; Silva, 2004; Roesler, et al. 2007). Tradicionalmente, antioxidantes sintéticos são usados para estes fins, no entanto, estes compostos têm demonstrado potencial deletério à saúde humana. Assim, o uso de antioxidantes naturais é uma alternativa e a sua busca tem sido atualmente incentivada (Roesler, et al., 2007).

Antioxidantes são substâncias que, presentes em pequenas concentrações comparadas com aqueles substratos oxidantes, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes níveis da sequência oxidativa (Halliwell, 1995). Efetivamente atuam na inibição ou redução das lesões causadas pelos radicais livres gerados nas células (Bianchi, et al., 1999; Kuss, 2005; Andrade, 2007). A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica cumprindo funções biológicas essenciais (Lima, 2008). O termo radical livre é usado para designar qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Estas estruturas são altamente reativas, instáveis, com meia-vida curtíssima, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa (Bianchi, et al., 1999; Batello, 2002; Farinatti, 2002).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes (Sousa, et al., 2007). Os antioxidantes podem ser classificados em primários, que atuam como doadores de prótons e impedem o processo de iniciação

da oxidação desencadeado pelos radicais livres (Bravo, 1998), ou secundários, que bloqueiam a decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos e converte-os na forma inativa (Donnelli & Robinson, 1995). Os antioxidantes são ainda separados em enzimáticos ou não enzimáticos (Kuss, 2005; Asolini, et al., 2006). Dentre os enzimáticos tem-se as enzimas Glutationa-Peroxidase, Catalase, Metionina, Redutase e Superóxido-Dismutase (Sousa, et al., 2007) e os não enzimáticos os fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocofenóis, fosfolipídeos, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos, esteróis (Gil, et al., 2005; Melo, et al., 2006; Roesler, et al., 2008). Em plantas, os principais antioxidantes mais destacados são os compostos fenólicos (Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

Apesar do uso terapêutico de plantas ser tão antigo quanto à própria espécie humana, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente (Silva, et al., 2005). A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais aumentou consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males (Degáspari, 2004). Observa-se nas últimas décadas grande crescimento da investigação científica nessa área, envolvendo o efeito de extratos brutos, frações purificadas ou de componentes isolados (Silva, et al., 2005).

A preocupação com relação à proteção da pele contra a radiação solar é notável, e, por isso, há uma grande divulgação para o uso das preparações que contêm filtros capazes de impedir os efeitos dos raios solares. Mesmo assim, o número de pessoas que utilizam fotoprotetores como forma de proteção nas atividades diárias de lazer e trabalho, é muito restrito, haja vista o aumento de novos casos de câncer de pele em todo o mundo (Sousa, 2008).

O amplo espectro de radiação eletromagnética emitida pelo sol é desviado ou

atenuado pelas camadas atmosféricas da Terra. As radiações que chegam à superfície são classificadas como não-ionizantes e subdivididas em infravermelho, visível e ultravioleta (UV) (Kirchoff, 1995). A radiação emitida pelo sol, entre 100 e 400 nm, denominada de ultravioleta, é dividida em UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm), as quais são componentes da luz solar com menores comprimentos de onda (Rangel & Corrêa, 2002). A radiação UVC é absorvida pelo oxigênio e pelo ozônio na estratosfera, enquanto que apesar de representarem uma baixa porcentagem da luz solar que atinge a superfície da Terra, as radiações UVB e UVA são importantes do ponto de vista biológico, pois podem causar diversos efeitos como, por exemplo, o desencadeamento de estresse oxidativo às células (Friedberg & Henningk, 1993). Estas radiações podem ser danosas a várias biomoléculas como, por exemplo, DNA, proteínas e lipídeos, causando disfunções estruturais e funcionais (Lowe, et al., 1997).

A absorção de fótons por moléculas endógenas fotossensibilizantes acarreta reações em cadeia com o oxigênio resultando na formação de diferentes espécies de oxigênio reativas (Lim, et al., 1999). Altos níveis dessas espécies reativas no organismo, através de um estresse oxidativo elevado nas células da pele, resultarão em danos genéticos temporários e permanentes e na ativação de processos citoplasmáticos referentes ao crescimento, diferenciação, replicação sem controle e degradação do tecido conectivo (Podda, 1998; Mancek & Pecar, 2001). A pele é a estrutura que faz a interface entre o corpo e o meio ambiente, por isso, é ela quem está constantemente exposta à radiação UV, acreditando-se ser este o maior mediador exógeno de danos. Diversos fatores devem ser considerados quando se avaliam os efeitos da radiação UV na pele, tais como o comprimento de onda incidente, a dose e características cutâneas como a susceptibilidade genética individual (Heck, et al., 2004).

Uma das alternativas consideradas terapêuticas e profiláticas para a redução

dos danos da radiação UV, é o uso de antioxidantes por via tópica ou oral, que podem auxiliar os sistemas endógenos de proteção da epiderme, além de contribuir para prevenção de problemas a longo prazo (Steenvoorden & Henegouwen, 1997). Os fotoprotetores, por sua vez, atuam de maneira preventiva ao tecido cutâneo. Estes podem ser classificados como “químicos”, ou seja, moléculas fotoestáveis e que possuem grupos cromóforos que absorvem a radiação ou “físicos”, que atuam como uma barreira mecânica e impedem assim a penetração da radiação na pele. Formulações fotoprotetoras podem também conter compostos que atuam sinergicamente na pele, como é o caso de antioxidantes como a vitamina E. A vitamina E, ao ser utilizada em produtos para proteção solar, dependendo da sua formulação, pode aumentar o fator de proteção solar *in vivo*. Assim como a vitamina E, outras substâncias e mistura delas, sintéticas ou de origem natural, vêm sendo amplamente estudadas, na busca da otimização dos protetores solares, ou visando ainda à busca de novas moléculas para a ampliação da lista de substâncias fotoprotetoras aprovadas (Guaratini, et al., 2007).

O pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb. – Caryocaraceae) também conhecido como piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerim e suari (Silva, et al., 2001) é uma espécie de ampla distribuição no Cerrado brasileiro, ocorrendo nos Estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (Almeida, 1998). É uma planta de grande importância ecológica, econômica, cultural e social, sendo muito explorada pela população nativa. Pela sua importância é protegida pela legislação e, atualmente, pela divulgação de seus produtos e potencialidades, tem sido foco de investigação em diversas áreas de estudo. Sua principal exploração é o uso de seus frutos na culinária e na indústria agrícola para extração de óleos e produção de licores (Chéves, 1997). Dentro da medicina popular, existem relatos

do uso no tratamento de problemas respiratórios, como afrodisíaco, energético e supressor de avitaminoses (Araujo, 1995). O óleo da polpa tem efeito tonificante, além de atuar contra bronquites, gripes, resfriados e no controle de tumores e as folhas são consideradas adstringentes e estimulantes da produção da bÍlis (Brandão, et al., 2002).

O potencial antioxidante de extratos de folhas e frutos do pequi é destacado em vários estudos (Roesler, et al, 2007; Roesler, et al., 2008; Khouri, et al., 2007; Lima, 2008). É destacada a presença de carotenóides, que estão presentes em quantidades consideráveis na polpa, e de compostos fenólicos, que de forma semelhante a outras plantas, são citados como principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante observada para a polpa, casca e castanha do fruto (Roesler, et al., 2008; Porto, et al., 2008).

Porto e colaboradores (2008) em estudo onde foi avaliado o melhor solvente de extração de antioxidantes presentes no pequi e considerando a natureza química das substâncias responsáveis pela ação antioxidante, observaram que compostos fenólicos representam grande porção de extratos etanólicos de folhas e mesocarpo, podendo chegar a aproximadamente 250 mg/g do extrato seco, representando isso, cerca de 5% da massa seca destas partes da planta. Freire (2008) avaliou o potencial antioxidante em frações semi-puras do extrato etanólico do mesocarpo externo e epicarpo, considerado a casca do fruto do pequi e observaram, em duas frações analisadas, elevada capacidade antioxidante. De acordo com o autor, considerando que o mesocarpo externo e o epicarpo representa a maior parte na composição do fruto do pequi, aproximadamente 75% (Roesler, et al., 2007) e considerando que esta parte é geralmente desprezada, uma importante fonte de antioxidantes está sendo desconsiderada. Explorar o mesocarpo externo e o epicarpo (casca) do fruto seria, portanto, uma possibilidade de valorização da planta, bem como uma forma de agregar valor econômico e científico à espécie. A

exploração do pequi é a principal fonte de renda para muitas famílias durante a safra e a valorização da planta é, portanto, também uma expectativa de melhorias de condições de vida para estas famílias.

Tendo em vista a agregação de conhecimento, a valorização da biodiversidade nacional e identificação do potencial de plantas com possível ação antioxidante e fotoprotetora, este trabalho teve foco no pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) e objetivou fracionar e avaliar o potencial antioxidante e fotoprotetor do extrato hidroetanólico da casca (mesocarpo externo e epicarpo) do fruto do pequizeiro e traçar perspectivas para ampliação da exploração dessa planta.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção e preparo do material de estudo**

Frutos de pequi foram adquiridos no mercado local da cidade de Montes Claros-MG, dos quais foram selecionados aqueles com o epicarpo aparentemente saudável. Em laboratório, os frutos foram cortados e as cascas (mesocarpo externo e epicarpo) separadas e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 45°C. Após secagem, as cascas foram trituradas até obtenção de pó fino (300 mesh), sendo esta a matéria seca a ser trabalhada. Para ensaios de otimização da extração das substâncias, também foram utilizadas cascas frescas, que até o uso foram armazenadas em freezer -20 °C.

### **2.2. Preparo do extrato hidroetanólico**

Todo procedimento foi realizado conforme Melo (2009). Em estudos anteriores o extrato etanólico foi determinado como sendo o melhor para recuperação de substâncias antioxidantes a partir de folhas e frutos do pequi (Porto, 2008). A extração foi realizada em erlemeyer onde foi adicionado o material triturado (casca) e etanol 80% como solvente de extração na proporção de 20 gramas de material para 200 mL de solvente. Quando se utilizou a casca fresca a proporção foi de 20 gramas de material para 200 mL de solvente. Após um período de 24 horas de extração sob agitação periódica, a mistura foi filtrada e o filtrado considerado o extrato hidroetanólico bruto.

Para procedimentos de fracionamento líquido-líquido o extrato bruto foi colocado em estufa de ar circulante a 45° C para redução do volume e, em seguida, adicionou-se água destilada na proporção de 50 mL de água para 100 mL de extrato. Este procedimento foi realizado para que se proporcionasse melhor partição durante o fracionamento. Para quantificação do rendimento e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora, do efeito citotóxico, foram preparados extratos brutos que após filtragem foram colocados para secar em estufa com circulação forçada de ar, a 45°C. Os procedimentos de extração foram realizados em triplicata.

### **2.3. Quantificação do rendimento dos extratos**

O rendimento de cada extrato foi obtido por meio da divisão da massa dos extratos secos pela quantidade de material triturado utilizada para extração, sendo expresso em percentagem da massa seca de material utilizado.

### **2.4. Avaliação da atividade antioxidante**

A atividade antioxidante de cada extrato foi avaliada pelo ensaio de redução do DPPH•, desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand-Willian e colaboradores (1995), que tem por base a redução do radical [2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)], que ao fixar um H• (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, processo que permite calcular após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir o radical DPPH•. Ensaio com DPPH são considerados eficientes na pesquisa de atividade antioxidante, por ser um agente de baixo custo, de fácil manuseio e fornece teste



rápido e reprodutível (Perez, 2004).

No procedimento, os extratos secos foram dissolvidos em diferentes concentrações e uma alíquota de 100 µL foi adicionada a 3 mL de solução de DPPH na concentração de 40 µg/mL diluído em etanol. Após 30 minutos de reação, sob abrigo de luz, procedeu-se a leitura das absorvâncias a 517 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (DPPH sem antioxidante). Como branco utilizou-se o etanol.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada pela equação:  $\%AA = ((\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra}) / \text{Abs. Controle}) \times 100$  – onde: Abs. Controle = absorvância do controle (solução de DPPH sem antioxidante) e Abs. Amostra = absorvância da amostra (extrato) a ser testada (Melo, et al., 2006).

## **2.5. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais do extrato etanólico da casca do fruto do pequi foi determinado com utilização do reagente de Folin-Ciocalteu (Swain & Hillis, 1959). Em um tubo de ensaio adicionou-se 20 µL do extrato, 3 mL de água destilada e 250 µL do reagente. Em seguida o tubo foi agitado e após 3 minutos adicionou-se 500 µL de solução supersaturada de carbonato de sódio. Os tubos foram agitados e o volume completado para 5 mL. Após tempo de reação de 1 hora procedeu-se leitura da absorvância a 625 nm. Para cálculos foi construída uma curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/g de massa seca de casca.

## **2.6. Fracionamento do extrato**

Inicialmente foi realizada partição líquido-líquido do extrato com utilização do hexano como solvente. Neste procedimento, ao extrato preparado conforme descrito anteriormente (item 2.2) foi adicionado hexano em igual volume e foi procedida a lavagem em funil de separação, sendo coletada a fração hidroetanólica. Foram procedidas três lavagens sucessivas e ao final as três frações hidroetanólicas obtidas foram colocadas para secar em estufa de ar circulante a 45° C.

Em prosseguimento ao fracionamento, a fração seca foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, com eluição em gradiente crescente de acetato de etila e metanol. Foram coletadas 10 frações de 20 mL, as quais foram monitoradas pela atividade antioxidante por meio da avaliação da capacidade de redução do radical DPPH, conforme descrito no item anterior. As frações de maior atividade foram avaliadas em cromatografia de camada delgada e em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para verificação do grau de pureza das mesmas.

## **2.7. Cromatografia em camada delgada**

Foram preparadas placas com Sílica Gel G 60 F 254 (Vetec) que foram ativadas por 2 horas em estufa a 100°C. Após aplicação das frações de maior atividade antioxidante foi realizada corrida em mistura de butanol:água:ácido acético (25:3:2). Para visualização das bandas as placas foram reveladas em vapor de iodo.

## **2.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

As frações de maior pureza, observadas na cromatografia de camada delgada, foram submetidas a corridas cromatográficas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi utilizado sistema (High Performance Liquid Chromatography) HPLC marca Waters, equipado com detector de arraste de diodo, operando de 190 a 400 nm. A separação dos componentes das frações foi obtida com uso da coluna de fase reversa, coluna C18 Microsorb (5 µm, 4,6 x 250 mm) em corridas de 15 minutos, com fluxo de 0,8 mL/minuto, como fase móvel gradiente de ácido fórmico 0,5% (solvente A) e acetonitrila com 0,5% de ácido fórmico (solvente B) na seguinte programação: 0-2 minutos (80% de A e 20% de B), 2-5 minutos (saindo de 80% de A e 20% de B e chegando a 100% de B), 5-8 minutos (mantendo 100% de B), 8-15 minutos (80% de A e 20% de B).

## **2.9. Identificação da composição química da fração de maior pureza**

Neste procedimento, a fração de maior pureza, observada nos procedimentos cromatográficos (camada delgada e CLAE), foi avaliada por espectrometria de massas. Amostras do extrato bruto e da fração mais pura obtida no fracionamento foram encaminhadas ao Scottish Crop Research Institute, SCRI, Grã-Bretanha, onde foram analisadas em sistema LC-MS (Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas).

## **2.10. Avaliação da capacidade fotoprotetora**

A capacidade fotoprotetora do extrato bruto e da fração de maior pureza

obtida foi avaliada por meio do fator de proteção solar (FPS) que foi determinado conforme Mansur et al., 1986. Foram preparadas soluções na concentração de 100 mg/mL e as soluções foram utilizadas para leituras espectrofotométricas na faixa de 290 a 320 nm. As absorvâncias obtidas foram utilizadas para obtenção do FPS espectrofotométrico com utilização da equação:

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

Onde, FC = fator de correção (10), determinado de acordo com os dois filtros solares de FPS conhecidos e testados em seres humanos de tal forma que um creme contendo 8% de homossalato originasse um FPS = 4 (Mansur, et al., 1986);  $EE(\lambda)$  = efeito eritemogênico da radiação;  $I(\lambda)$  = intensidade do sol;  $abs(\lambda)$  = leitura espectrofotométrica da absorvância da solução do filtro solar. Os valores de  $EE(\lambda)$  e  $I(\lambda)$  utilizados para o cálculo do FPS foram os mesmos usados na literatura.

Para comparação, também foram calculados os FPS para as soluções de: ácido gálico, Silasoma®, dióxido de Titânio, filtro solar (FPS 15), filtro solar (FPS 30), mistura de filtro solar (FPS 15) com a fração mais pura (1:1) e mistura do filtro solar (FPS 30) com a fração mais pura (1:1).

## **2.11. Avaliação da Citotoxicidade**

O efeito citotóxico do ácido gálico comercial, do extrato bruto e da fração de maior pureza obtida foi avaliado por meio da inibição do crescimento de células cancerígenas. Foram utilizadas células de adenocarcinoma de mama humano linhagem MCF-7. No procedimento, foram selecionadas células com crescimento

visível ao microscópico e o meio e as células sobrenadantes foram removidos. Em seguida, aplicou-se 3 mL de tripsina e deixou agir por oito minutos. Após os oito minutos foram adicionados 2 mL de soro (fator  $\alpha$ 1 anti-tripsina) mais 1 mL de meio para inativar a ação da tripsina. As células foram transferidas para um tubo falcon e o meio foi removido. Em seguida, os tubos falcon foram levados para a centrífuga a 900 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e logo após foi feita a ressuspensão das células que foram colocadas em microtubos de 2mL.

Transferiu-se 25  $\mu$ L de células para um microtubo e neste adicionou-se 25  $\mu$ L de corante azul de tripan e 200  $\mu$ L de PBS (Phosphate Buffer Solution). O conteúdo foi aplicado na câmara de Neubauer e após dois minutos a câmara foi levada para o microscópio onde foi feita a contagem de células. Em seguida, as células foram transferidas para microplacas (3,5  $\mu$ L de células e 196,5  $\mu$ L de meio de cultivo), deixadas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas à 37°C. Depois de haver aderência e proliferação foram adicionados 5  $\mu$ L de soluções do extrato bruto e da fração mais pura obtida nas concentrações de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 e 50  $\mu$ g/mL. O mesmo procedimento foi feito com o ácido gálico e as placas foram mantidas por 24 horas na estufa de CO<sub>2</sub> a 5%.

Após 24 horas o meio foi retirado e foram aplicados 10  $\mu$ L de Neutral Red (NR) e 190  $\mu$ L de meio em cada poço e as microplacas foram levadas ao freezer por quatro horas. Após este período o meio foi novamente removido e aplicou-se 200  $\mu$ L de PBS, que foi removido logo em seguida com papel toalha. Adicionou-se então 200  $\mu$ L de solução ácido acético:etanol (1:50) e após vinte minutos a solução foi homogeneizada com uma pipeta e foram feitas leituras em leitora de microplacas a 540 nm. Outras placas foram preparadas para avaliações após 48 horas de incubação. Com os valores obtidos na absorbância, calculou-se a porcentagem de inibição da

viabilidade celular:

$$X = \frac{Abs(amostra) \times 100}{Abs (controle)}$$

$$\% \text{ de inibição} = 100 - X$$

## **2.12. Quantificação de ácido gálico, composição centesimal da massa do fruto e rendimento de massa seca da casca do fruto**

Para avaliar o potencial de uso da casca do fruto de pequi foi analisado o teor da substância identificada na fração de maior pureza obtida (ácido gálico) e estimado a produção dessa substância a partir de frutos coletados em área de 1 hectare.

A quantificação da substância foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência usando procedimento conforme descrito no item: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Como padrão utilizou-se ácido gálico comercial de alta pureza.

A determinação da composição centesimal da massa do fruto e da massa seca da casca foi obtida a partir de 100 frutos, cujas cascas foram individualmente pesadas em seguida colocadas para secar. Foi calculada a massa média das cascas em relação à massa média dos frutos e os dados expressos em percentagem. A massa seca média das cascas foi obtida após completa secagem em estufa de ar circulante e foi expressa em percentagem da massa fresca da casca.

A estimativa da produção de ácido gálico foi feita a partir da determinação da composição percentual da massa fruto que representa a casca, da determinação da massa seca da casca do fruto e da estimativa de produção de frutos por hectare de Cerrado nativo conforme dados da literatura.

### **2.13. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  intervalo de confiança (n = 3) para cada extrato e fração testada. O tratamento estatístico dos dados foi realizado por análise de Modelos Lineares Generalizados (GLM) e posteriormente a análise de variância (ANOVA) e Regressão Linear, com utilização do software R 2.9.2. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Determinação de compostos fenólicos e fracionamento do extrato**

Extratos da casca (mesocarpo externo e epicarpo) do fruto do pequi apresentam níveis consideráveis de compostos fenólicos. Níveis de  $265,48 \pm 1,66$  e  $209,37 \pm 3,57$  mg/g de massa seca do extrato foram observados, respectivamente por Porto (2008) e Roesler, et al. (2007). Os compostos fenólicos são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos (Heim, et al., 2002). Neste trabalho, para o extrato da casca seca foi observado um teor de compostos fenólicos totais de 90 mg de equivalente de ácido gálico/g de casca seca.

Em vários estudos com extratos vegetais os níveis de compostos fenólicos têm sido relacionados à atividade antioxidante, sendo observada uma relação direta com esta característica (Antolovich, et al., 2004; Souza, et al., 2007). Compostos fenólicos são importantes antioxidantes que sequestram radicais livres e, algumas vezes, agem como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação e na propagação do processo oxidativo (Ramalho & Jorge, 2006). Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes naturais de fontes vegetais encontrados nos cereais e frutas são os fatores que mais contribuem para a redução significativa da incidência de doenças crônicas e degenerativas (Roesler, et al., 2007; Sousa, et al., 2007; Khouri, et al., 2007).

Neste estudo, extratos etanólicos feitos a partir da casca fresca e seca foram avaliados quanto à atividade antioxidante (figura 1) e apresentaram  $CE_{50}$  pela capacidade de redução do radical DPPH de, respectivamente:  $18,65 \mu\text{g/mL}$  e  $14,58$



$\mu\text{g/mL}$ . Pela análise de regressão linear (figura 1), observa-se que a atividade antioxidante é dependente da concentração dos antioxidantes presentes no meio de reação. Deste modo, na medida em que se aumenta a concentração dos antioxidantes no meio de reação, sua capacidade em sequestrar radicais livres também é aumentada. Roesler et al. (2007, 2008); Lima (2008) e Porto (2008) também verificaram dependência da atividade antioxidante em relação à concentração de antioxidantes

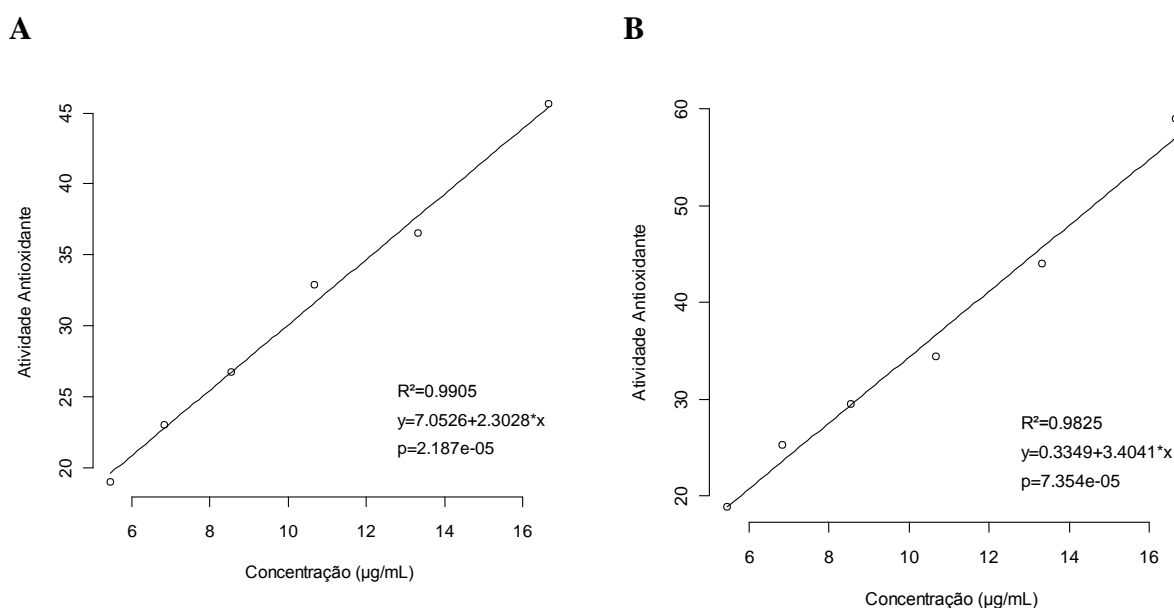


Figura 1: Atividade Antioxidante em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) do Extrato Bruto Seco (A) e Extrato Bruto Fresco (B).

presentes em extratos do pequi. Dentre os compostos antioxidantes presentes no pequi observados por estes autores, destacam-se os carotenóides e os compostos fenólicos. Para a casca do fruto, Roesler et al., (2008) e Porto (2008), destacam dentre os compostos fenólicos, ácido gálico, ácido quínico e flavonóides.

Os rendimentos para os dois tipos de extratos – seco e fresco – foram de, respectivamente, 8,1% e 8,05%. Portanto, baseando na  $CE_{50}$  e no rendimento dos extratos, a diferença estatística entre os resultados é insignificante, por isso, a secagem

das cascas seria desnecessária para a recuperação de compostos com atividade antioxidante presentes na casca do fruto do pequi.

O fracionamento do extrato foi realizado por partição líquido-líquido em hexano com posterior procedimento cromatográfico em coluna de sílica gel. Na figura 2 é apresentado o cromatograma das frações com maiores atividades antioxidantes obtidas. Observa-se que as frações 4 e 5 apresentaram maior pureza (banda única) e foram utilizadas para corridas em CLAE para confirmar a presença de

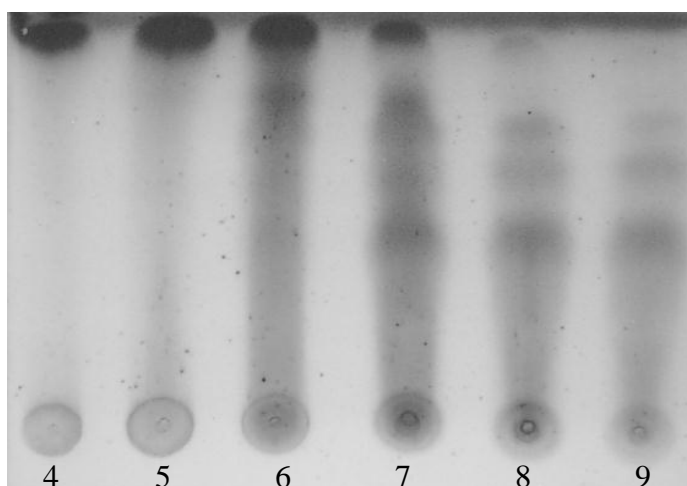


Figura 2: Cromatograma em camada delgada contendo as frações 4, 5, 6, 7, 8 e 9 obtidas na cromatografia em coluna de sílica gel. Extrato feito com o mesocarpo externo e epicarpo do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Fase móvel: butanol:água:ácido acético (75:9:6). Revelação em vapor de iodo.

pico majoritário. Conforme cromatogramas (figura 3) a fração 4 (figura 3-B) apresentou menor proporção de ruídos e foi usada para identificação do composto que representa o pico majoritário.

Conforme análises em sistema LC-MS a substância majoritária presente na fração 4 é o ácido gálico (figura 4 – A e B). Este composto também foi identificado por Roesler e colaboradores (2008), como um dos principais componentes fenólicos identificados para o extrato etanólico da casca do fruto do pequi. O ácido

gálico (ácido 3,4,5-trihydroxibenzoic) é um dos polifenóis presentes em muitos frutos, legumes e produtos derivados e tem sido descrito como um poderoso antioxidante

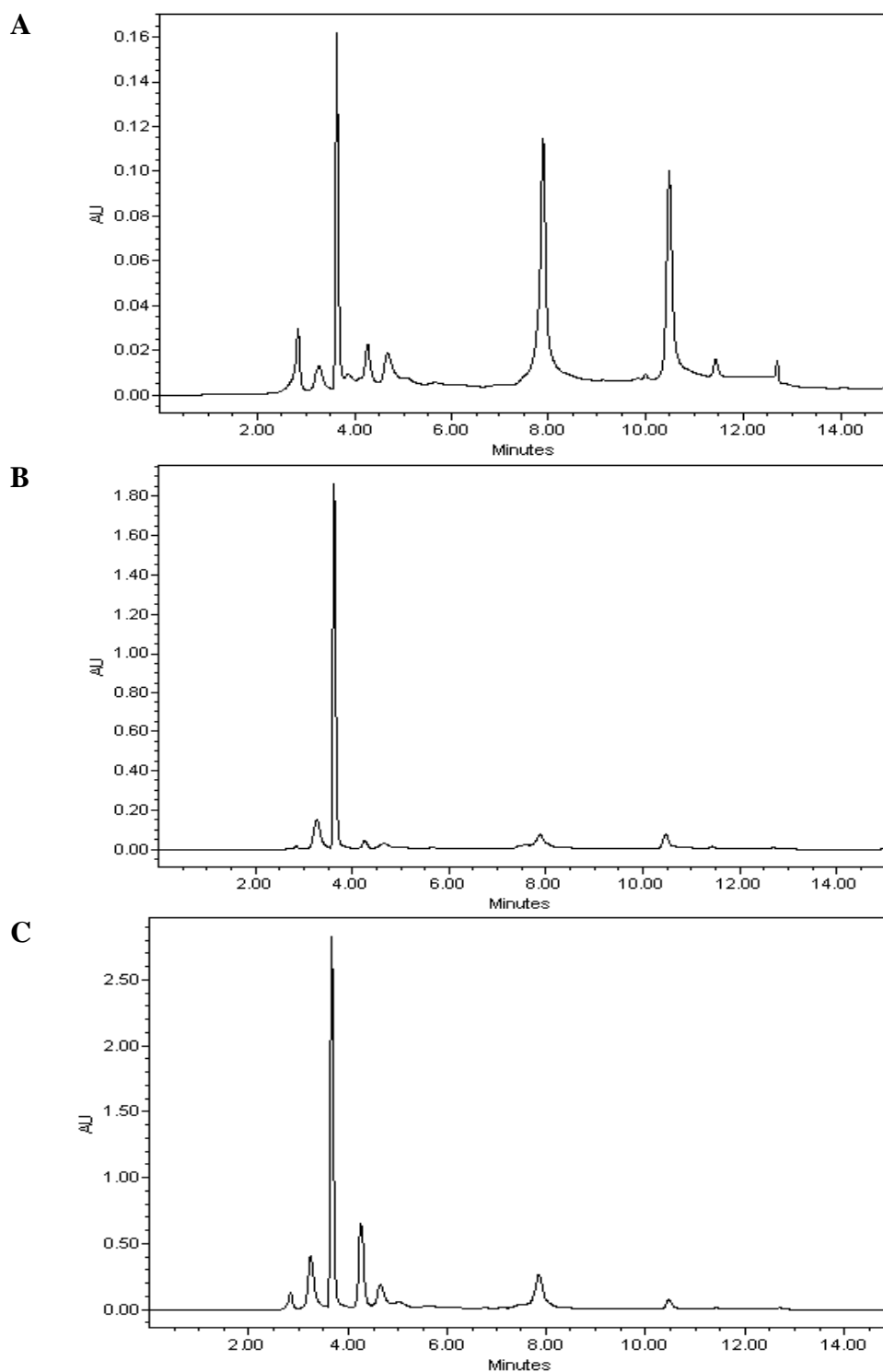


Figura 3: Perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência de amostras do extrato bruto (A) e frações (fração 4 – B e fração 5 – C) do extrato etanólico da casca do fruto do pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.).

natural, que é capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO), por exemplo, superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Nakagawa & Yokozawa, 2002). Em vários estudos são também relatadas ações antitumoral e antimicrobiana do ácido gálico (Chanwitheesuk, et al., 2007; Chen, et al., 2009). Na indústria farmacêutica é utilizado como matéria prima para produção do antibiótico Trimetoprima (Yasushi, et al., 1982). Também é utilizado na indústria de tinturas (Rosso, 2005).

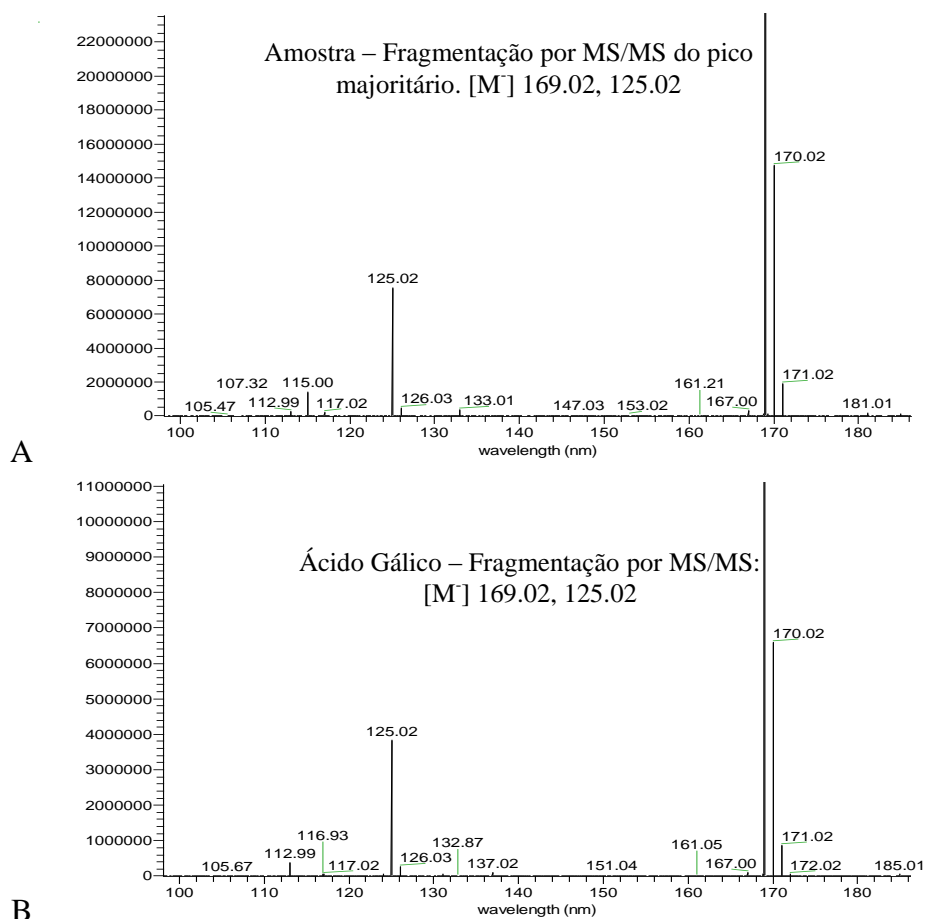


Figura 4: Espectro de massa obtido em sistema LC-MS feito para amostra da fração mais pura obtida da casca do fruto do pequi (A) e ácido gálico comercial (B).

### 3.2. Avaliação da Atividade Antioxidante

Devido à segurança e à limitação do uso de antioxidantes sintéticos, a busca por antioxidantes naturais obtidos a partir de materiais comestíveis, subprodutos e resíduos comestíveis tornou-se altamente interessante (Moure, et al., 2001).

Para a avaliação da atividade antioxidante, o método do DPPH é um teste simples e amplamente empregado, que consiste na redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, de coloração púrpura que absorve a 517 nm. Ao extrair um radical hidrogênio do antioxidante em estudo, observa-se diminuição da absorbância e a coloração passa para amarela (Bertoldi, 2006), o que permite calcular após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical DPPH (Brand-Willians, et al., 1995).

Na figura 5 apresenta-se a atividade antioxidante em função da concentração do extrato bruto (etanol:água -4:1), fração 4, ácido gálico e quercetina. Pela análise de regressão linear, observa-se que a atividade antioxidante é dependente da concentração dos antioxidantes. Assim, a capacidade sequestradora de radicais livres é aumentada à medida que se aumenta a concentração dos antioxidantes no meio de reação. A  $CE_{50}$  representa a concentração necessária para sequestrar 50% da quantidade de DPPH inicial existente na solução (Roesler, et al., 2008). Assim, uma substância, extrato ou fração que apresenta alto potencial em sequestrar radicais livres possui baixo valor de  $CE_{50}$ . A tabela 1 apresenta uma comparação da atividade antioxidante, através da concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), entre o extrato bruto e fração obtida da casca do fruto de pequi e antioxidantes comerciais (ácido gálico e quercetina). A quercetina se encontra entre os flavonóides com atividade antioxidante mais investigados e está presente na maioria das frutas e vegetais (Gaspar, et al.,

1993). O ácido gálico, que foi identificado como sendo o principal componente da fração obtida, também é referido como importante antioxidante presente nos vegetais (Broinizi, et al., 2007; Moure, et al., 2001).

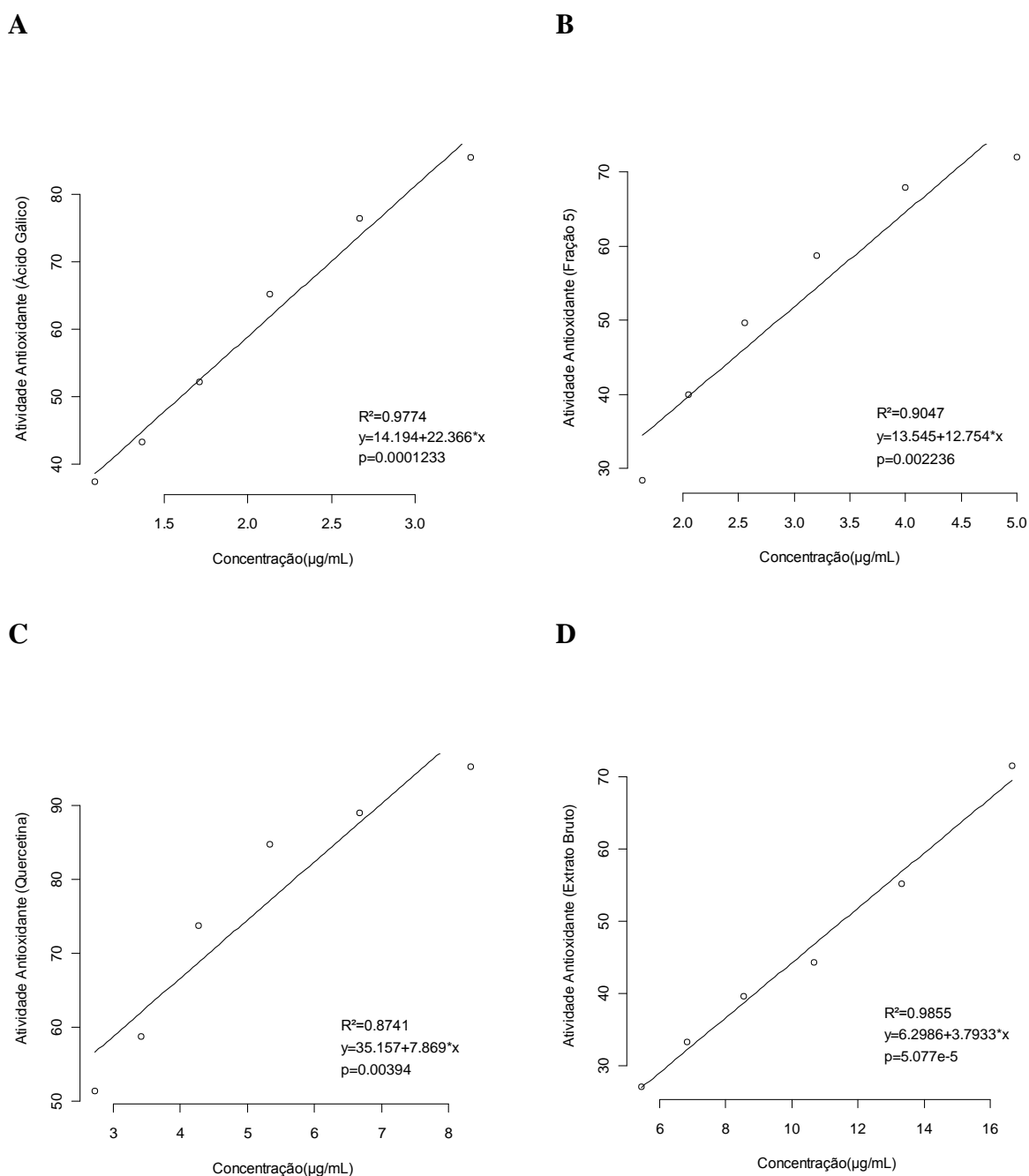


Figura 5: Atividade Antioxidante em função da concentração (µg/mL) de ácido gálico comercial (A), da fração 4 (B), da quercetina (C) e do extrato bruto (D).

Tabela 1 – CE<sub>50</sub> das amostras testadas com seus respectivos intervalos de confiança

<b>Composto</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>Intervalo de Confiança (95%)</b>
<b>Fração 4</b>	2,85	± 0,141
<b>Quercetina</b>	1,88	± 0,258
<b>Ácido Gálico</b>	1,60	± 0,182
<b>Extrato Bruto</b>	18,28	± 1,147

Em experimentos feitos com cinco frutas do cerrado, Roesler e colaboradores (2007) encontram entre os menores valores de CE<sub>50</sub> o ácido gálico (1,38 mg.mL<sup>-1</sup>) e extrato etanólico e aquoso de casca de pequi (9,44 e 17,98 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Segundo os autores, esses extratos poderiam ser ainda mais efetivos como antioxidantes se os processos de extração dos compostos fenólicos fossem aprimorados.

Em estudo concretizado em ratos com senescência acelerada e suplementados com ácido gálico, verificou-se que, além de restabelecer a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase, houve redução do nível aumentado de peroxidação lipídica, levando à diminuição significativa da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado, cérebro e rim (Li, et al., 2005).

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 sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Soares, 2002).

### 3.3. Avaliação da atividade fotoprotetora e efeito citotóxico

Pesquisas envolvendo a busca por novas moléculas fotoestáveis para utilização em protetores solares ainda são extensivamente realizadas, sendo que atualmente se destaca um interesse crescente para o desenvolvimento de filtros baseados em produtos naturais (Guaratini, et al., 2009). Na tabela 2 são apresentados os fatores de proteção solar para as diferentes amostras testadas. Observa-se que a fração 4 obtida do extrato apresentou o melhor fator de proteção (14,43) quando comparada às demais amostras. Observa-se, também, que quando adicionada a filtros solares comerciais de FPS 15 e 30, melhorou o fator de proteção solar dos mesmos e foi superior até mesmo a substâncias comumente utilizadas no preparo de filtros solares, o Silasoma® (FPS = 2,74) e dióxido de titânio (FPS = 1,52).

Tabela 2 – Fator de Proteção Solar das amostras testadas com seus respectivos intervalos de confiança.

<b>Compostos</b>	<b>Fator de Proteção Solar (FPS)</b>	<b>Intervalo de Confiança (95%)</b>
<b>Extrato Bruto</b>	6,65	± 0,081
<b>Fração 4</b>	14,43	± 0,036
<b>Ácido Gálico</b>	8,41	± 0,012
<b>Silasoma®</b>	2,74	± 0,017
<b>Dióxido de Titânio</b>	1,52	± 0,195
<b>FPS 15</b>	9,83	± 0,273
<b>FPS 30</b>	8,73	± 0,054
<b>FPS 15 + Fração 4</b>	13,09	± 0,091
<b>FPS 30 + Fração 4</b>	12,68	± 0,092

O FPS calculado segundo Mansur et al. (1986), considera a capacidade de absorção da substância na faixa de 290 a 320 nm. Esta faixa compreende a faixa UVB e juntamente com a faixa UVA (320-400 nm) é a mais importante do ponto de vista



biológico, pois pode causar diversos efeitos a pele. A exposição à radiação UV pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROS) que são altamente reativos (Xu, et al., 2006) e em desequilíbrio podem causar danos a praticamente todas as biomoléculas nas células. A radiação UV pode levar à morte celular, envelhecimento prematuro da pele e doenças crônicas graves, incluindo câncer de pele (Afaq, et al., 2001), que surgem quando a exposição de UV exceder a capacidade de proteção do sistema antioxidante. Naturalmente a pele possui um sistema de proteção oxidativa, entretanto, esse sistema de defesa pode ser reforçado com o uso tópico ou oral de antioxidantes (Oliveira, et al., 2004).

O extrato etanólico de casca do fruto do pequi apresenta-se, portanto, como uma interessante fonte de substâncias fotoprotetoras, pois, além de possuir antioxidantes, que tem a capacidade de barrar a radiação UV (FPS), tem na sua composição o ácido gálico, que vários estudos tem demonstrado inibir o crescimento de células cancerígenas. Ácido gálico extraído de *Toona sinensis* apresentou efeito citotóxico contra cinco linhagens de células cancerígenas com doses letais ( $DL_{50}$ ) de: células de câncer ovariano (SKOV3) –  $DL_{50} = 28\mu\text{g/mL}$ , células de câncer cervical (Hela) –  $DL_{50} > 100\mu\text{g/mL}$ , células de câncer endometrial (RL95-2) –  $DL_{50} > 100\mu\text{g/mL}$ , células de câncer (HepJ5) –  $DL_{50} = 30\mu\text{g/mL}$  e células de câncer de próstata (DUI45) –  $DL_{50} = 17,5\mu\text{g/mL}$  (Chen, et al., 2009).

Na figura 6 apresenta-se dados de inibição do crescimento de células cancerígenas em função da concentração do extrato bruto (etanol:água – 4:1), fração 4 e ácido gálico. A citotoxicidade é um indicativo inicial da atividade antitumoral presente na maioria dos quimioterápicos e atualmente, os agentes antitumorais usados clinicamente, na sua grande maioria, possuem marcada atividade citotóxica (Ajith & Janardhanan, 2003).

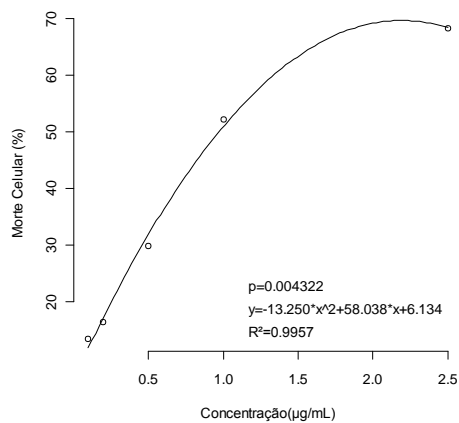
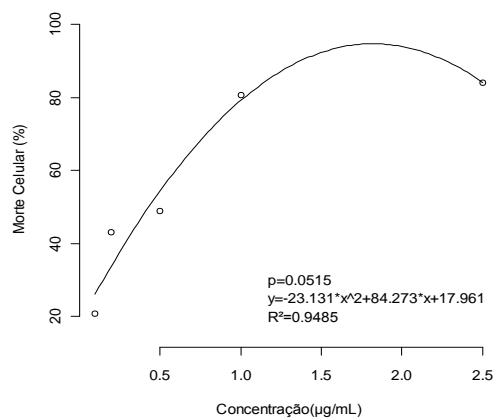
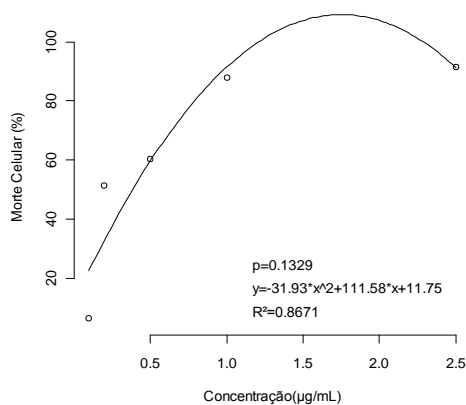
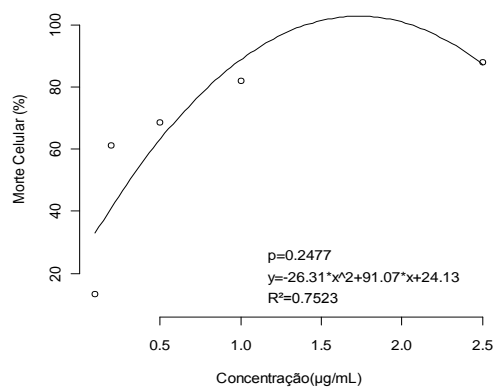
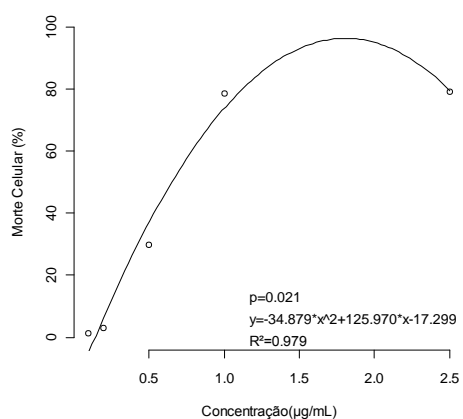
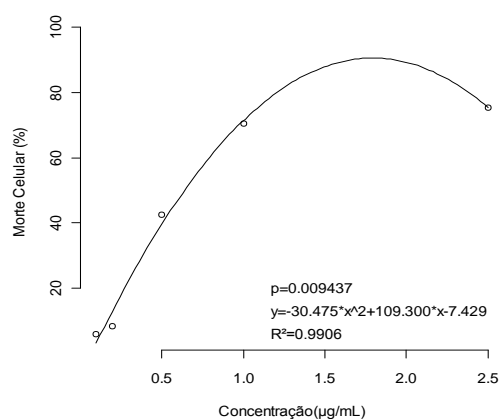
**A****B****C****D****E****F**

Figura 6: Porcentagem de morte celular de células MCF-7, quando colocadas em contato com a fração, o extrato bruto e o ácido gálico comercial em diferentes concentrações, por 24 e 48 horas. A – ácido gálico (24h), B – ácido gálico (48h), C – extrato bruto (24h), D – extrato bruto (48h), E – Fração 4 (24h) e F – fração 4 (48h).

Tabela 3: DL<sub>50</sub> (µg/mL) das células MCF-7 para o ácido gálico comercial, a fração 4 e o extrato bruto.

Compostos	Tempo – 24 horas		Tempo – 48 horas	
	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança (95%)	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança (95%)
<b>Ácido Gálico</b>	0,9752	± 0,05	0,4312	± 0,008
<b>Extrato Bruto</b>	0,6519	± 0,01	0,6394	± 0,007
<b>Fração 4</b>	0,3852	± 0,03	0,2547	± 0,006

Segundo Anderson e colaboradores (1991) a substância que apresentar Dose Letal para 50% das células (DL<sub>50</sub>) ≤ 100µg/mL é comparável com a camptotecina e sulfato de vincristina, sendo considerada muito ativa e, aquela que apresentar DL<sub>50</sub> ≥ 100µg/mL, no intervalo entre 100 e 900 µg/mL, comparável ao ácido hipúrico é considerada medianamente ativa. Enquanto que é considerada inativa a substância que apresentar DL<sub>50</sub> > 1000µg/mL.

Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos nas análises feitas com o extrato bruto da casca do fruto do pequi, com a fração pura obtida (fração 4) e com ácido gálico comercial foram da ordem de 0,2 a 0,9 µg/mL e podem, portanto, ser considerados muito ativos (tabela 3). Entretanto, destaca-se que, na perspectiva de uso da casca do fruto do pequi para obtenção de substâncias para compor medicamentos, cosméticos ou aditivos alimentares são necessários estudos para verificar uma possível ação destes compostos em células normais. Inoue e colaboradores (1995) e Isuzugawa e colaboradores (2001), observaram que o ácido gálico inibiu o crescimento de células cancerígenas e não exerceu nenhum efeito sobre células normais.

### 3.4. Potencial de uso da casca do fruto do pequi

A busca por fontes de substâncias naturais tem se tornado um desafio da atualidade e vários estudos têm focado este aspecto, sobretudo aqueles onde são avaliadas as potencialidades de subprodutos e resíduos. O pequizeiro é uma planta de múltiplos usos e é explorada principalmente pela população nativa do Cerrado, que é o bioma de ocorrência da planta. O fruto é a parte mais usada, do qual é extraído o óleo da polpa (mesocarpo interno), que também é o foco da exploração mais difundida, o seu uso a culinária. A exploração da amêndoa também tem se tornado expressiva nos últimos anos. A casca do fruto (mesocarpo externo e epicarpo), que representa cerca de 75% da composição do fruto (Roesler, et al., 2007), é geralmente considerada sem valor e é descartada como resíduo.

Neste estudo avaliou-se o potencial de uso da casca do fruto do pequi como fonte de antioxidantes pela estimativa de produção de ácido gálico em um hectare de Cerrado nativo. O ácido gálico foi identificado como a substância majoritária presente no extrato etanólico feito neste estudo. Observou-se que casca do fruto representa  $78 \pm 1,27\%$  da composição do fruto e possui um rendimento de 15% de massa seca. A quantificação de ácido gálico no extrato etanólico da casca revelou um conteúdo de  $26,54 \pm 1,13$  mg/g de massa seca da casca. Portanto, a partir de 1 quilograma de casca fresca do fruto do pequi, é possível extrair aproximadamente 3,339 g de ácido gálico.

Segundo Oliveira (2009), cada hectare de Cerrado avaliado apresenta, em média 77 pequizeiros, onde se pode considerar que destes pelo menos 39 serão adultos e estarão produzindo frutos. Conforme resultados do autor, cada pequizeiro produz em média 109 frutos, portanto temos, uma produção de 4251 frutos por hectare. O peso

médio dos frutos aqui avaliados foi de  $0,184 \pm 0,068$  Kg, assim, estima-se que um hectare produza aproximadamente 750 kg de frutos. Como a casca corresponde a 78% do fruto, portanto, produz aproximadamente 585 kg de cascas frescas/hectare. Como para cada kg de casca fresca quantificou-se 3,339 g de ácido gálico, em um hectare é possível produzir 1953,3 g, ou seja, aproximadamente 1,95 kg de ácido gálico.

O ácido gálico comercial (1 kg) é vendido por aproximadamente R\$1.000,00 (Quimibrás, Sigma-Adrich). Portanto, a obtenção deste composto a partir da casca do fruto do pequi pode gerar uma renda de R\$1.950,00 (um mil e novecentos e cinquenta reais), sem considerar os custos necessários para extração, purificação e colocar o produto no mercado. Os produtos agrícolas em maiores quantidades na agricultura do Cerrado são: milho e soja. Segundo Rocha (2006), produz-se em média 5 toneladas de milho por hectare, com uma renda bruta de aproximadamente R\$1.500,00. Para a soja produção média é de 2,8 toneladas, rendendo aproximadamente R\$2.050,00.

De acordo com Gulias e colaboradores (2008), o comércio da polpa do pequi (produto do pequiheiro mais amplamente difundido) rende, em média, R\$2.400,00/ha/ano. Assim, conforme estimativas, um hectare de Cerrado nativo, com a agregação de valores a ser proporcionado a partir da exploração da casca dos frutos, tem potencial para uma renda bruta de pelo menos R\$ 4.350,00/ha/ano, com a exploração do pequiheiro. Por outro lado, sem falar de outras potencialidades do pequiheiro e de outras espécies que compõem o Cerrado nativo, a manutenção de áreas nativas do Cerrado pode ser tão lucrativa quanto à criação de novas áreas agricultáveis. Cabe ressaltar, entretanto, que o milho, a soja e outros produtos da agricultura do Cerrado têm um mercado de certa forma garantido, o que ainda não pode ser afirmado para substâncias obtidas pela exploração do Cerrado.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a casca do fruto do pequi é fonte de compostos fenólicos com expressiva atividade antioxidante demonstrando a capacidade destes compostos em combater os radicais livres. O composto identificado na fração mais pura obtida a partir do fracionamento do extrato hidroetanólico foi o ácido gálico, sendo ele o responsável pela redução do DPPH.

A atividade fotoprotetora da fração mais pura obtida, comparada a fotoprotetores comerciais foi satisfatória, explicitando o potencial das substâncias presentes na casca do fruto do pequi. Esse potencial foi reforçado pelo efeito citotóxico a células cancerígenas observado, onde foram observados baixos níveis de DL<sub>50</sub>. Porém, destaca-se que não foram realizados testes em células normais (não cancerígenas).

A identificação de compostos com propriedades antioxidante e fotoprotetora em fontes naturais se mostra importante no sentido de obter produtos que apresentem menos efeitos colaterais do que os empregados atualmente no mercado.

Conforme estimativa, a exploração de substâncias antioxidantes a partir da casca do fruto do pequi pode ser tão lucrativa quanto a manutenção de áreas agricultáveis inseridas no Cerrado. Com isso, reforça-se a necessidade de identificar potencialidades das plantas nativas do Cerrado para que seja possível valorizar a preservação e encontrar formas alternativas para a exploração.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afaq, F., & Mukhtar, H.** (2001). Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathway. *J. Photochem Photobiol B: Biology* , 63, pp. 61-69.
- Ajith, T., & Janardhanan, K.** (2003). Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology* , 84, pp. 157-162.
- Almeida, S. P.** (1998). Cerrado: Espécies vegetais úteis.
- Anderson, J., Goetz, C., McLaughlin, J., & Suffness, M.** (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* , 2, pp. 107-111.
- Andrade, C. A.** (2007). Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia Podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. 17, pp. 231 - 235.
- Antolovich, M., Bedgood Jr., D., Bishop, A., Jardine, D., Prenzler, P., & Robards, K.** (2004). LC-MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Antioxidants. *J. Agric. Food Chemistry* , 52, pp. 962-971.
- Araujo, F. D.** (1995). A Review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) - an economically valuable species of the central Brazilian Cerrados. *Economic Botany* , 49, pp. 40-48.
- Asolini, F., Tedesco, A., & Carpes, S.** (2006). Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Brazilian Journal of Food Technology* , 9 , 209-215.
- Batello, C.** (2002). Efeito antioxidante in vitro dos medicamentos homeopáticos *Arsenicum album*, *Cuprum metallicum*, *Manganum* e *Zincum metallicum*. *Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo* . São Paulo: Dissertação de Mestrado.
- Bertoldi, M.** (2006). Atividade Antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *UFV* . Viçosa: Dissertação de Mestrado.
- Bianchi, M. L., & Antunes, L. M.** (1999). Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. 12 (2).
- Blois, M.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* , 181, pp. 1199-1200.
- Brandão, M., Laca-Buendia, J. P., & Macedo, J. F.** (2002). Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Brand-Willians, W., Cuvelier, M., & Berset, C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* , 28, pp. 25-30.

**Bravo, L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* , 56, pp. 317-333.

**Broinizi, P., Andrade-Wartha, E., Silva, A., Novoa, A., Torres, R., Azeredo, H., et al.** (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* , 27, pp. 902-908.

**Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J., & Rakariyatham, N.** (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry* , pp. 1044-1048.

**Chen, H., Wu, Y., Chia, Y., Chang, F., Hsu, H., Hsieh, Y., et al.** (2009). Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. pp. 161-171.

**Chéves, P. O.** (1997). O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado do Norte de Minas Gerais. *Dissertação (Mestrado em Administração Rural)* . Universidade Federal de Lavras / MG.

**Degáspari, C. H.** (2004). Atividade antioxidante de extrato de fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). 5, pp. 83 - 90.

**Degáspari, C., & Waszczynskyj, N.** (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica* , 5, pp. 33-40.

**Donnelli, J., & Robinson, D.** (1995). Free radical in foods. *Free Radical Research* , 22, pp. 147-176.

**Farinatti, P. T.** (2002). Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. 8, pp. 129 - 138.

**Freire, D. A.** (2008). Obtenção de antioxidantes a partir do mesocarpo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Monografia de conclusão de curso* . Universidade Estadual de Montes Claros.

**Friedberg, E., & Henningk, A.** (1993). The conundrum of xeroderma pigmentosum-a rare disease with frequent complexities. *Mutat. Res.* , 289, pp. 47-53.

**Gaspar, J., Laires, A., Monteiro, M., Laureano, O., Ramos, R., & Ruef, J.** (1993). Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis* , 8, pp. 51-55.

**Gil, E. S., Serrano, S. H., Soares, L. A., & Rezende, K. R.** (2005). Atividade Antioxidante de Extrato etanólico e Hidroalcoólico de Canjiqueira. 2, pp. 85 - 88.

**Guaratini, T., Callejon, D. R., Pires, D. C., Lopes, J. N., Lima, L. M., Neto, D. G., et al.** (2009). Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. XV, pp. 1-5.



**Guaratini, T., Medeiros, M. H., & Colepicolo, P.** (2007). Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *30*, pp. 206 - 213.

**Gulias, A., Ribeiro, J., Oliveira, M., Aquino, F., & Silva, M.** (2008). Produtividade dos Pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Cambess.) no município de Damianópolis, Goiás. *II Simpósio Internacional Savanas Tropicais* . Brasília: IX Simpósio Nacional: Cerrado. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais.

**Halliwell, B.** (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *49*, pp. 1341 - 1348.

**Heck, D., Gerecke, D., Vetrano, A., & Laskin, J.** (15 de Mar de 2004). Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicology and Applied Pharmacology* , *195* , 3, 288-297.

**Heim, K., Tagliaferro, A., & Bobilya, D.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* , *13*, pp. 572-584.

**Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., et al.** (1995). Selective induction of cell death in cancer cells by Gallic Acid. *Biol. Pharm.* , *18*, pp. 1526-1530.

**Isuzugawa, K., Inoue, M., & Ogihara, Y.** (2001). Catalase contents in cells determine sensitivity to the apoptosis inducer Gallic Acid. *Biol. Pharm.* , *24*, pp. 1022-1026.

**Khouri, J., Resck, I., Poças-Fonseca, M., Sousa, T. M., Pereira, L. O., Oliveira, A. B., et al.** (2007). Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.). pp. 442 - 448.

**Kirchoff, V.** (1995). Ozônio e radiação UVB. São José dos Campos, São Paulo: Transtec.

**Kuss, F.** (2005). Agentes Oxidantes e Antioxidantes. *Seminário da Disciplina Bioquímica do Tecido Animal* . Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Li, L., Ng, T., Gao, W., Li, W., Fu, M., Niu, S., et al.** (2005). Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. *77* (2), pp. 230-240.

**Lim, H., Cooper, K., Rubenstein, R., Hufford, D., Downham, T., Trancik, R., et al.** (1999). The health impact of solar radiation and prevention strategies. *Journal of the American Academy of Dermatology* , *41*, pp. 81-84.

**Lima, A.** (2008). Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Dissertação (Doutorado)* . Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - Universidade de São Paulo.

**Lindley, M. G.** (1998). The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *9*, pp. 336 - 340.

- Lowe, N. J., Shaath, N. A., & Pathak, M. A.** (1997). *Sunscreens: development, evaluation, and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker.
- Mancek, B., & Pecar, S.** (2001). Radicals and protection against radical damage in biological systems. *Farm. Vestn* , 52, pp. 133-144.
- Mansur, J. S., Breder, M. N., & Mansur, M. C.** (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. 3, pp. 121 - 124.
- Melo, E. A., Maciel, M. I., Lima, V. L., Leal, F. L., Caetano, A. C., & Nascimento, R. J.** (2006). Capacidade Antioxidante de Hortaliças usualmente consumidas. 26, pp. 1 - 12.
- Melo, G. A.** (2009). Purificação de antioxidantes extraídos do mesocarpo do pequi (Caryocar brasiliense Camb.).
- Moure, A., Cruz, J., Franco, D., Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., et al.** (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* , 72, pp. 145 - 171.
- Nakagawa, T., & Yokozawa, T.** (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology* , 40, pp. 1745-1750.
- Oliveira, D., Dutra, E., Santoro, M., & Kedorhackmann, E.** (2004). Protetores solares, radiações e pele. *Cosmet Toiletries* , 16, pp. 68-72.
- Oliveira, W.** (2009). Ecologia populacional e extrativismo de frutos de Caryocar Brasiliense Camb. no Cerrado no Norte de Minas Gerais. *Dissertação de Mestrado* . Brasília: Universidade de Brasília.
- Perez, E.** (2004). Diagnose fitoquímica dos frutos de Caryocar brasiliense Camb., Caryocaraceae. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas* . Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- Podda, M.** (1998). UV irradiations depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Biol.Med.* , 24, pp. 55-65.
- Porto, C. S.** (2008). Potencial antioxidante de folhas e frutos do pequi (Caryocar brasiliense Camb.). *Dissertação (Mestrado)* . Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Montes Claros.
- Porto, C. S., Melo, G. A., Oliveira, D. A., Nobre, S. A., & Prata, E. R.** (2008). Atividade antioxidante em folhas e frutos (Caryocar brasiliense Camb.).
- Ramalho, V., & Jorge, N.** (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova* , 29, pp. 755-760.
- Rangel, V., & Corrêa, M.** (2002). *Fotoproteção* (Vol. 14). São Paulo: Cosmetics & Toiletries.

**Rocha, A.** (16 de 10 de 2006). *Rios Vivos*. Acesso em 26 de 08 de 2010, disponível em Ecoa: <http://www.riosvivos.org.br/Noticia/No+cerrado+brasileiro++em+se+plantando+tudo+da/9734>

**Roesler, R., Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., & Pastore, G. M.** (2008). Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. pp. 711 - 717.

**Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A., & Pastore, G. M.** (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* , 27, pp. 787-792.

**Rosso, R.** (2005). Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do Ácido Gálico. *UFSC* . Florianópolis: Dissertação de Mestrado.

**Silva, B., Ferreres, F., Malva, J., & Dias, A.** (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extratc. *Food Chemistry* , 90, pp. 157-167.

**Silva, D., Junqueira, N. T., Silva, J. A., & Pereira, A. V.** (2001). Avaliação do Potencial de produção do "Pequizeiro-Anão" sob condições naturais na região sul do Estado de Minas Gerais. 23, pp. 1 - 5.

**Silva, K. J.** (2004). Estudo preliminar da extração de antioxidantes hidrossolúveis de três plantas amazônicas. *UFPA* . Belém: Dissertação de Mestrado.

**Soares, S.** (Jan./Abr. de 2002). Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. *Revista de Nutrição* , 15, pp. 71-81.

**Sousa, B. C.** (2008). *Anacardium occidentale*: Avaliação do efeito fotoprotetor e conservante em preparações cosméticas. *Dissertação (Mestrado)* . Recife: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco.

**Sousa, C. M., Silva, H. R., Vieira, G. M., & Ayres, M. C.** (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. 30, pp. 351 - 355.

**Souza, T., Severi, J., Silva, V., Santos, E., & Pietro, R.** (2007). Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* , 28, pp. 221-226.

**Steenvoorden, D., & Henegouwen, G.** (1997). The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* , 41, pp. 1-10.

**Swain, T., & Hillis, W.** (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* , 10.

**Xu, Y., Shao, Y., Voorhees, J., & Fisher, G.** (2006). Oxidative Inhibition of Receptor type protein tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates EGFR in human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 27389-27397.

**Yasushi, T., Kiichiro, O., & Sadao, O.** (1982). *Patente N° 57109713*. Japão.