

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Capacidade antioxidante do extrato bruto e frações orgânicas da farinha do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*): potencial efeito na oxidação da LDL *in vitro*

Ana Paula Silva Xavier

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia

Uberlândia- MG

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Capacidade antioxidante do extrato bruto e frações orgânicas da farinha do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*): potencial efeito na oxidação da LDL *in vitro*

Ana Paula Silva Xavier

Orientadora: Prof. Dr^a. Françoise Vasconcelos Botelho

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia

Uberlândia- MG

2022

RESUMO

Os compostos bioativos presentes nas plantas podem ter capacidades antioxidantes capazes de neutralizar espécies reativas, as quais, quando se encontram em desequilíbrio podem acarretar o estresse oxidativo e doenças crônicas. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica multifatorial que está relacionada ao aumento na corrente sanguínea de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e sua consequente oxidação. A identificação de fenólicos totais, proantocianidinas e flavonoides por metodologias colorimétricas, a avaliação da capacidade antioxidante pelo potencial de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP) e a análise da capacidade antioxidante por eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). A avaliação na oxidação da LDL foi monitorada pela formação de dienos conjugados e avaliação da porcentagem de fluorescência dos resíduos de triptofano da LDL. Os resultados mostraram que a fração diclorometano da farinha do jatobá possui maior quantidade de fenólicos totais e flavonoides em comparação às demais frações. Por fim, na avaliação do extrato e suas frações na oxidação da LDL o extrato bruto e a fração acetato de etila tiveram melhores resultados. Dessa forma, esses resultados sugerem que há uma diferença na composição de biomoléculas, dependendo do solvente utilizado, isso também é refletido na capacidade antioxidante e na análise da oxidação da LDL. No geral, o extrato bruto, a fração diclorometano e a fração acetato de etila apresentaram melhores atividades antioxidantes e potencial proteção da LDL frente à oxidação *in vitro*.

Palavras-chaves: Produtos naturais, antioxidantes, LDL, aterosclerose, jatobá, *Hymenaea stigonocarpa*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. METODOLOGIA.....	9
3.1 Preparo das frações orgânicas e extrato bruto da <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	9
3.2 Dosagem de fenólicos totais	9
3.3 Dosagem de proantocianidina.....	9
3.4 Dosagem de flavonoides.....	10
3.5 Capacidade antioxidante	10
3.5.1 Potencial de redução do ferro 3 ⁺ (FRAP)	10
3.5.2 DPPH	11
3.6 Isolamento da LDL	11
3.7 Efeito das frações diclorometano, acetato de etila, n-butanol da <i>Hymenaea stigonocarpa</i> na oxidação da LDL induzida por cobre	11
3.7.1 Avaliação da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	12
3.7.2 Monitoramento da fluorescência do resíduo de triptofano com a oxidação da LDL	12
3.8 Análises estatísticas	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1 Dosagem de fenólicos totais, proantocianidina e flavonoides.....	13
4.2 Capacidade antioxidante	15
4.3 Produção de dienos conjugados.....	17
4.4 TBARS	19

4.5 Fluorescência do resíduo de triptofano na LDL	20
5 CONCLUSÃO.....	21
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

Os produtos naturais assim denominados, as substâncias oriundas diretamente da natureza e dos seus seres vivos, são utilizados desde os primórdios. No Brasil, os primeiros cronistas: Pero de Magalhães Gândavo e Gabriel Soares de Souza relatavam sobre produtos medicinais utilizados pelos índios de "as árvores e ervas da virtude" (PINTO et al., 2002). Tais relatos antigos retratam que, mesmo sem o conhecimento das propriedades químicas e biológicas, a utilização de plantas medicinais era baseada no conhecimento popular e toda sua forma de preparo e utilização era passada de geração a geração. Além disso, a busca dentro do território brasileiro por recursos naturais sempre foi vasta. Hoje, o Brasil é detentor de inúmeras variedades biológicas e, é mencionado pelo Ministério do Meio Ambiente, como o país com a maior biodiversidade do mundo com diferentes zonas climáticas, favorecendo, a formação de biomas (zonas biogeográficas), como a Floresta Amazônica, o Pantanal, maior planície inundável; o Cerrado, com suas savanas e bosques; a Caatinga, composta por florestas semiáridas; os campos dos Pampas; e a floresta tropical pluvial da Mata Atlântica ("Ministério do Meio Ambiente", 2022).

As etapas do estudo de plantas compreendem a etapa de identificação botânica, química, isolamento e demais análises. Os solventes utilizados na etapa de extração e isolamento variam de acordo com sua polaridade e será responsável por isolar diferentes compostos. Dessa maneira, frações diferentes de um mesmo extrato podem ter efeitos diferentes. Além disso, o método de extração pode ter um impacto decisivo na composição fitoquímica e, conseqüentemente, as atividades biológicas e os extratos de ervas serão influenciados (RAHIM et al., 2022).

Etnofarmacologia é o nome que se dá ao estudo de plantas que são utilizadas tradicionalmente, mas que ainda não se conhece o mecanismo de ação ou ainda não tem seus efeitos comprovados cientificamente. Dessa forma, a etnofarmacologia tem como objetivo a análise toxicológica, farmacológica de plantas para esclarecimento do consumo e utilização (OTENIO et al., 2020). É importante ressaltar que a utilização desses recursos deve ser direcionada de modo consciente, conceito este pertencente à bioprospecção, que é definida como uma busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos.

1.2. Utilização de recursos e compostos antioxidantes

O Brasil enfrenta dificuldades no quesito de pesquisas e desenvolvimento (P&D). Apesar de seus inúmeros recursos naturais, principalmente na questão alimentícia, relacionados à alimentos funcionais e plantas medicinais, cujos compostos bioativos podem ser considerados como opções terapêuticas seguras para aumentar, por exemplo, a biodisponibilidade do óxido nítrico e terapia preventiva prospectiva para a aterosclerose (MALEKMOHAMMAD; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2020). Dessa forma, estamos cientes da capacidade das diversas fontes de compostos bioativos advindos de plantas e animais que estão distribuídos nos diversos biomas no Brasil e o estudo e análise desses, nos ajuda na compreensão de mecanismos antioxidantes.

O bioma do Cerrado, o qual estamos inseridos apresenta uma diversidade de plantas e suas características específicas são decorrentes da adaptação das condições ambientais distintas: extensos períodos de seca, períodos de alta precipitação, solos pobres, grande ocorrência de incêndios e alta incidência de radiação UV (REIS; SCHMIELE, 2019). O estresse ambiental leva a produção de metabólitos secundários que auxiliam na adaptação e tais metabólitos podem apresentar elevados compostos bioativos. Compostos bioativos, como os flavonoides, polifenóis, carotenoides, isoflavonas, taninos são compostos conhecidos pela sua capacidade antioxidante e que podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos causados por espécies reativas de oxigênio, incluindo, os radicais livres. Dessa forma, os antioxidantes atuam como agentes redutores, os quais irão se oxidar para que os radicais livres reduzam, restringindo, portanto, os efeitos maléficos ao organismo (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

Estruturalmente, os compostos antioxidantes são compostos aromáticos constituídos de pelo menos uma hidroxila (OH). Seus possíveis efeitos estão intrinsecamente associados à sua estrutura e podem atuar como quelantes de metais, na extinção de radical oxigênio, biológicos (RAMALHO; JORGE, 2006). A biodisponibilidade de nutrientes ao consumirmos determinados alimentos o produto pode variar, uma vez que, nem tudo que é ingerido será absorvido totalmente. Isso impacta na ação do metabólito e, dessa maneira, é importante indicar que os estudos *in vitro* demonstram efeitos promissores, sendo necessário, estudos clínicos para esclarecimento do efeito e indicação da quantidade a ser consumida.

Uma das abordagens dos estudos de produtos naturais é a avaliação do potencial antioxidante das plantas e devido à natureza complexa dos fitoquímicos, aos diferentes

mecanismos de, a atividade antioxidante não pode ser avaliada apenas por um único método (ZOU et al., 2011).

1.3. Espécies reativas e sistemas antioxidantes

Um grande marco na evolução dos seres vivos foi o aparecimento dos organismos aeróbios, pois a utilização do oxigênio aumenta, consideravelmente, o aproveitamento da energia contida nos alimentos. O oxigênio não é uma espécie muito reativa, de modo que para se tornar reativo precisa receber energia para formar espécies reativas de oxigênio. Tal processo ocorre na respiração celular, principalmente na mitocôndria, por exemplo, quando o oxigênio vai receber 4 elétrons. Tais elétrons, são transferidos em passos de um elétron e, por isso, temos num primeiro momento, a geração de ânion radical superóxido, no segundo momento, peróxido de hidrogênio, no terceiro momento radical hidroxila e, por fim, temos a água. Esse processo é demonstrado no esquema abaixo (**Figura 1**):

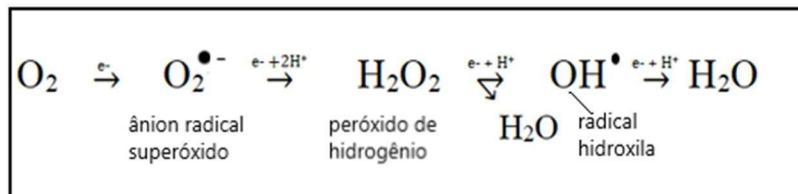


Figura 1. Esquema representativo dos intermediários radicalares e não radicalares, formados a partir do oxigênio molecular, durante o processo de respiração celular.

Os radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas que possuem átomos com um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (NUNES; DE ABREU, 2013). Na literatura, os radicais livres de oxigênio e nitrogênio estão incluídos nas categorias: espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Dentre as principais espécies reativas de oxigênio, as mesmas, distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e as não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre as espécies reativas de nitrogênio temos o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). O $\text{NO}\cdot$ e ONOO^- , em condições biológicas e, na presença de O_2 , o radical $\text{NO}\cdot$ é susceptível à oxidação e à redução, podendo ser transformado em espécies reativas (VIZZOTO, 2017).

Além da mitocôndria, existem outros sítios de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Temos, por exemplo, o sistema NADPH oxidase (NOX, presente em fagócitos. Tais enzimas fazem parte de uma família de Flavoenzimas, que estão localizadas nas membranas plasmáticas e, em fagossomos, usados por neutrófilos. Existem diversas isoformas dessas enzimas; temos o sistema NOX 1 a NOX 4, que são específicos de células e tecidos. O sistema mais estudado é o sistema NOX 2, presente em neutrófilos. Quando os neutrófilos entram em contato com invasores, por exemplo, bactérias. Estas serão fagocitadas e o sistema NOX ativado promove a transferência de elétrons do NADPH para as moléculas de oxigênio. Ocorre, portanto, a geração de uma alta concentração de ânion radical superóxido. Tal ânion radical superóxido, tende a dismutar-se, tanto espontaneamente, quanto pela catálise pela superóxido dismutase, formando peróxido de hidrogênio. Na presença de uma enzima chamada, mieloperoxidase (MPO) haverá formação de hipoclorito, que é um forte oxidante causando danos à bactéria invasora. Temos, portanto, um sistema enzimático, especializado em reduzir o oxigênio molecular, gerando ânion radical superóxido, que então vai dar origem a uma cascata de reações que vai gerar um radical, causando danos ao microrganismo invasor (WINTERBOURN, 2008).

Outro sistema responsável pela produção de superóxido é a xantina oxidase (XO) responsável por catalisar a reação de oxidação da xantina em ácido úrico (MEDEIROS; SILVA; ALCOFORADO, 2018). Os radicais livres, quando produzidos em excesso, em relação aos mecanismos de defesa antioxidante, podem ocasionar o que denominamos estresse oxidativo, levar a quadros inflamatórios e doenças crônicas, entre elas; aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (BARBOSA et al., 2010; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

O sistema de defesa antioxidante é dividido em: enzimático e não-enzimático. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST). A SOD atua sobre o radical O_2^- , formando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Já as enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. A ação da GPx depende da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio do controle da relação entre glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (BARBOSA et al., 2010). As principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula são as vitaminas C e E, carotenoides, flavonoides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutathione (GSH), todos sendo captadores de radicais (COTINGUIBA et al.,

2013). Portanto, o consumo de alimentos ricos em antioxidantes pode retardar, prevenir ou remover a ação dos danos oxidativos promovidos pelas espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio.

1.4. Aterosclerose e teoria oxidativa da LDL

A aterosclerose é uma doença inflamatória que pode anteceder inúmeras doenças cardiovasculares (DCV's), como isquemia do miocárdio, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, hipertensão e arritmia, que permanecem sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo (ROTH et al., 2017). Os fatores relacionados à progressão da aterosclerose são multifatoriais, mas, é bem estabelecido a contribuição do acúmulo de lipoproteína de baixa densidade (LDL) para o seu desenvolvimento. A LDL exerce uma função importante no transporte de colesterol, entretanto, quando modificada por processos oxidativos pode acarretar o acúmulo de colesterol devido a uma ação quimioatratante sobre os monócitos, induzindo a transformação de macrófagos em *foam cell* (GONÇALVES et al., 2011), definida como estrias gordurosas com adesão de macrófagos, esse processo é resumido na **Figura 2**. Uma das formas de análise da oxidação da LDL é a avaliação da produção de dienos conjugados decorrente ao processo oxidativo. Além disso, durante o processo de oxidação da LDL há uma alteração estrutural em um constituinte importante dessa lipoproteína, a Apo-B100, a principal proteína da LDL o qual, é reconhecido durante o processo de endocitose pelos receptores das células, permitindo a entrada de colesterol. Essa alteração advinda da oxidação acarreta a uma perda de fluorescência, que é devido a presença de triptofano, demonstrando, dessa forma, a perda da sua função. A partir disso, a LDL oxidada é reconhecida pelos denominados receptores *scavengers*, que estão envolvidos na fagocitose dessa lipoproteína pelos macrófagos (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO, 2007). Além disso, o aumento da expressão do receptor para LDL oxidada leva a infiltração de monócitos/macrófagos, a absorção de lipídios e desencadeia um maior aumento da captação de oxLDL, que são fatores chaves para o início do processo aterosclerótico (BÄCK et al., 2019). Esse processo, por sua vez, desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias e agravamento da formação de ateromas na parede vascular. O processo aterosclerótico pode aumentar a formação de espécies reativas, mencionadas anteriormente. A produção excessiva de radicais livres, por sua vez, pode também contribuir para a modificação oxidativa da LDL ou pode atuar sobre fatores relacionados à adesão de

células, fatores de crescimento, potencialização da inflamação, agregação plaquetária e acúmulo de células inflamatórias (MARTINS et al., [s.d.]).

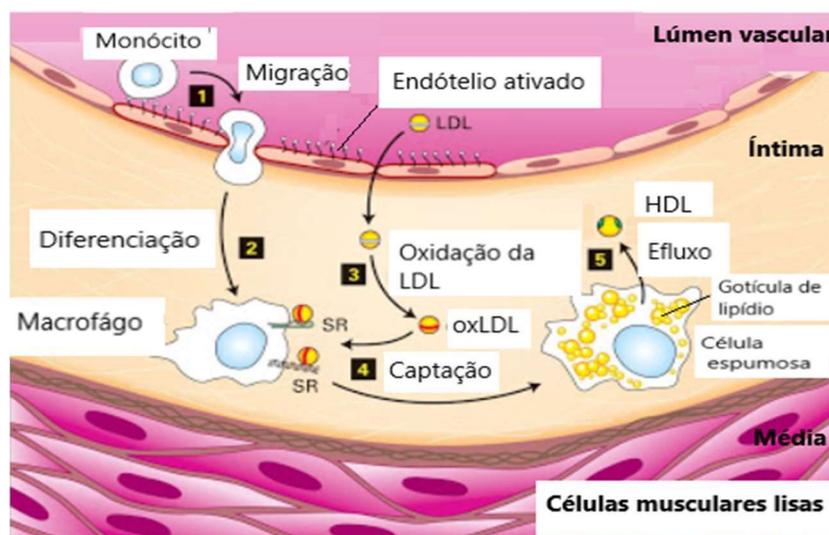


Figura 2. Imagem representativa do processo de formação da lesão aterosclerótica. A LDL pode invadir o espaço subendotelial, entre a camada de células endoteliais e a musculatura lisa, e uma vez oxidada, os monócitos, aderidos às células endoteliais, migram para o espaço subendotelial diferenciando-se em macrófagos que expressam receptores *scavengers* (SR) captando a LDL modificada e formando a célula espumosa que caracteriza a lesão aterosclerótica. Fonte: Silveira, 2013.

Para simular a oxidação da LDL, foi estabelecido anteriormente por (GIESEG; ESTERBAUER, 1994) um modelo estável para oxidação *in vitro* da LDL pela utilização de cobre. A análise, portanto, da capacidade de prevenção da oxidação da LDL por extratos de plantas é dada pelo período durante o qual não é observada peroxidação lipídica significativa em um ambiente pró-oxidante, esse período é denominado de T-lag. A atuação, portanto, de alimentos e compostos antioxidantes, é justamente, na quelatação do cobre impedindo, dessa forma, a oxidação da LDL.

1.5. *Hymenaea stigonocarpa* (Jatobá-do-cerrado)

A *Hymenaea stigonocarpa*, também conhecida como jatobá-do-cerrado, é uma espécie endêmica do Cerrado e economicamente valiosa (MARANHÃO et al., 2013). O produto mais utilizado é a madeira para venda, entretanto, a casca é utilizada na medicina popular para tratar gripe, cistite, vermífugo e outros (COSTA; SOUZA; SOUZA, 2011). O jatobá (**Figura 3**) pode ser consumido pela sua forma *in natura* pelo consumo da polpa, pela produção de

farinha e ainda pode ter diversas utilizações na culinária. O conhecimento acerca da composição nutricional e da capacidade antioxidante é um incentivo para o consumo, além de comprovar possíveis efeitos anti-inflamatórios. Os frutos do cerrado, incluindo, o jatobá, são produtos saudáveis e ricos em nutrientes. Todavia, há poucos dados na literatura técnico-científica, sobre informações mais detalhadas dos compostos nutricionais e, principalmente, funcionais em relação a muitos frutos do cerrado inclusive do jatobá (OLIVEIRA; ROCHA, 2008). A escolha do consumidor por alimentos mais saudáveis é de grande interesse para a indústria de alimentos, pois ao investir em pesquisa e desenvolvimento tecnológico na área de ciência de alimentos, como na linha de alimentos funcionais, proporcionará novas oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos mais saudáveis para a população (NEHIR EL; SIMSEK, 2012). Estudos anteriores já realizaram a caracterização físico-química de biscoitos amanteigados elaborados com farinha de jatobá e verificaram um elevado teor de umidade, carboidratos e lipídeos (PEREIRA et al., 2016). Além disso, a fração acetato de etila do jatobá exibiu uma melhor capacidade de inibição do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) quando comparado aos quatro flavonoides isolados dessa fração: quercetina, 7-metoxicatequina, taxifonila e hultenina em estudo anterior (MARANHÃO et al., 2013). Diante do exposto, o trabalho tem o intuito de verificar a constituição fitoquímica da farinha do fruto do extrato bruto do jatobá-do-cerrado e suas frações orgânicas, a capacidade antioxidante dos mesmos e avaliação na prevenção da oxidação da LDL *in vitro*. Visto que, tais efeitos não foram abordados em trabalhos anteriores.



Figura 3. *H. stigonocarpa* (Jatobá-do-cerrado). Fonte: Central do Cerrado, 2021.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi analisar o perfil fitoquímico e antioxidante do extrato bruto e das frações orgânicas da *H. stigonocarpa*. Além disso, realizar a análise da capacidade antioxidante e avaliar o efeito dessas frações na oxidação da LDL *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Dosar a quantidade de fenólicos totais, proantocianidinas e flavonoides por meios de métodos colorimétricos;
- Avaliar a capacidade antioxidante das frações pela capacidade de redução do Fe^{3+} (FRAP);
- Analisar da capacidade antioxidante pelo ensaio de DPPH e cálculo da concentração inibitória média (IC50);
- Avaliar o efeito do extrato bruto, da fração diclorometano, acetato de etila, n-butanol de *Hymenaea stigonocarpa* na formação de dienos conjugados e efeitos na fase Lag de oxidação da LDL induzida por cobre *in vitro*
- Estimar a peroxidação lipídica da oxidação da LDL *in vitro* pelo método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Monitorar a fluorescência do resíduo de triptofano com a oxidação da LDL.

3. METODOLOGIA

3.1. Preparo das frações orgânicas e extrato bruto da *Hymenaea stigonocarpa*

As frações orgânicas hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol, aquosa e o extrato bruto da *Hymenaea stigonocarpa* havia sido anteriormente identificada e depositada gerando o voucher (HUFU 48445), estas foram cedidos pelo grupo de pesquisa. Para o preparo das amostras, pesamos 10mg de cada fração e diluímos em 1000 μL de etanol. Posteriormente foram armazenadas a -20°C e identificadas como estoque na concentração 10mg/mL.

3.2. Dosagem de fenólicos totais

O método de dosagem de fenólicos totais foi baseado no ensaio de Folin-Ciocalteu com algumas modificações descrito em (ZOU et al., 2011). Resumidamente, 5 μL do extrato

bruto e das frações de *Hymenaea stignonocarpa* (10mg/ml) foram misturadas a 25µL de reagente Folin-Ciocalteu, 195 µL de água destilada. Após 6 minutos foi adicionado 75µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7%. O branco foi preparado semelhante ao preparo dos extratos, com a substituição dos extratos por 5µL de água destilada. Utilizou-se como padrão para determinação de fenólicos totais a curva com diferentes concentrações de ácido gálico (15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL). Os resultados foram expressos como equivalência em mg de ácido gálico por grama de material vegetal (mg GAE/g). A leitura da absorbância foi feita por meio de um espectrofotômetro e foi utilizada um comprimento de onda de 760nm. O experimento foi feito em duplicata.

3.3. Dosagem de proantocianidinas (taninos condensados)

O método adotado para dosagem de proantocianidinas foi baseado em um ensaio com vanilina modificado, já estabelecido anteriormente por (PRICE; SCOYOC; BUTLER, 2002). Brevemente, 10 µL do extrato bruto e das frações de *Hymenaea stignonocarpa* (10mg/mL) foram adicionados de uma solução de vanilina a 4% e de 100 µL de HCl concentrado. O branco foi preparado semelhante ao preparo dos extratos, com a substituição dos extratos por 10µL de água destilada. A epigalocatequina-galato (EGCG) foi utilizada nas seguintes concentrações (15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL) para obtenção da curva padrão. Os resultados foram expressos como equivalência em mg de EGCG por grama de material vegetal (mg GAE/g). A leitura da absorbância foi feita por meio de um espectrofotômetro e foi utilizada um comprimento de onda de 500nm. O experimento foi realizado em duplicata.

3.4. Dosagem de flavonoides

A metodologia para dosagem de flavonoides foi descrita anteriormente por (SHIN et al., 2008), com algumas modificações. Basicamente, 30 µL das frações do extrato de *Hymenaea stignonocarpa* foram misturadas com 180 µL de água destilada, 10µL de solução 5% de nitrito de sódio (NaNO₂) e foram incubadas por 6 minutos a 25°C. Posteriormente, foi adicionado 20 µL de AlCl₃ a 10%. O branco foi preparado semelhante ao preparo dos extratos, com a substituição dos extratos por 30µL de água destilada. Para determinação da quantidade de flavonoides nas frações, foi elaborado uma curva com diferentes concentrações de quercetina (15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL). A partir da construção da

curva pôde-se obter o resultado em mg de quercetina por grama de material vegetal (mgQE/g). A leitura da absorbância foi feita por meio de um espectrofotômetro utilizando-se um comprimento de onda de 425nm. O experimento foi realizado em duplicata.

3.5. Capacidade antioxidante

3.5.1. Avaliação da capacidade de redução do férrico (FRAP)

O método FRAP é baseado na redução do férrico (Fe^{3+}) em Fe^{2+} . Tal método foi descrito anteriormente por (BENZIE; STRAIN, 1996) e caracteriza-se pela quelatação do Fe^{3+} pelo 2,4,6-tris(2-pyridyl) -s-triazine (TPTZ) e consequente formação de um complexo Fe^{2+} -TPTZ, que exibe uma coloração azul intensa. Resumidamente, o extrato bruto e suas frações (10mg/mL) foram adicionadas de 250 μL de reagente FRAP (0,3M tampão acetato de sódio, pH 3,6; 10mM solução TPTZ; 20mM cloreto férrico) e 25 μL de água a 37°C por 6 minutos. Para a avaliação da capacidade foi elaborado a curva padrão com Trolox e os resultados foram expressos em μmol equivalente a Trolox por grama de material vegetal ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Por fim, a absorbância foi mensurada a 593nm. Como controle positivo foi utilizado a quercetina e o ácido ascórbico, o branco utilizado foi o etanol. O experimento foi performado em triplicata.

3.5.2. DPPH

O ensaio de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é baseado na redução desse radical livre e a metodologia aplicada foi descrita anteriormente em (YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001). Resumidamente, o extrato bruto e suas frações foram adicionados junto a solução com DPPH (6mM) em metanol e incubadas por 30 min a 37°C. A absorbância foi mensurada a 517 nm. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico e a quercetina, para o branco foi utilizado o metanol e etanol. Além disso, foi preparado um branco com o extrato/frações/controles para reduzir a contribuição da cor para a absorbância. Para o cálculo da porcentagem de eliminação do radical DPPH foi utilizado a seguinte equação: $[(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \cdot 100$, onde Abs controle é a absorbância do branco DPPH e Abs amostra é a absorbância de cada extrato /controle positivo. O experimento foi performado em duplicata.

3.6. Isolamento da LDL

Para o isolamento da LDL foram coletados cerca de 10mL de sangue de indivíduo saudável (voluntário) não fumante, em tubo vacutainer com EDTA 10%, em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000rpm, 4°C, por dez minutos. O plasma foi coletado e adicionado os conservantes: aprotinina, benzamidina (2mM), solução de azida sódica 5% (EDTA 5%, clorafenicol 0,1%) e PMSF (0,5mM) em DMSO. Para o aumento da densidade, utilizou-se solução de Brometo de potássio (KBr). Após isso, 3mL deste plasma foram colocados em tubos de polipropileno, com volume total de 10mL. Foi adicionado sobre o plasma a solução de KBr de densidade 1,006 até completar o volume total do tubo, formando assim o gradiente descontínuo de densidade de duas camadas. Os tubos devidamente equilibrados foram colocados para ultracentrifugação por duas horas a 40000rpm e 4°C, para separação das lipoproteínas de alta densidade. Após a ultracentrifugação, foi retirada a camada composta pela LDL e a amostra foi submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS) 20 mM, pH7.4, por um período de 72 horas a 20°C com trocas do tampão a cada 24 horas. Em seguida, o material foi filtrado e armazenado na geladeira, em recipiente protegido da luz (CHUNG et al., 1986).

3.7. Efeito das frações diclorometano, acetato de etila, n-butanol da farinha do jatobá (*Hymenaea stignonocarpa*) na oxidação da LDL induzida por cobre

A dosagem de proteínas foi determinada e consideramos um valor de 2mg/ml na amostra de LDL, posteriormente foi feita a diluição das amostras de LDL para uma concentração final de 100 µg de proteína/mL. Para a oxidação da LDL foi adicionado 1,5 µL de CuCl₂ (concentração final de 5 µM) a amostra de LDL diluída em tampão de fosfato (PBS). A concentração das frações diclorometano, acetato de etila, n-butanol e o extrato bruto da *Hymenaea stignonocarpa* utilizadas foram 5µg, 10µg e 20µg, para isso as frações em estoque (10mg/ml) foram diluídas para 1mg/ml em etanol e posteriormente foram diluídas 10 vezes em PBS depois foi feita a incubação e o monitoramento por 2 horas a 37 °C e foram mensurados pelo comprimento de 234nm pelo espectrofotômetro (GIESEG e ESTERBAUER, 1994). O experimento foi performado em triplicata.

3.7.1. Avaliação da produção de substâncias reativas ao tiobarbitúrico (TBARS)

Para a avaliação da produção de substâncias reativas ao tiobarbitúrico foi utilizado um método relatado anteriormente por (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Basicamente, as alíquotas advindas da oxidação foram adicionadas de ácido tricloroacético (TCA) a 20% e foram direcionadas para a centrifugação a 10000g por 6 min a 4°C. Após isso, foram preparados novos tubos, sendo considerados brancos e testes. Nesses tubos brancos, foram adicionados junto de 200µL da amostra centrifugada, apenas solução de HCl (0,5M) e di-terc-butil metil fenol (BHT) a 50mM, já nos tubos testes, foram adicionados a solução de TBA 0,75% em HCl e o BHT a 50mM. Após isso, as amostras foram homogeneizadas no vórtex, em seguida incubadas a 95°C e centrifugadas a 10000g a 4°C por 6 minutos. A leitura foi feita por meio de um espectrofotômetro, a 500 e 600nm. A análise foi determinada pela formação de nmol de malondialdeído (MDA) e o experimento foi performedo em duplicata.

3.7.2. Monitoramento da fluorescência do resíduo de triptofano com a oxidação da LDL

Para o monitoramento da fluorescência do resíduo de triptofano (Trp) com a oxidação da LDL foi feita a leitura e análise da fluorescência das amostras antes da incubação com CuCl₂ no espectrofotômetro (282nm_{ex}/ 331nm_{em}) e após a incubação foi feito novamente a leitura. Os dados foram expressos em intensidade de fluorescência ao final da oxidação.

3.8. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foram utilizados o método de análise de variância (ANOVA) e para as análises de múltiplas comparações foi utilizado o teste de Tukey's. O programa GraphPad Prism versão 9.4 foi utilizado para a construção dos gráficos e análises estatísticas. Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Dosagem de fenólicos totais, proantocianidina e flavonoides

A prospecção fitoquímica é um estudo para investigar a caracterização do material vegetal. É um estudo rápido e prático, o que possibilita um bom manuseio e obtenção rápida de informações, contribuindo para estudos posteriores da constituição de plantas. Pesquisas anteriores correlacionaram as maiores concentrações de conteúdo fenólico e atividade antioxidante, sendo que a maior atividade antioxidante foi fortemente correlacionada com o conteúdo fenólico (RAHIM et al., 2022). Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes não apenas pela sua capacidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também por conta de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de ácidos graxos e de óleos (CUVELIER; RICHARD; BERSET, 1992; MAILLARD et al., 1996).

A identificação de conteúdo fenólico envolve a oxidação de fenóis em meio básico, pelo reagente de cor amarela *Folin-Ciocalteu*. Este método baseia-se na transferência de elétrons do composto antioxidante para o agente oxidante, que neste caso é o reagente de Folin-Ciocalteu e o aumento de absorbância é mensurado a 750nm (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007), entretanto, este método não apresenta especificidade.

Dentre o extrato bruto e as frações orgânicas, as que apresentaram maior conteúdo fenólico total foram as frações Diclo (85,49mg±0,74 mg EGA/g), AcEt (59,07±2,60 mg EGA/g) e N-but (41,22mg ±2,60 mg EGA/g). Os resultados para essa análise foram expressos por mg de ácido gálico por grama de extrato bruto ou fração (mg EGA/g) (**Tabela 1**). A variação de quantidade de conteúdo de fenólicos das diferentes frações foi relatada anteriormente em um estudo com as folhas de *Liquidambar formosana* (WANG et al., 2010), demonstrando que os solventes utilizados na etapa de extração são responsáveis por isolar diferentes compostos.

As proantocianidas ou taninos condensados são polifenólicos com elevada capacidade antioxidante e possui propriedades adstringentes (MONTEIRO et al., 2005). Para a dosagem de taninos, a metodologia utilizada baseia-se na reação da vanilina em um meio ácido (HCl) com os taninos condensados para formação de complexos coloridos. Assim como o método para dosagem de fenólicos, este é um método de pouca especificidade. Para esse ensaio, a fração Hex (174,204±51,91mg EEGCG/g) e Diclo (137,244±15,52mg EEGCG/g) destacaram-se. Os resultados foram expressos como sendo a equivalência de mg de

epigallocatequina-galato por grama de extrato bruto ou fração (mg EEGCG/g) (**Tabela 1**). O consumo de taninos demonstrou capacidade em estudos anteriores de redução da oxidação lipídica (BOUHAMIDI; PRÉVOST; NOUVELOT, 1998), apontando, o potencial terapêutico do consumo de alimentos ricos em taninos.

Os flavonoides, por sua vez, apresentam-se com capacidade de supressão da formação de espécies reativas de oxigênio, ou pela inibição de enzimas ou elementos de traços de quelação envolvidos na produção de radicais livres (CAZAROLLI et al., 2008). A metodologia para dosagem aplicada foi baseada na formação de ácidos estáveis entre o Al_3Cl e as estruturas de carbono presentes nos flavonóis e flavona. Assim, como os métodos anteriores, não apresenta uma boa especificidade. Para a dosagem, a fração Diclo ($142,11 \pm 20,33$ mg EQ/g), a fração Hex ($74,57 \pm 1,90$ mg EQ/g) e o extrato bruto ($74,57 \pm 1,90$ mg EQ/g) exibiram valores superiores em comparação as outras frações. Os resultados foram expressos como sendo mgde quercetina por grama de extrato bruto ou fração (mg EQ/g) e os dados estão apresentados a seguir (**Tabela 1**).

Tabela 1. Conteúdo de fenólicos totais, proantocianidinas e flavonoides do extrato bruto e frações orgânicas da farinha do jacobá (*Hymenaea stignonocarpa*).

Amostras	Conteúdo fenólicos total ⁻¹ (mg EGA/g)	Conteúdo proantocianidina ⁻¹ (mg EEGCG/g)	Conteúdo flavonoide ⁻¹ (mg EQ/g)
Ex. Bruto	29,31±1,12a	20,28±5,17a	59,15±1,27a
Hex	1,99±1,48b	174,204±51,91b	74,57±1,90a
Diclo	85,49±0,74c	137,244±15,52b	142,11±20,33b
AcEt	59,07±2,60d	45,60±11,58b	11,902±2,54a
N-but	41,22±2,60e	nd	4,026±1,27c
Aquoso	nd	nd	1,99±1,58c

Valores expressos como média ± erro padrão. Mesma letra indica que não há diferença estatística. Notas: nd= não detectada. Ex.Bruto: extrato bruto, Hex: fração hexano, Diclo: fração diclorometano, AcEt: fração acetato de etila, N-but: fração n-butanol, aquoso: fração aquosa, EGA= equivalência de ácido gálico, EEGCG: equivalência de epigallocatequina-galato, EQ=equivalência de quercetina.

4.2. Capacidade antioxidante

A busca por produtos naturais com capacidade antioxidante tem aumentado com o objetivo de auxiliar na prevenção de doenças inflamatórias crônicas e até mesmo na

identificação de compostos com possíveis aplicações farmacológicas. A atividade antioxidante de plantas pode ser desempenhada por diversos mecanismos e a propriedade redutora e estrutura química são características que 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 (SOUSA et al., 2007). Para a análise da capacidade antioxidante há diversas análises, a primeira aplicada neste estudo para o jatobá-do-cerrado foi a avaliação do potencial de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} pela formação do complexo com o TPTZ, que exibe uma coloração azul intensa com a reação de redução. O laboratório de bioquímica e biologia molecular (LABIBI) executa diversos projetos baseado na utilização de extratos de plantas endêmicas do Cerrado para comprovar possíveis efeitos medicinais de recursos presentes no nosso ambiente, estudos anteriormente utilizando a *H. stignocarpa* constatou que houve atenuação do aumento de glicemia (MACHADO, 2014). Dentre as frações analisadas no presente trabalho as que apresentaram maior concentração em μM equivalente de Trolox por grama de extrato foi a fração diclorometano e acetato de etila, demonstrando um maior potencial de redução do férrico (**Figura 3A**). É importante ressaltar que um antioxidante pode atuar como protetor em determinado sistema, mas falhar na proteção, ou mesmo aumentar as lesões induzidas em outros sistemas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Por isso, a atividade antioxidante não pode ser avaliada apenas por um único método (ZOU et al., 2011). Outro mecanismo para identificação da capacidade antioxidante é a avaliação da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura. O resultado dessa determinação foi dado em porcentagem (**Figura 4B**) e dentre o extrato bruto e as frações analisadas, as que apresentaram maior capacidade de sequestro de DPPH foram a Diclo, AcEt e N-but. Não variamos as concentrações da fração hexânica para cálculo da concentração inibitória média (IC50) (**Figura 4C**), pois, a mesma, não alcançou uma inibição de 50%. Além disso, a fração aquosa também não foi determinada pelo mesmo fator, na concentração estimada de 10mg/mL. Para o cálculo do IC50 o extrato bruto exibiu um menor valor de concentração para inibir 50% do radical livre ($2581 \pm 1052 \mu\text{g/mL}$), seguido pela fração Diclo ($3715 \pm 3850 \mu\text{g/mL}$) e AcEt ($4750 \pm 2340 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 4C**). Os valores do IC50 dos controles (**Figura 4D**) utilizados foram separados, pois partiram de uma concentração inferior à dos extratos e comprovamos o grande potencial de tais controles pelos baixos níveis de IC50. Estudo realizado anteriormente com a farinha do jatobá-do-cerrado, utilizando diferentes solventes exibiram boa atividade de eliminação do DPPH (SILVA et al., 2014), resultado semelhante ao obtido nesse estudo. Entretanto, houve variações na capacidade entre as frações utilizadas.

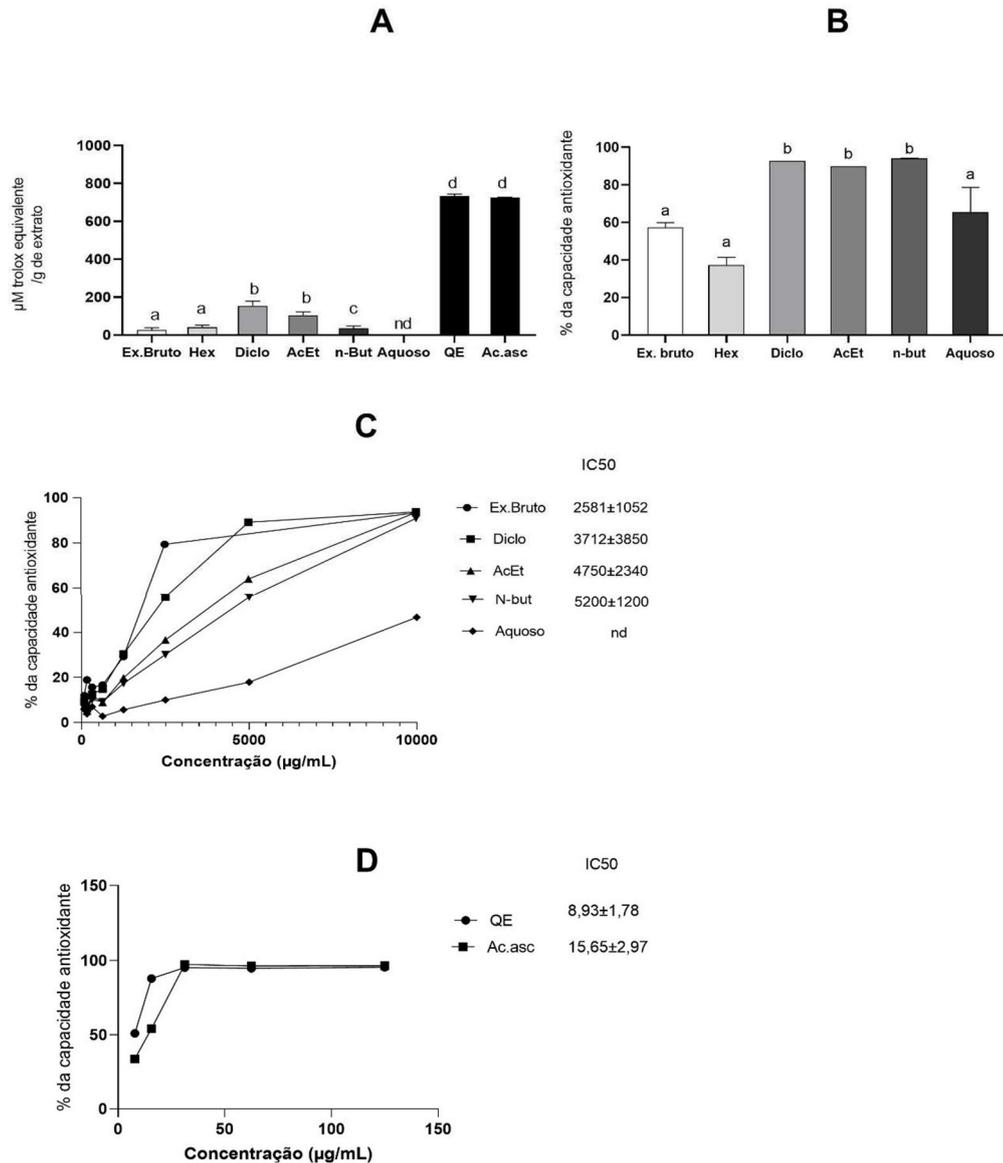


Figura 4. Efeito do extrato bruto da farinha do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stignonocarpa*) e suas frações na capacidade de redução do Fe^{3+} (FRAP). As concentrações utilizadas foram de 10mg/mL (A). Análise da capacidade antioxidante do extrato bruto e suas frações por DPPH (B). Análise da capacidade antioxidante por DPPH com variação da concentração do extrato e suas frações, partindo da concentração de 10mg/mL e diluindo até 0,0781250mg/mL para cálculo do IC50 (C). A avaliação da quercetina e do ácido ascórbico partindo da concentração de 0,125mg/mL até 0,0078125mg/mL (D). A capacidade antioxidante da fração hexânica não foi determinada devido a constatação de que em 10mg não obteve uma inibição de até 50%. Notas: Ex Bruto: extrato bruto, hex: fração hexânica, diclo: fração diclorometano, AcEt: fração acetato de etila, n-But: fração n-butanol, aquoso: fração aquosa, QE: quercetina, Ac.asc: ácido ascórbico, nd: não determinada. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,5$).

4.3. Produção de dienos conjugados

A produção de dienos conjugados (DC) é considerado um evento inicial na reação em cadeia de oxidação da LDL (KAPPUS, 1985), as modificações dessa lipoproteína implicam no acúmulo de colesterol, acarretando no processo de aterogênese e demais doenças cardiovasculares associadas a inflamação. A procura por compostos bioativos capazes de retardar essa oxidação, aumentando o T-Lag, que indica resistência de LDL para oxidação (ESTERBAUER et al., 1989) é requerida devido a necessidade do desenvolvimento de tratamentos com menos efeitos adversos. Portanto, as plantas aparecem como alvos de estudos e a *Hymenaea stignonocarpa*, por ser do bioma do Cerrado, e ter uma utilização e consumo alimentar ainda bem restrita foi analisada neste estudo. A oxidação da LDL por CuCl_2 já é bem estabelecida como modelo para oxidação *in vitro*. O acompanhamento da análise de produção de dienos conjugados é feita pelo gráfico cinético gerado. O extrato bruto e suas frações selecionadas com base nos resultados anteriores da capacidade antioxidante na concentração de $5\mu\text{g/mL}$ não exibiram efeito satisfatório (**Figura 5A**), resultado semelhante encontrado no valor de T-Lag (**Figura 5B**). Na concentração de $10\mu\text{g/mL}$ o extrato bruto e a fração AcEt exibiram um valor significativo, com um aumento do T-Lag em comparação a ox-LDL (**Figura 5C, D**). Por fim, na concentração de $20\mu\text{g/mL}$, o extrato bruto e a fração AcEt exibiram valores satisfatórios, equiparando-se ao valor de tempo de atraso propiciado pela quercetina ($2\mu\text{g/mL}$). As demais frações não tiveram diferenças significativas em comparação a oxLDL.

Análises feitas com o extrato das folha de *Syzygium cumini* apontaram a inibição da oxidação da LDL *in vitro* (DOS SANTOS et al., 2018), indicando uma possível atividade anti-aterogênica, sendo necessário pesquisas posteriores para comprovação desse efeito *in vivo*. Além disso, estudos com compostos isoladas de raízes da *Cynanchum wilfordii* também exibiram um efeito de inibição da oxidação da LDL (KIM et al., 2019).

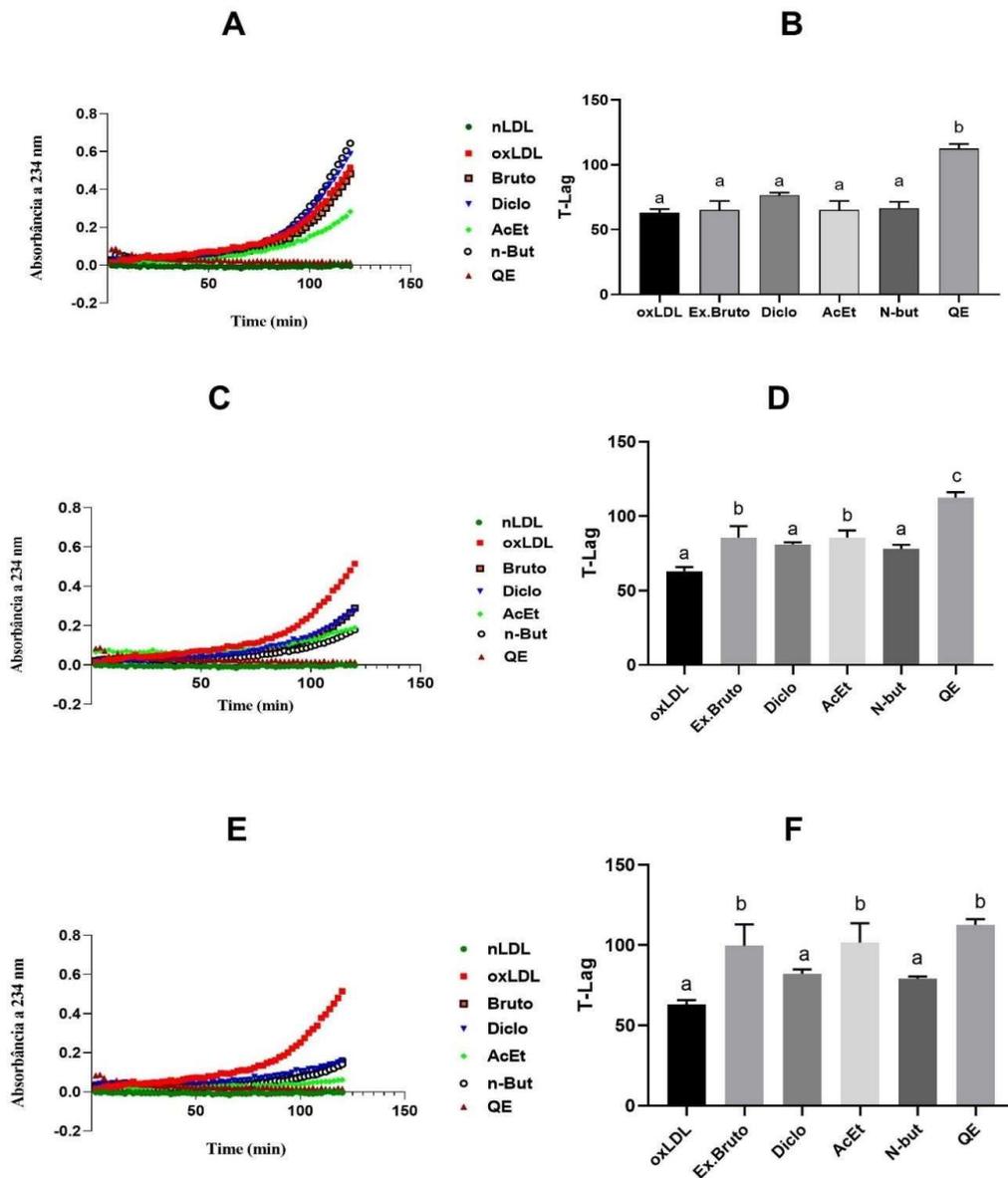


Figura 5. Efeito do extrato bruto da farinha do jacobá (*Hymenaea stignonocarpa*), de suas frações selecionadas na concentração de 5µg/mL (A), 10µg/mL (C), 20 µg/mL (E) e da quercetina a 2µg/mL na formação de dienos conjugados. Avaliação do efeito do extrato bruto e suas frações selecionadas na concentração de 5µg/mL (B), 10µg/mL (D), 20 µg/mL (F) nos valores da fase lag no processo de formação de dienos conjugados. A LDL (100 µg de proteína/mL) foi incubada em meio de reação com CuCl₂ (5µM) por 120 minutos a 37 °C. Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). O experimento foi performedo em triplicata.

4.4. TBARS

O malonaldeído (MDA) é um marcador de estresse e é um produto da reação da peroxidação lipídica, o ensaio de substâncias reativas ao tiobarbitúrico é capaz de mensurar a produção de MDA, fornecendo dados sobre a peroxidação lipídica. Para a análise de TBARS as alíquotas submetidas ao ensaio de oxidação foram submetidas ao ensaio descrito anteriormente para análise de produção de MDA. Dessa forma, podemos verificar que houve elevada produção de MDA na ox-LDL, o extrato bruto na concentração de 20µg/mL reduziu a produção de MDA, já as demais frações a partir da concentração de 10µg/mL tiveram um efeito de redução significativo na produção de MDA (**Figura 6**). Em alguns estudos clínicos, os níveis de MDA no plasma foram aumentados em pacientes com doença cardíaca coronariana e síndrome metabólica (MORETO et al., 2014).

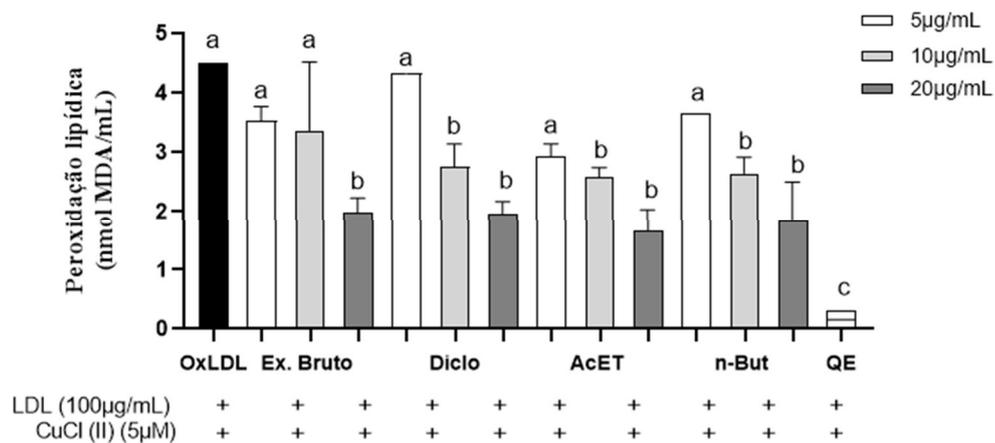


Figura 6. Efeito do extrato bruto e de suas frações a 10 µg/mL e quercetina a 2 µg/mL, na produção de TBARS durante a oxidação induzida por CuCl₂ (5 µM). A LDL (100 µg proteína/mL) foi incubada por 2 horas a 37 °C na presença de CuCl₂ (5 µM) com os tratamentos. Valores expressos como média ± desvio padrão. Notas: Ex.Bruto: extrato bruto, Hex: fração hexânica, Diclo: fração diclorometano, AcEt: fração acetato de etila, N-but: fração n-butanol, aquoso: fração aquosa. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p < 0,05). O experimento foi performed em duplicata.

4.5. Fluorescência do resíduo de triptofano na LDL

O resíduo de triptofano (Trp) está presente na estrutura da Apo-B100, um constituinte proteico da LDL, e tal estrutura é reconhecida durante o processo de endocitose pelos receptores das células. A modificação oxidativa da LDL ocasiona uma modificação estrutural e ocorre a degradação do triptofano levando a uma perda de sua fluorescência e perda da sua função, sendo essa mensuração considerada um marcador de dano (REYFTMANN et al., 1990). A avaliação da fluorescência do triptofano foi feita com base na leitura da absorbância a ($282_{ex}/331_{em}$) no $t=0$ e ao final $t=120$ do início da oxidação com $CuCl_2$. Na figura 7 representa o cálculo da porcentagem da redução da fluorescência. Com a oxidação da LDL percebemos uma redução significativa da fluorescência do Trp e dentre o extrato bruto e as frações, apenas a fração AcEt a partir da concentração de $10\mu g/mL$ exibiu um efeito protetório do resíduo de Trp mediante a oxidação por cobre.

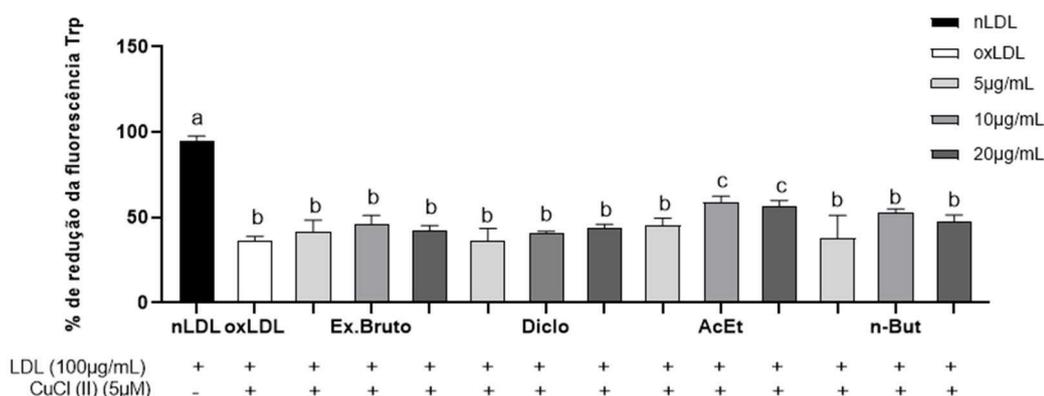


Figura 7. Efeito do extrato bruto, de suas frações e quercetina na fluorescência do Trp na LDL. Valores de oxidação para a fluorescência do Trp da LDL incubada por 2 horas na presença e ausência do extrato bruto e suas respectivas frações ($10\mu g/mL$) e $CuCl_2$ expressos ao final da oxidação ($t=120$). Valores expressos como média \pm desvio padrão. Notas: Ex.Bruto: extrato bruto, Hex: fração hexano, Diclo: fração diclorometano, AcEt: fração acetato de etila, N-but: fração n-butanol, aquoso: fração aquosa. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$). O experimento foi performedo em triplicata.

5. CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou que o extrato bruto, a fração Diclorometano e Acetato de Etila da farinha do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) tem um maior conteúdo de fenólicos totais, maior quantidade de taninos e de flavonoides; possuem maior capacidade de redução do Fe^{3+} e de eliminação do radical DPPH. Quanto à oxidação da LDL avaliada pela formação de dienos conjugados, o extrato bruto e a fração Acetato de Etila exibiram resultados significativos no aumento do tempo de resistência da oxidação da LDL. Na avaliação da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tanto o extrato bruto quanto as frações tiveram capacidade de reduzir a peroxidação lipídica. Por fim, na análise de fluorescência do triptofano apenas a fração acetato de etila teve um efeito protetor. Tais resultados sugerem que o extrato bruto e frações diclorometano e acetato de etila da farinha do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) são fontes de compostos antioxidantes; entretanto, são necessários estudos posteriores para avaliação da quantidade necessária a ser ingerida para obtenção dos efeitos avaliados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875–877, abr. 2007.

BÄCK, M. et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cardiology**, 7 mar. 2019.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 jul. 1996.

BOUHAMIDI, R.; PRÉVOST, V.; NOUVELOT, A. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. **Comptes rendus de l’Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie**, v. 321, n. 1, p. 31–38, jan. 1998.

CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429–1440, nov. 2008.

CHUNG, B. H. et al. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. **Methods in Enzymology**, v. 128, p. 181–209, 1986.

CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIO, L. A. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. p. 8, 2007.

COSTA, W. DA S.; SOUZA, A. L. DE; SOUZA, P. B. DE. Jatobá - *Hymenaea courbaril* L.: ecologia, manejo, silvicultura e tecnologia de espécies nativas da Mata Atlântica. 2011.

COTINGUIBA, G. G. et al. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2013.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 15–19, maio 2010.

CUVELIER, M.-E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 324–325, 1 jan. 1992.

DOS SANTOS, M. M. et al. *Syzygium cumini* leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the lipoprotein from glycation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 69–79, 10 jan. 2018.

ESTERBAUER, H. et al. Continuous Monitoring of in Vtzo Oxidation of Human Low Density Lipoprotein. **Free Radical Research Communications**, v. 6, n. 1, p. 67–75, 1 jan. 1989.

GONÇALVES, M. S. B. et al. Aumento dos níveis de LDLox induzem maior formação de células espumosas in vitro. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 43, n. 3, p. 213–216, 2011.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S110-118, fev. 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 1, p. 125–126, jan. 1995.

KAPPUS, H. 12 - Lipid Peroxidation: Mechanisms, Analysis, Enzymology and Biological Relevance. Em: SIES, H. (Ed.). **Oxidative Stress**. London: Academic Press, 1985. p. 273–310.

KIM, J.-Y. et al. Inhibitory effects of compounds isolated from roots of *Cynanchum wilfordii* on oxidation and glycation of human low-density lipoprotein (LDL). **Journal of Functional Foods**, v. 59, p. 281–290, 1 ago. 2019.

MACHADO, H. **Avaliação do uso de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne sobre a atividade adaptogênica e na expressão de biomarcadores do estresse oxidativo em cérebro de animais com estresse induzidos**. Tese (Mestrado em Genética e Bioquímica)- Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2014.

MAILLARD, M.-N. et al. Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 238–244, 1 maio 1996.

MALEKMOHAMMAD, K.; SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Mechanisms of Medicinal Plant Activity on Nitric Oxide (NO) Bioavailability as Prospective Treatments for Atherosclerosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 22, p. 2591–2601, 2020.

MARANHÃO, C. A. et al. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 9–13, 1 abr. 2013.

MARTINS, C. M. et al. O paradoxo do papel da vitamina e na iniciação e progressão da aterosclerose e sua correlação com os radicais livres. v. 14, n. 2, p. 113–116, [s.d.].

MEDEIROS, I. G.; SILVA, C.; ALCOFORADO, I. XANTINA E XANTINA OXIDASE DO ÁCIDO ÚRICO À GOTA. **REVISTA DE TRABALHOS ACADÊMICOS - UNIVERSO RECIFE**, v. 4, n. 2–1, 16 abr. 2018.

Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/pagina-inicial>>. Acesso em: 26 jul. 2022.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892–896, out. 2005.

MORETO, F. et al. The Higher Plasma Malondialdehyde Concentrations Are Determined by Metabolic Syndrome-Related Glucolipototoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. e505368, 24 jun. 2014.

NEHIR EL, S.; SIMSEK, S. Food Technological Applications for Optimal Nutrition: An Overview of Opportunities for the Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 2–12, 2012.

NUNES, C. DOS R.; DE ABREU, A. M. DE O. W. Influência dos radicais livres e envolvimento do processo inflamatório na aterosclerose. **Vértices (Campos dos Goitacazes)**, v. 14, n. 3, p. 53–70, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

OLIVEIRA, D. L.; ROCHA, C. ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS PARA A MERENDA ESCOLAR COM O USO DE PLANTAS DO CERRADO, PROMOVENDO EDUCAÇÃO AMBIENTAL. **REMEA - Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 21, 2008.

OTENIO, J. K. et al. Etnofarmacologia da *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr: Uma revisão / Ethnopharmacology of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr: A review. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 10206–10219, 4 mar. 2020.

PEREIRA, M. M. et al. Processamento e caracterização físico-química de biscoitos amanteigados elaborados com farinha de jatobá. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 10, n. 2, 27 dez. 2016.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45–61, maio 2002.

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. **A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain**. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf60219a031>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

RAHIM, M. Z. et al. Comparative analysis of the chemical constituents and in vitro antioxidant activities of different aqueous extracts of the *Cistanche phelypaea* (L.) Cout. from Algeria. **South African Journal of Botany**, v. 148, p. 259–267, 1 ago. 2022.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, p. 755–760, jul. 2006.

REIS, A. F.; SCHMIELE, M. Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 16 maio 2019.

REYFTMANN, J. P. et al. Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1042, n. 2, p. 159–167, 6 fev. 1990.

ROTH, G. A. et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 1–25, 4 jul. 2017.

SHIN, Y. et al. Fruit quality, antioxidant contents and activity, and antiproliferative activity of strawberry fruit stored in elevated CO₂ atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. S339–344, ago. 2008.

SILVA, C. P. D. et al. Chemical composition and antioxidant activity of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 597–603, set. 2014.

SOUSA, C. M. DE M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351–355, abr. 2007.

VIZZOTO, E. Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2017. 10p.

WANG, K. et al. Antioxidant activities of *Liquidambar formosana* Hance leaf extracts. **Medicinal Chemistry Research**, v. 19, n. 2, p. 166–176, 1 mar. 2010.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083–4089, ago. 2001.

ZOU, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268–2276, 23 mar. 2011.