



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE  
RESÍDUOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS E AVALIAÇÃO  
PARA O USO BIOTECNOLÓGICO**

**KLENICY KAZUMY DE LIMA YAMAGUCHI**

**MANAUS  
2015**

KLENICY KAZUMY DE LIMA YAMAGUCHI

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE  
RESÍDUOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS E AVALIAÇÃO  
PARA O USO BIOTECNOLÓGICO**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr Valdir Florêncio da Veiga Junior

Co-orientador: Prof. Dr Emerson Silva Lima

MANAUS  
2015

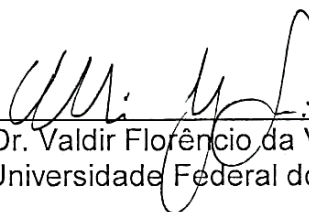
**“CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS  
DE RESÍDUOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS E  
AVALIAÇÃO PARA O USO BIOTECNOLÓGICO”**

Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada em 26 de agosto 2015

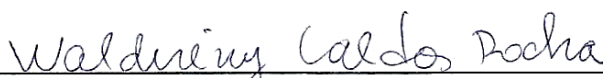
COMISSÃO EXAMINADORA



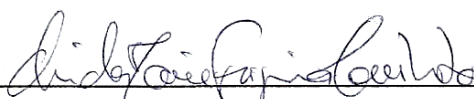
Prof. Dr. Valdir Florencio da Veiga Júnior  
Universidade Federal do Amazonas  
Orientador



Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit  
Membro (UFAM)



Prof.ª Dr.ª Waldireny Caldas Rocha  
Membro (Externo/UFAM Coari)



Prof.ª Dr.ª Olinda Maria Figueira Canhoto  
Membro (Externo/Natura)



Prof. Dr. Roberto Barbosa de Castilho  
Membro (UFAM).

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 26 de agosto 2015.

## Ficha catalográfica

Y19c Yamaguchi, Klenicy Kazumy de Lima  
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE  
RESÍDUOS DE FRUTOS AMAZÔNICOS E AVALIAÇÃO PARA O  
USO BIOTECNOLÓGICO / Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi.  
2015  
198 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior  
Coorientador: Emerson Silva Lima  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. frutos amazônicos. 2. resíduos. 3. fenólicos. 4. DESI. I. Veiga  
Junior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas  
III. Título

## RESUMO

A utilização de produtos naturais vem aumentando consideravelmente nos últimos anos devido às atividades biológicas relacionadas à sua composição química. Porém, um entrave para as pesquisas é a quantidade de matéria prima disponível para a produção em larga escala. Paralelo a isso, o consumo de frutas amazônicas vem conquistando espaço nos mercados nacional e internacional e os resíduos das indústrias de polpa estão crescendo proporcionalmente. Verifica-se que pouco é conhecido sobre a composição química desses subprodutos gerados e das atividades biológicas de seus extratos possam ter, sendo estes geralmente descartados em grandes quantidades, resultando em problemas ambientais e econômicos. No presente estudo analisou-se a composição dos extratos fenólicos de 19 frutos amazônicos, avaliando-se as atividades antioxidantes, bem como inibição enzimática, e antimicrobiana visando o uso biotecnológico. Os extratos mais promissores foram analisados de forma mais detalhada por meio da detecção e identificação das substâncias em técnicas cromatográficas e espectrométricas. As amostras foram gentilmente cedidas em diferentes cidades da região norte (Belém e Coari) e extraídas em etanol e etanol:água. As atividades antioxidante, citotóxica, enzimática, antimicrobiana e fotoprotetora foram analisadas por diferentes técnicas químicas e em células. Os extratos analisados neste estudo, obtidos como subprodutos da extração das polpas demonstram-se fontes de substâncias fenólicas e flavonoídicas, além de possuírem significativas atividades biológicas com baixa citotoxicidade, destacando-se os resíduos de açaí, bacuri e piquiá. Os extratos de piquiá apresentaram alta capacidade antioxidante, superior ao padrão quercetina, tanto nos testes *in vitro*, com  $CS_{50}$  de  $7,81 \pm 0,34 \mu\text{m} \cdot \text{mL}^{-1}$  para DPPH, e  $3,93 \pm 0,12 \mu\text{m} \cdot \text{mL}^{-1}$  para ABTS, quanto em célula ( $70,69 \pm 2,77\%$ ,  $79,89 \pm 6,50\%$  e  $79,48 \pm 8,6\%$  para cascas, polpas e sementes, respectivamente), bem como potencial para atividade antiinflamatória. Os extratos de diferentes açaís (*Euterpe precatoria* e *Euterpe oleracea*) e os extratos de bacuri (exocarpo e mesocarpo de *Platonia insignis*) foram otimizados quanto à metodologia e o melhor solvente de extração. Os extratos obtidos por maceração a frio e a quente com etanol apresentaram o melhor poder extrator das substâncias fenólicas, comparados com os extraídos em ultrasson. De forma geral, as metodologias testadas apresentaram diferentes proporções das substâncias, porém o mesmo perfil. A caracterização dos extratos foi realizada por espectrometria de massas, utilizando técnicas bidimensionais, com ionização DESI e CLAE. O extrato das sementes de *E. oleracea* e *E. precatoria* apresentaram perfis diferentes do que é comumente relatado para a polpa, destacando a presença de procianidinas, flavonoides e fenólicos como crisoeirol, ácido cafeico e ácido cumárico. Foram detectados mais de 50 íons em cada um dos extratos. No extrato do mesocarpo de *P. insignis* foram 71, onde detectou-se a presença de íons de flavonoides, procianidinas e isoflavonoides. Nos extratos de cascas de *Caryocar villosum* foram detectados e quantificados a presença de ácido elágico ( $1873,63 \pm 63,12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) e ácido gálico ( $1712,62 \pm 56,79 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) como os constituintes majoritários. Este estudo abre a perspectiva de agregar valor ao que é considerado descarte, devido à composição química e às atividades biológicas encontradas, diminuindo assim a contaminação ambiental por resíduos e contribuindo para a utilização sustentável de matérias primas amazônicas.

Palavras-chave: frutos amazônicos, resíduos, fenólicos, DESI.

## ABSTRACT

The use of natural products has increased in recent years because the biological activities related to its chemical composition. However, an obstacle to research is the amount of raw material available for large-scale production. Parallel to this, the consumption of Amazonian fruits has gained space in national and international markets and waste from pulp industries are growing proportionally. It appears that little is known about the chemical composition of these products generated and the biological activity of its extracts may have, which are usually discarded in large quantities, resulting in environmental and economic problems. In the present study we analyzed the composition of phenolic extracts of 19 fruits Amazon, evaluating the antioxidant activity, antimicrobial and enzyme inhibition aiming to biotechnological use. The most promising extracts were analyzed by means of the detection and identification of substances in chromatographic and spectrometric techniques. The samples were kindly provided in different cities of the Amazon northern region (Belem and Coari). Extracts were obtained in ethanol and ethanol: water. The antioxidant, cytotoxic, enzyme, antimicrobial and photoprotective activities were analyzed by different techniques: chemistry and in cell. The extracts analyzed in this study, obtained as by-products of the extraction of the pulp showed up sources of phenolic substances and flavonoidics, besides having significant biological activity with low cytotoxicity, highlighting the acai, bacuri and piquia waste. Piquia shell extracts showed free radicals scavenger capacity of ABTS ( $CS_{50}$ :  $3.93 \pm 0.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and DPPH ( $CS_{50}$ :  $7.81 \pm 0.34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), in cellular assays, with percentages of  $70.69 \pm 2.77\%$ ,  $79.89 \pm 6.50\%$  and  $79.48 \pm 8.6\%$  for shell, pulp and seed extracts, respectively, low cytotoxicity in human fibroblasts, but high at tumor strains, and also a high anti-inflammatory potential observed by the inhibition of nitric oxide production. Different extracts of the açai (*Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*) and bacuri extracts (exocarp and mesocarp of the *Platonia insignis*) have been optimized on the methodology and the best solvent extraction. The extracts obtained by cold and hot maceration with ethanol showed most efficient than ultrasound method. Methodologies analysed showed different proportions of the substances, but the same profile. The characterization of the extracts was performed by mass spectrometry using two-dimensional techniques, DESI ionization and HPLC. The extract of *E. oleracea* and *E. precatoria* seeds presented different profiles than is commonly reported to the pulp, highlighting the presence of procyanidins, flavonoids and phenolic as crisoieirol, caffeic and coumaric acid. More than 50 ions were detected in each of the extracts. *P. insignis* mesocarp was 71, which detects the presence of ions flavonoids, isoflavones and procyanidins. In extracts of *Caryocar villosum* shells were detected and quantified the presence of ellagic acid ( $1873.63 \pm 63.12 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) and gallic acid ( $1712.62 \pm 56.79 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) as the compounds major. This study opens the possibility of value adding to what is considered waste due to the chemical composition and biological activities found, thereby reducing environmental pollution by waste and contributing to the sustainable use of Amazonian raw materials.

Keywords: Amazonian fruits, waste, phenolic, DESI.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Biomoléculas do Amazonas (Q-BIOMA) no Departamento de Química , Laboratório de Extresse Oxidativo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Laboratório de Estatística (LABEST) na UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (Manaus-AM) e no Mass Spectrometry Laboratory (IFA's Lab) na York University em Toronto (Canadá), com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
Mas não esqueço de que minha vida  
É a maior empresa do mundo...  
E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
Se tornar um autor da própria história...

É atravessar desertos fora de si,  
mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma...  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!  
É ter segurança para receber uma crítica,  
Mesmo que injusta...

**Pedras no caminho?**

**Guardo todas, um dia vou construir um castelo”**

Fernando Pessoa

*“A vida, como a fizeres,  
estará contigo em  
qualquer parte.”*

Chico Xavier



*Dedico esta tese á minha amada mãe, Auxiliadora Yamaguchi por todo o exemplo, carinho e amor destinados a mim. Ela que abriu mão da minha companhia em prol da minha educação, sempre esteve presente em minha vida. Dedico-a todas as vitórias conquistadas ao longo dos anos.*

## AGRADECIMENTOS

O doutorado é um momento em que o tempo passa muito rápido, acompanhado de disciplinas, experimentos e prazos e o que acreditávamos que demorariam meses, na verdade não passam de alguns momentos que rapidamente chegam ao final. Devido a isso, acredito que a todo o momento devemos agradecer e dar valor às pessoas que estão ao nosso redor, pois não sabemos quanto tempo ficarão presentes na nossa vida. Os ensinamentos adquiridos durante todos esses 48 meses não podem ser mensurados nem expressos apenas nos resultados e discussão deste trabalho. Na tentativa de demonstra-los, eis meus agradecimentos:

A **Deus** por tantas bênçãos concedidas ao longo da minha vida. A todas as oportunidades que tive de crescer como pessoa e da força nos momentos mais difíceis, sempre demonstrando sinais de Seu infinito amor e de Suas orientações, confortando meu coração e colocando na minha vida pessoas que fazem a diferença;

À minha família, alicerce fundamental no decorrer dessa caminhada, em especial, a meus amados pais **Katsuo** e **Auxiliadora Yamaguchi** por terem me dado uma base de educação, caráter e amor. Vocês são a árvore e eu, apenas um fruto que reflete a criação que vocês deram para a nossa família. Certamente não seria possível sem a ajuda de vocês chegar até aqui! E olha que é apenas o começo...

Aos meus amados irmãos, **Kenne** e **Kendy Yamaguchi**, que mesmo estando em Coari (assim como toda a família) sempre estiveram perto de mim me dando força para continuar seguindo em frente e compartilhando os mais diversos momentos durante o doutorado. Aos manos **Willian** e **Géssica**, e meus cunhados **David**, **Antônia** e **Miro Yamaguchi** por me apoiarem e sempre terem palavras de conforto e incentivo;

A minha **madrinha Mariza** e **tia Nely** pelo carinho e cuidado recebido. Aos meus **tios** e **primos** por sempre torcerem por mim e pela energia positiva que vocês enviaram (e enviam) me dando força em todas as situações;

Aos meus amigos antigos, **Enio**, **Daiana Góes** e **Leandro**. Nessa correria que é o doutorado, vocês sempre estiveram comigo. As ligações, mensagens e visitas me fortaleceram e fizeram com que eu sempre me sentisse amada;

Ao **querido Leonardo Florisbal** pela força, paciência e compreensão nos momentos em esse trabalho ocupou a maior parte do meu tempo. Obrigada pelo companheirismo, incentivo e amor dedicado. Você é a sorte que a vida me deu.

Às lindas **Joelma Alcântara**, **Lidiam Maia** e **Priscilla Oliver**, que mesmo não estando mais tão perto, se fazem presente sempre! Vocês são o presente que Deus me deu. Eu não teria como selecionar tão bem pessoas tão especiais como vocês. Os conselhos, os incentivos, as brincadeiras e os momentos de descontração foram situações que guardarei para sempre. Obrigada pelos valerosos momentos;

À **Milena Campelo**, pelo companheirismo e amizade nessa trajetória cheia de pedras, que nem sempre lembramos que fazem parte do castelo;

Ao parceiro de todas as coletas e de inúmeras dificuldades... **Victor Lamarão**;

Aos meninos **Isadora Mota, Yasmin Cunha, Alanne, Larissa, Priscila, Leandro, Débora Raquel e Felipe Ravazi**, meus filhos de coração; A **Olinda, Frederico, Rosiane, Rosilene, Alcilene, Marcos Tulio, Nilma, Jesika, Orlando** pelo companheirismo e amizade nos momentos descontraídos no laboratório.

**Ao professor Valdir Veiga pelo carinho**, confiança e incentivo nos momentos em que é tão difícil conseguir ver os motivos que nos levam a trajetória de um caminho...principalmente quando pensamos que não temos mais força para percorre-lo. Por ser muito mais que um orientador, por ser meu padrinho (literalmente!). Sempre com seu ombro amigo, seu abraço acolhedor e seus valorosos conselhos me acompanhando desde a iniciação científica. Realmente fazer ciência não é fácil, mas um dia eu aprendo!

**Ao grupo de pesquisa Q-Bioma** como um todo, a todos os membros. Somos uma família científica e mesmo com todas as diferenças, a união e o respeito sempre prevalecerão.

Aos professores **Afonso Duarte e Rita Nunomura** pela amizade, carinho, valorosos conselhos e incentivos. Vocês moram no meu coração. Obrigada por estarem na minha vida. Aos professores **Roberto Castilho, Genilson Santana e Marcos Batista**

**Ao laboratório de Estatística Labest**, em especial ao prof. **Max Lima e David Dias** pela atenção e paciência nas orientações das análises estatísticas.

Aos queridos **Rodrigo, Lucileno, Arleilson e Patrícia** por todo o acolhimento e pelo companheirismo na Faculdade de Farmácia; professora **Marne Vasconcellos** pelo incentivo dado a cada "Bom dia" e em cada vitoria que era feita no final da tarde da FCF;

**Ao professor Emerson Silva** que me tirou da zona de conforto e acreditou no meu trabalho. Muito obrigada por todo o incentivo no decorrer desses anos. Ser sua orientanda trouxe ensinamentos que vou levar comigo pra onde eu for;

**Ao professor Demian Rocha Ifa** pela grande oportunidade de aprendizado durante todo o doutorado sanduiche. Cada café compartilhado foi sinônimo de muito aprendizado. Obrigada pelo exemplo de humildade e profissionalismo que recebi todo o tempo que estivesse ao seu lado.

Aos companheiros do doutorado sanduiche **Paulo Yamasaki e Consuelo Perez** pela amizade e recepção...

Em especial, à querida **Alessandra Tata e Michel Campos** que fortaleceram a minha tese de que existem pessoas boas em qualquer lugar do mundo, dispostas a auxiliar sem intensões. Obrigada por todo o apoio e incentivo. Espero um dia poder ajudar alguém assim como vocês me auxiliaram e passar esse ensinamento de bondade para frente.

Aos queridos primos **Iara Ganzer e Marcelo Apolinario** pelo companheirismo e amizade. Não há como agradecer em algumas palavras todo o carinho que sinto. Somente Deus, com todo o seu amor, poderia me dar a oportunidade de convívio e aprendizado que tive durante o tempo que morei com vocês;

**A caminhada é longa, mas os passos já estão sendo dados...**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sementes de (A) <i>E. precatoria</i> e (B) <i>E. oleracea</i> .....	13
<b>Figura 2:</b> Estrutura química de substâncias isoladas de cascas de bacuri.....	15
<b>Figura 3:</b> Substâncias químicas detectadas e/ou isoladas de piquiá.....	17
<b>Figura 4:</b> Padrão de oxidação típicos das vias metabólicas. A: via do acetato e B) via do ácido chiquímico.....	19
<b>Figura 5:</b> Exemplo da biossíntese de fenólicos oriundos da via do acetato. ....	19
<b>Figura 6:</b> Formação do ácido chiquímico.....	20
<b>Figura 7:</b> Estrutura básica dos flavonoides.....	21
<b>Figura 8:</b> biossíntese geral dos flavonoides.....	22
<b>Figura 9:</b> Estrutura química do ácido hialurônico.....	26
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do poder de penetração da radiação solar nas camadas da pele.....	27
<b>Figura 11:</b> Exemplos de substâncias químicas utilizadas como filtros solares em (A) UVB, (B) UVA e (C) amplo espectro. ....	28
<b>Figura 12:</b> ciclo oxidativo do ascorbato.....	31
<b>Figura 13:</b> Estruturas químicas de antioxidantes fenólicos.....	32
<b>Figura 14:</b> Modelo de ionização por <i>electrospray</i> .....	36
<b>Figura 15:</b> Esquema de seleção do íon precursor e de sua formação.....	37
<b>Figura 16:</b> Fonte de ionização do tipo DESI. A) Ilustração do processo e B) Espectrômetro de massa com DESI. ....	38
<b>Figura 17:</b> Redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil a 1,1-difenil-2-picrilhidrazila.....	45
<b>Figura 18:</b> Estabilização do radical ABTS <sup>+</sup> por um antioxidante.....	46
<b>Figura 19:</b> Formação do formazan a partir do NBT.....	47
<b>Figura 20:</b> Frutos amazônicos.....	63
<b>Figura 21:</b> Microfotografia de extrato seco por aspersão de <i>Maytenus ilicifolia</i> 500 e 2000x .....	66

<b>Figura 22:</b> Extrato de carambola seco por aspersão.....	66
<b>Figura 23:</b> Atividade antimicrobiana pelo método de difusão.....	74
<b>Figura 24:</b> Ilustração da análise da CIM dos extratos.....	76
<b>Figura 25:</b> Espectro de absorção dos extratos de resíduos em concentração de 1,00 mg.mL <sup>-1</sup> .....	92
<b>Figura 26:</b> Espectro de absorção dos extratos diluídos em 1,00 mg.mL <sup>-1</sup> , 0,50 mg.mL <sup>-1</sup> e 0,25 mg.mL <sup>-1</sup> .....	93
<b>Figura 27:</b> Espectro do perfil das extrações de BAE por espectrometria de massas.....	123
<b>Figura 28:</b> ácido caféico.....	125
<b>Figura 29:</b> Espectro do perfil das extrações de BAM por espectrometria de massas.....	126
<b>Figura 30:</b> Estrutura das substâncias correspondentes aos íons moleculares detectados nos extratos de BAM.....	128
<b>Figura 31:</b> Espectro do perfil das extrações de <i>E. precatória</i> por espectrometria de massas.....	129
<b>Figura 32:</b> Estrutura das substâncias com massas características de picos detectados nas extrações de <i>E. precatória</i> .....	131
<b>Figura 33:</b> Espectros do perfil das extrações de <i>E. oleracea</i> por espectrometria de massas.....	132
<b>Figura 34:</b> Imagem óptica em em HPTLC-UV de compostos de extrato de <i>E. precatória</i> 100 mg/mL. (A) Imagem após a eluição com a mistura de solvente I para cima. (B) Imagem após a eluição utilizando a mistura de solventes I para cima seguido de eluição usando mistura de solventes II para a direita. ....	134
<b>Figura 35:</b> Ilustração da localização dos íons detectados por DESI-MS da placa de HPTLC 2D. (A) modo positivo. (B) Modo negativo. ....	135
<b>Figura 36:</b> Íons detectados por DESI-EM de <i>E. precatória</i> .....	136

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividades biológicas de espécies de <i>Euterpe</i> .....	12
<b>Tabela 2:</b> Esqueleto básico de alguns compostos fenólicos.....	18
<b>Tabela 3:</b> Nome científico, partes utilizadas e as datas da obtenção do material.....	42
<b>Tabela 4:</b> Rendimento dos extratos (%).....	64
<b>Tabela 5:</b> Inibição enzimática dos extratos.....	68
<b>Tabela 6:</b> Percentagem de inibição das enzimas teciduais dos extratos.....	72
<b>Tabela 7:</b> Lista dos microorganismo testados.....	73
<b>Tabela 8:</b> Atividade antimicrobiana dos extratos.....	74
<b>Tabela 9:</b> Critério de avaliação da atividade antimicrobiana.....	75
<b>Tabela 10:</b> Valores das concentrações inibitórias mínimas dos extratos.....	76
<b>Tabela 11:</b> Resumo dos testes espectrofotométricos dos extratos hidroalcoolicos (6:4 etanol:água), na proporção 10% (m/v).....	81
<b>Tabela 12:</b> Resumo dos testes espectrofotométricos dos extratos em etanol, na proporção 10% (m/v).....	82
<b>Tabela 13:</b> Percentagem da atividade antioxidante em linhagem celular dos extratos em concentração de 20 µg/mL.....	87
<b>Tabela 14:</b> Perfil de absorção de extratos hidroalcoólicos e etanólicos na concentração 1,00 mg.mL <sup>-1</sup> .....	91
<b>Tabela 15:</b> Resultados das análises de otimização das sementes de <i>E. oleraceae</i> .....	102
<b>Tabela 16:</b> Matriz de correlação dos erros referentes as variáveis respostas das extrações de sementes de <i>E. oleraceae</i> .....	103
<b>Tabela 17:</b> ANOVA para os valores dos rendimentos, fenólicos e flavonoides dos extratos dos resíduos de nos fatores método de extração e solvente. Efeitos com valor-p < 0,05 são considerados significativos; gl = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio.....	103
<b>Tabela 18:</b> Rendimento dos diferentes parâmetros dos métodos de extração de <i>E. oleraceae</i> . Interações com letras iguais não diferem significativamente entre si.....	108

<b>Tabela 19:</b> Resultados da quantificação da capacidade antioxidante dos melhores parâmetros dos métodos de extração.....	108
<b>Tabela 20:</b> Resumo dos resultados das análises de otimização de <i>E. precatória</i> .....	110
<b>Tabela 21:</b> Matriz de correlação dos erros referentes a <i>E. precatória</i> .....	110
<b>Tabela 22:</b> Resumo dos resultados das análises de otimização de mesocarpo de <i>P. insignis</i> .....	114
<b>Tabela 23:</b> Matriz de correlação dos erros referentes ao Bacuri amarelo (mesocarpo).....	115
<b>Tabela 24:</b> Resumo dos resultados das análises de otimização do epicarpo de bacuri.....	118
<b>Tabela 25:</b> Matriz de correlação dos erros referentes ao Bacuri amarelo (endocarpo).....	118
<b>Tabela 26:</b> Intensidade dos picos majoritários (m/z) das extrações de BAE.....	124
<b>Tabela 27:</b> Percentual da intensidade dos picos majoritários das extrações de BAM por espectrometria de massas.....	127
<b>Tabela 28:</b> Percentual da intensidade dos picos majoritários das extrações de <i>E. precatória</i> por espectrometria de massas.....	130
<b>Tabela 29:</b> Percentual dos picos majoritários das extrações de <i>E. oleracea</i> por espectrometria de massas.....	133
<b>Tabela 30:</b> Sugestão das substâncias presentes em <i>Euterpe precatória</i> por espectrometria de massas (DESI-EM).....	137

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Brasil – Variação do PIB e do mercado de cosméticos – 2000 a 2011.....	8
<b>Gráfico 2:</b> Espectro de absorção UV dos filtros (A) p-metoxicinamato de 2 etil-hexila e (B) 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)propano-1,2-dionaobenzona.....	29
<b>Gráfico 3:</b> Rendimento de extratos.....	63
<b>Gráfico 4:</b> Percentagem de inibição de $\alpha$ -amilase em concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	69
<b>Gráfico 5:</b> Percentagem de inibição das enzimas digestivas em concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	71
<b>Gráfico 6:</b> Percentual de fenólicos e flavonoides totais dos extratos.....	79
<b>Gráfico 7:</b> Capacidade de varredura dos radicais ABTS dos extratos.....	83
<b>Gráfico 8:</b> Capacidade de varredura dos radicais DPPH dos extratos.....	84
<b>Gráfico 9:</b> Atividade antioxidante pelo método de $\beta$ -caroteno.....	85
<b>Gráfico 10:</b> Correlação da atividade antioxidante (DPPH) e fenóis totais.....	86
<b>Gráfico 11:</b> Percentagem da atividade antioxidante em linhagem celular dos extratos em concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ .....	88
<b>Gráfico 12:</b> Percentual médio de substâncias extraídas por cada resíduo.....	101
<b>Gráfico 13:</b> Influencia do solvente nas metodologias para os resultados de A) Rendimento; B) compostos fenólicos, C) antioxidante frente ao DPPH e D) em radical ABTS de <i>E. oleraceae</i> .....	104
<b>Gráfico 14:</b> Gráfico de superfície de resposta para A) Rendimentos, B) fenólicos totais, C) DPPH e ABTS de <i>E. oleraceae</i> .....	105
<b>Gráfico 15:</b> Interação solvente-método no percentual dos rendimentos dos extratos brutos das sementes de <i>E. precatória</i> .....	111
<b>Gráfico 16:</b> Gráfico de interação solvente-método dos extratos brutos das sementes de <i>E. precatória</i> .....	112
<b>Gráfico 17:</b> Interação solvente-método no percentual do rendimento dos extratos brutos do mesocarpo de <i>P. insignis</i> .....	115
<b>Gráfico 18:</b> Gráfico de interação solvente-método no percentual de fenóis totais dos extratos brutos do mesocarpo de <i>P. insignis</i> .....	116
<b>Gráfico 19:</b> Gráfico de interação solvente-método no percentual de rendimento dos extratos brutos do epicarpo de <i>P. insignis</i> .....	119
<b>Gráfico 20:</b> Gráfico de interação solvente-método no percentual de fenóis totais dos extratos brutos do epicarpo de <i>P. insignis</i> .....	120



**LISTA DE SIGLAS**

**ABTS<sup>•+</sup>** – 2, 2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato

**Abs** - Absorbância

**AcOEt** - Acetato de etila

**ANOVA** – Análise de Variância Univariada

**BAE** – bacuri amarelo epicarpo

**BAM** – bacuri amarelo mesocarpo

**BIOPHAR I** – Laboratório de Atividades Biológicas e Farmacêuticas I

**CBM** - Concentração bactericida mínima

**CC** - Cromatografia em coluna

**CCD** - Cromatografia em camada delgada

**CS<sub>50</sub>** - Concentração do extrato necessária para decrescer a concentração inicial em 50%

**DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

**CLAE-UV** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta

**CHCl<sub>3</sub>** - Clorofórmio

**CIM** - Concentração inibitória mínima

**CLAE** – Cromatografia Líquida de alta eficiência

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

**EM** – Espectrometria de massas

**EtOH** - Etanol

**Hex** – Hexano

**IV** - Infravermelho

**MeOH** - Metanol

**NP/PEG** - Difenilaminoborato/polietileloglicol

**MANOVA** – Análise de variância multivariada

**MF** – maceração a frio

**MQ** – maceração a quente

**SON** – sonicação

**UV** - Radiação ultravioleta

**UV-Vis** - Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	04
2.1 OBJETIVO GERAL.....	05
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	05
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	06
3.1 FRUTOS AMAZÔNICOS E SEUS RESÍDUOS.....	07
3.1.1 AÇAÍ .....	11
3.1.2 BACURI.....	14
3.1.3 PIQUIÁ.....	16
3.2 FENOIS E FLAVONOIDES.....	18
3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	23
3.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	23
3.3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	24
3.3.3 FOTOPROTEÇÃO.....	27
3.3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	29
3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	34
3.4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS – DESI E ESI .....	34
<b>4. METODOLOGIAS</b> .....	40
4.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	40
4.1 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	42
4.2 BIOENSAIOS.....	44
4.2.1.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
4.2.1.1 VARREDURA DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH•).....	44
4.2.1.2 VARREDURA DO RADICAL ABTS+•.....	46

4.2.1.3 SUPERÓXIDO.....	46
4.2.1.4 SISTEMA CAROTENO / ÁCIDO LINOLEICO.....	48
4.2.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR.....	48
4.2.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	49
4.2.3.1 ENZIMAS TECIDUAIS.....	49
4.2.3.1.1 TIROSINASE.....	49
4.2.3.1.2 HIALURONIDASE.....	50
4.2.3.1.3 COLAGENASE.....	50
4.2.3.2 ENZIMAS DIGESTIVAS.....	50
4.2.3.2.1 $\alpha$ -AMILASE.....	50
4.2.3.2.2 LIPASE.....	51
4.2.3.2.3 $\alpha$ -GLICOSIDASE.....	52
4.2.4 ENSAIOS EM CÉLULA.....	53
4.2.4.1 ANTIOXIDANTE EM CÉLULA.....	53
4.2.4.1.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	53
4.2.4.1.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
4.2.4.2 CITOTOXICIDADE.....	54
4.2.4.2.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	54
4.2.4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO.....	54
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS.....	55
4.3.1 FENÓIS TOTAIS.....	55
4.3.2 FLAVONOIDES TOTAIS.....	55
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS EXTRAÇÕES DE FENÓLICOS.....	57
4.4.1 SONICAÇÃO.....	57
4.4.2 MACERAÇÃO.....	58
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59

4.6 CARACTERIZACAO QUIMICA.....	60
4.6.1 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS.....	60
4.6.1.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	60
4.6.1.2 IMAGEM DE PLACAS DE HPTLC.....	60
4.6.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	61
4.6.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	61
4.6.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	61
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
5.1 RESIDUOS AMAZONICOS E SUAS BIOATIVIDADES.....	63
5.2 ENZIMAS DIGESTIVAS.....	67
5.3 TIROSINASE E COLÁGENASE.....	71
5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	73
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS: FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	78
5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....	84
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CÉLULA.....	87
5.8 FOTOPROTEÇÃO.....	90
5.9 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS.....	97
5.9.1. AÇAÍ DO PARÁ ( <i>E. oleraceae</i> ).....	102
5.9.2 AÇAÍ DO AM ( <i>E. precatoria</i> ).....	110
5.9.3 BACURI ( <i>P. insignis</i> ) – MESOCARPO.....	114
5.9.4 BACURi ( <i>P. insignis</i> ) – EPICARPO.....	117
5.10 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	122
5.10.1 PERFIL DAS EXTRAÇÕES DE BAE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	123

5.10.2 PERFIL DAS EXTRAÇÕES DE BAM POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	126
5.10.3 PERFIL DAS EXTRAÇÕES DE E. PRECATORIA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	129
5.10.4 PERFIL DAS EXTRAÇÕES DE E. OLERACEA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	132
5.11 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR DESI-EM EM HPTLC.....	134
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>166</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>142</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>166</b>
8.1 ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AMAZON FRUITS (Capítulo de livro publicado no Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine - Vol 2)	
8.2 AMAZON ACAI: CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES: A REVIEW (Artigo I - publicado na revista FOOD CHEMISTRY)	
8.3 QUÍMICA E FARMACOLOGIA DO BACURI ( <i>Platonia insignis</i> ).. (Artigo II - publicado na revista SCIENTIA AMAZONIA)	
8.4 AMAZONIAN BIOREFINARIES: FROM FRUIT WASTE TO ANTIOXIDANT SUPPLEMENTS (Artigo III - submetido a revista FOOD RESEARCH)	
8.5 HPLC-DAD PROLIFE OF PHENOIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT, CITOTOXICITY AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF THE AMAZON FRUIT PIQUIA ( <i>Caryocar villosum</i> ) (Artigo VII - revista QUIMICA NOVA)	
8.6 AVALIACAO IN VITRO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE RESÍDUOS DE FRUTAS AMAZONICAS (Artigo IV - submetido a revista SCIENTIA AMAZONIA)	128
8.7 APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS COM PUBLICAÇÃO DE RESUMOS	
8.8 CAPÍTULOS DE LIVROS E ARTIGOS PUBLICADOS	
8.9 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO E ARTIGOS EM ANDAMENTO / SUBMETIDOS	



# 1. INTRODUÇÃO

A tendência de envelhecimento da população e a busca por uma vida melhor e mais saudável reforçam a valorização do uso de produtos naturais como uma das grandes alternativas para as pesquisas científicas. O Brasil é um dos países mais privilegiados em biodiversidade em todo o mundo, sendo um dos grandes produtores mundiais de frutas. Nesse contexto, a região Amazônica destaca-se pela quantidade de frutas exóticas consideradas ricas em substâncias bioativas, como os fenólicos e os flavonoides, que estão sendo associados a benefícios para a saúde (Paz *et al.*, 2015, Rabelo, 2012; Barreto *et al.*, 2009).

Espécies como açaí (*Euterpe oleraceae* Mart), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* L.), bacuri (*Platonia insignis* Mart), guaraná (*Paulinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) e tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) estão em alta no mercado da fruticultura e geram resíduos que ultrapassam o percentual de matéria utilizada para o consumo (Barros *et al.*, 2015, Canuto *et al.*, 2010). Estudos vêm demonstrando que alguns nutrientes e substâncias antioxidantes se concentram majoritariamente nas cascas e nas sementes, que são os principais subprodutos gerados no processamento e despulpamento de frutas (Berto *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2008; Roesler *et al.*, 2007)

Algumas sementes são utilizadas por pequenas indústrias na produção de semijóias, biodiesel, carvão e rações para peixe. Verifica-se, porém, que uma parte considerável deste material, assim como os resíduos oriundos das cascas, são descartados sem nenhum estudo prévio sobre as propriedades de seus constituintes e suas possíveis atividades biológicas, tornando-se fonte de contaminação de rios e florestas (Sousa *et al.*, 2011a e 2011b).

Uma das dificuldades encontradas para o desenvolvimento das indústrias de biotecnologia é a quantidade de matéria prima disponível para a produção em larga

escala. Os produtos naturais precisam ser obtidos sustentavelmente, de forma que a industrialização não afete a natureza e prejudique o equilíbrio ecológico.

Calcula-se que do total de frutas processadas para a produção de sucos e polpas, 30 a 40% sejam de resíduos agroindustriais. Como a quantidade de resíduos pode chegar a muitas toneladas, agregar valor a esses produtos é de interesse econômico e ambiental, necessitando de investigação científica e tecnológica que possibilite seu uso (Schieber *et al.*, 2001).

Nesse contexto, pesquisas relacionadas ao aproveitamento destes subprodutos da fruticultura estão sendo conduzidas com o intuito de investigar a sua composição química, valorizando-os e sugerindo novas alternativas de utilização, minimizando o desperdício e possibilitando a geração de produtos biotecnológicos (Berto *et al.*, 2015). Propõe-se então um estudo dos extratos de 21 frutas (cascas e/ou sementes), visando a caracterização da composição de substâncias fenólicas e flavonoídicas e bioensaios para avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana, e enzimática dos extratos e frações.

Considerando as elevadas taxas de produção de resíduos agroindustriais gerados a partir das frutas e a importância de substâncias bioativas em aplicações biotecnológicas para a saúde da população, seu estudo fitoquímico aliado a bioensaios é útil para o aproveitamento em massa dessas matérias primas, com a perspectiva de uma melhor utilização das mesmas, agregando valor aos resíduos e aos seus possíveis produtos.





## 2. OBJETIVOS

## 2.1 GERAL

- Caracterizar a composição fenólica de subprodutos da indústria de fruticultura da Amazônia para uso biotecnológico.

## 2.2 ESPECÍFICO

- 2.2.1 Avaliar a quantidade de fenóis e flavonoides totais e as atividades antioxidantes *in vitro* e em células dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de resíduos de frutas;
- 2.2.2 Avaliar a atividade antimicrobiana em relação a 30 patógenos de interesse da Amazônia e potencial fotoprotetor dos extratos;
- 2.2.3 Avaliar o potencial de inibição de enzimas de importância cosmética e/ou econômica: tirosinase, colagenase, hialuronidase,  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase;
- 2.2.4 Avaliar a citotoxicidade dos extratos em células normais e células cancerígenas;
- 2.2.5 Otimizar a extração de substâncias fenólicas e flavonoídicas em diferentes metodologias por análise estatística de superfície de resposta;
- 2.2.6 Caracterizar quimicamente os extratos de açaí (*Euterpe oleracea* e *E. precatoria*), bacuri (*Platonia insignis*) e piquiá (*Caryocar villosum*) por métodos espectrométricos e espectroscópicos;



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 FRUTAS AMAZÔNICAS E SEUS RESÍDUOS

No decorrer do tempo, o homem veio a descobrir que as frutas possuíam não só um grande valor nutritivo, mas também efeito medicinal e cosmético, estando atualmente entre os maiores agentes terapêuticos obtidos da natureza (Iha *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2007). A utilização de frutas amazônicas devido às suas propriedades terapêuticas é descrita na literatura desde longas décadas, como o consumo de guaraná (*Paullinia cupana*) e de castanha-da-Amazônia (*Bertholletia excelsa*) pelos índios amazônicos por séculos (Rodrigues *et al.*, 2007; Souza, 2006).

O sabor e as propriedades químicas das substâncias presentes nas polpas desses frutos contêm diferentes constituintes e tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisas devido às propriedades biológicas que podem estar relacionadas com atividades benéficas para o organismo humano como a prevenção e uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas ( Berto *et al.*, 2015; Paz *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2008 ).

Nos últimos anos estão sendo associados aos cosméticos substâncias que visem o benefício da saúde humana. Esses produtos, identificados como cosméticos, mas que tratam ou previnem doenças ou, ainda, que afetam a estrutura ou função da pele humana, são considerados como cosmecêuticos (Kligman, 2005). O Brasil apresenta a terceira posição em consumo de cosméticos em geral, tornando-se um dos maiores do mundo. Em termos relativos, o mercado brasileiro de cosméticos tem apresentado crescimento constante, superando a própria dinâmica da economia nacional (gráfico 1) (IBGE, 2013; ABIHPEC, 2013 apud Herculano, 2013).

Essas atividades biológicas estão sendo correlacionadas a substâncias bioativas, como os fenóis e flavonoides, o que tem incentivado a pesquisas de produtos naturais para a elaboração de novos produtos na área de cosméticos. Entre os ativos, podem ser destacados os agentes despigmentantes, retinóides, filtros solares, vitaminas, antioxidantes, minerais e hidratantes (Monteiro e Baumann, 2008).

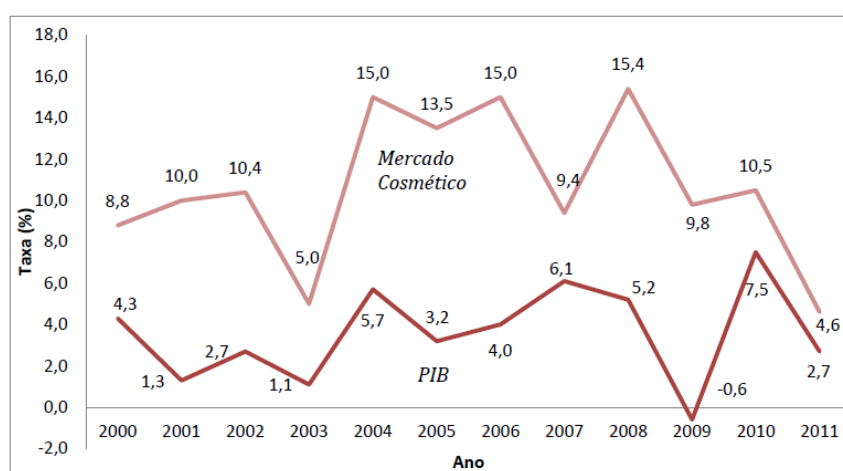


Gráfico 1: Brasil – Variação do PIB e do mercado de cosméticos – 2000 a 2011. Fonte: ABIHPEC (2013) apud Herculano, 2013.

As frutas amazônicas recebem destaque devido às atividades biológicas que estão sendo relatadas nas pesquisas, que aliados à composição química estimulam varreduras que possam selecionar os mais promissores para estudos mais aprofundados em busca de produtos aplicáveis biotecnologicamente. Verifica-se, no entanto, que um dos entraves para a utilização industrial dos produtos da Amazônia é a quantidade de matéria prima disponível para que possam ser produzidos em larga escala. Na região amazônica, diversas matérias primas foram utilizadas ao longo dos anos, porém pelo fato destas não apresentarem sustentabilidade, acabaram sofrendo redução e algumas árvores entraram para a lista de espécies em extinção, como é o caso de pau rosa, pau brasil, entre outros (Rizzini e Mors, 1995).

É considerável a produção de resíduos de origem vegetal na região amazônica provenientes do despulpamento de frutos. Segundo Demajorovic (1995), esses resíduos diferenciam-se do termo lixo, pois apresentam valor agregado por possibilitarem o reaproveitamento no próprio processo produtivo. Esses subprodutos podem proporcionar outra fonte de valor à indústria de processamento uma vez que são geralmente descartados em grandes quantidades, sendo potencialmente causadores de prejuízos ao meio ambiente. Assim, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico e ambiental, sendo necessárias investigações científicas e tecnológicas que possibilitem sua utilização (Sena e Nunes, 2006; Martins e Farias, 2002).

Os subprodutos da indústria de frutas da região vêm sendo testados com a finalidade de verificar seu desempenho em alimentos de peixes, como por exemplo, a semente do araçá-boi (*Psidium araçá* R.), o resíduo do jenipapo (*Genipa americana* L.), de camu-camu (*Myrciaria dúbia* (HBK) McVaugh) e de acerola (*Malpighia glabra* L.). Outras finalidades são adubo para vegetais e suplementos alimentares, porém em baixa escala e sem estudos mais aprofundados sobre a composição química (Oliveira *et al.*, 2009b; Anselmo, 2008; Sena e Nunes; 2006; Silva *et al.*, 2000, Roubach, 1991).

Estudos recentes têm demonstrado que as frutas são ricas em muitos nutrientes e substâncias antioxidantes, e que esses constituintes se concentram majoritariamente nas cascas e sementes, frações normalmente desprezadas durante o consumo *in natura* ou nas formulações caseiras de compotas, sorvetes e outras (Sousa *et al.*, 2011a e 2011b; Roesler *et al.*, 2007).

A casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) apresentou maior valor de substâncias fenólicas nos extratos etanólico e aquoso, em comparação com o da polpa,

possuindo excelente capacidade de seqüestrar radicais livres (Roesler *et al.*, 2007). Na amêndoa detectou-se elevada quantidade de óleo comestível, rico em vitamina A, de interesse para a indústria cosmética e de alimentos (Siqueira *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2010; Soares Júnior *et al.*, 2010; Perez, 2004).

No trabalho realizado por Sousa e colaboradores (2011), com resíduos de seis frutas, alguns extratos, como o de acerola (*Malpighia emarginata*) e goiaba (*Psidium guajava*), apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superiores à de alimentos com reconhecida atividade antioxidante. No artigo de revisão de Oliveira e colaboradores (2009b) foram reunidos resultados de fontes naturais atrativas de antioxidantes a partir de resíduos da indústria alimentícia. Estes resíduos, apesar de possuírem em sua composição vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes são desperdiçados na maioria das fábricas. Porém, poderiam ser utilizados como antioxidantes, antimicrobianos e dermocosméticos, minimizando os efeitos ambientais e gerando uma nova fonte de renda para os produtores rurais.

A diversidade de princípios ativos presentes nas espécies Amazônicas indica grande potencial de aproveitamento industrial, sobretudo, das espécies nativas. Foi realizado um levantamento das principais frutas Amazônicas e a atividade antioxidante relacionada aos constituintes químicos. Esse trabalho resultou na publicação de um capítulo de livro publicado pela editora DAYA PUBLISHING HOUSE, NEW DELHI, 2014, como o primeiro resultado desta tese. O resumo desta publicação, assim como os dados relacionados a esse capítulo encontram-se no **ANEXO 1.**

### 3.1.1 AÇAÍ

O gênero *Euterpe* possui cerca de 28 espécies localizadas nas Américas Central e do Sul, estando distribuídas por toda bacia Amazônica. As três espécies que ocorrem com maior frequência são *E. oleracea*, *E. edulis* e *E. precatoria*. No entanto, só duas espécies são exploradas comercialmente, *E. precatoria* e *E. oleracea*. Uma das principais diferenças entre os dois açaís, está no hábito de crescimento das plantas. *E. precatoria* é uma espécie nativa do estado do Amazonas, conhecida popularmente como “açaí do Amazonas” e encontrada na bacia do Solimões, em terreno de terra firme e área de baixio (Almeida *et al.*, 2004; Cavalcante, 1996).

*E. oleracea*, conhecida popularmente como “açaí do Pará”, é encontrada, sobretudo, em terrenos de várzea e igapó. É multicaule, diferentemente da *E. precatoria* que é unicaule. Espécie nativa da Amazônia, tem suas maiores populações concentradas nas florestas da Amazônia Oriental, principalmente, nos Estados do Pará, Amapá e Maranhão (Cavalcante, 1996; Muñiz-Miret *et al.*, 1996).

Estas espécies tem alto potencial econômico, principalmente pelo uso de seus frutos na preparação do “vinho de açaí” que são exportados para todo o mundo como energéticos. A polpa deste fruto tem sido objeto de estudos em função do valor nutritivo, sendo considerado um alimento nutracêutico face ao elevado teor de substâncias bioativas (Costa *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2011; Sabbe *et al.*, 2009).

O açaí demonstra benefícios à saúde associados à composição química. Devido a isso, uma quantidade considerável de atividades biológicas é descrita para as espécies desse gênero, principalmente para *E. oleracea* (tabela 1). A atividade antioxidante, vasodilatadora e antiinflamatória da polpa é a mais avaliada por meio



de diferentes testes, desde a varredura de radicais *in vitro* até em modelos celulares e plasma humano, sugerindo uma possibilidade do uso do açaí como planta medicinal (Costa *et al.*, 2013; Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2007).

Tabela 1: Atividades biológicas de espécies de *Euterpe*.

Espécie	Atividade biológica	Referências
<i>E. oleracea</i>	Antioxidante Atividade antiproliferativa Efeito vasodilatador Atividade anticociceptiva Antiinflamatória Citotoxicidade em células cancerígenas	[1-14] [15-17] [18] [19-20] [14, 21-24] [25]
<i>E. precatoria</i>	Antioxidante Antiinflamatória	[14, 26] [14]

[1] Matheus *et al.*, 2003; [2] Hassimitto, *et al.*, 2005; [3] Schauss *et al.*, 2006; [4] Lichtenthäler *et al.*, 2005; [5] Mertens *et al.*, 2006; [6] Rodrigues *et al.*, 2006; [7] Chin *et al.*, 2008; [8] Santos *et al.*, 2008; [9] Mertens-Talcott *et al.*, 2008; [10] Spada *et al.*, 2009; [11] Ribeiro *et al.*, 2010; [12] Rojano *et al.*, 2011; [13] Rufino *et al.*, 2011; [14] Kang *et al.*, 2012; [15] Del Pozo-Insfra *et al.*, 2006; [16] Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; [17] Hogan *et al.*, 2010; [18] Rocha *et al.*, 2007; [19] Marinho *et al.*, 2002; [20] Favacho *et al.*, 2011; [21] Schauss *et al.*, 2006; [22] Xie *et al.*, 2012; [23] Kang *et al.*, 2011; [24] Noratto *et al.*, 2011; [25] Fragoso, *et al.*, 2013; [26] Galotta *et al.*, 2008 e 2005;

Na colheita, pode-se diferenciar as espécies por meio das características botânicas, porém ao ser preparado para consumo, não é possível ter a certeza sobre o tipo de açaí que está sendo consumido. Sabe-se que as espécies de *E. oleracea* são comumente encontradas na região paraense, enquanto que na amazonense prevalece as espécies de *E. precatória*, porém, não há distinção para a vendas da polpa, sendo vendidos apenas como “açaí”.

Há poucos estudos diferenciando as espécies. De forma geral, caracterizam-se quimicamente por apresentarem substâncias fenólicas como ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas (Kang *et al.* 2011; Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Del Pozo-Insfran *et al.* 2006; Kuskoski *et al.*, 2006).



Figura 01: Sementes de (A) *E. precatoria* e (B) *E. oleracea*.

A polpa de corresponde a cerca de 10% do peso final, resultando em 85-95% de resíduos que são descartados (Yuyama *et al.*, 2011; Pompeu *et al.*, 2009). Atualmente, este subproduto vem sendo utilizado como adubo para plantas e biojóias. Algumas pesquisas sugerem a utilização como fonte de fibras para alimentos e fonte de energia. Verifica-se, porém, que são escassos os estudos químicos e biológicos com este material e que mesmo com essas finalidades, a quantidade de material descartada é superior à que é utilizada, tornando-se assim um problema ambiental (Martins *et al.*, 2009; Tinoco, 2005). Levando-se em consideração que a polpa dessas espécies é rica em substâncias bioativas, o estudo sobre a composição química das sementes torna-se uma oportunidade para o aproveitamento em larga escala de uma matéria prima que atualmente está sendo descartada e que pode gerar produtos biotecnológicos sustentáveis.

Foi realizado uma extensa pesquisa bibliográfica sobre os trabalhos científicos descritos para as duas espécies de açaí (*E. precatoria* e *E. oleracea*), tanto da parte química quanto biológica. No **ANEXO 2** pode-se encontrar o resumo e os dados do artigo resultante desse trabalho, publicado pela revista Food Chemistry, em 2015.

### 3.1.2 BACURI (*Platonia insignis*)

Nos últimos anos, o bacurizeiro tem sido frequentemente citado como espécie promissora, pelas amplas possibilidades que apresenta, com interesse na indústria de alimentos e madeireira. Pelo sabor e aroma peculiar, os frutos são bastante utilizados para elaboração de sucos, sorvetes, cremes, doces, compotas ou mesmo consumidos *in natura* pela população da Amazônia e parte do Nordeste do Brasil, particularmente nos Estados do Maranhão e Piauí (Nascimento *et al.*, 2007)

Mesmo apresentando cerca de 71% de casca e 15% de sementes (Souza *et al.*, 2001; Mourão *et al.*, 1996), verifica-se que o aproveitamento integral do fruto do bacurizeiro têm sido pouco estudado. Os trabalhos concentram-se em avaliações da polpa e poucas alternativas foram levantadas para os resíduos que visem a utilização do fruto como um todo (Valença *et al.*, 2008).

Villachica e colaboradores (1996) relataram a possibilidade da utilização da casca de bacuri para obtenção de óleo ou pelo uso na fabricação de doces. Atualmente, as empresas descartam esse resíduo que é a maior parte do fruto, por não apresentarem estudos químicos e citotóxicos que garantam a segurança alimentar deste material. Segundo os produtores de bacuri, as cascas apresentam uma resina de coloração forte e sabor amargo, dificultando a fabricação de doces e compotas.

Em estudos referentes ao mesocarpo, verificou-se a alta quantidade de pectina existente, cerca de 5,0% (Paula, 1945). Quimicamente, as pectinas correspondem a uma cadeia linear de ácido poligalacturônico, unida por ligações alfa-1,4 de ácido galacturônico, com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados (Chitarra e Chitarra, 2005).



Figura 02: Estrutura química de substâncias isoladas de cascas de bacuri

Algumas frutas são descritas como fontes de pectinas, entre elas a maçã, goiaba e o pequi. A importância da pectina em alimentos é geralmente atribuída à formação de géis, sendo amplamente usada para produção de gomas, geléias, produtos lácteos e fibra dietética solúvel para redução dos níveis de colesterol, lipoproteínas, ácidos biliares e glicose (Thakur *et al.*, 1997; Anteri-Schemin *et al.*, 2005, Siqueira *et al.*, 2012; Fietz e Salgado, 1999). A obtenção de frações de pectina pode ser, dessa forma, uma solução para o aproveitamento da casca de bacuri.

Outros estudos referem-se à quantificação de fenólicos e a identificação dos constituintes voláteis. Descrevem-se o isolamento de um biflavonoide, morelloflavona, tipo flavanona-(3→8'')-flavona (figura 01), isolado da fração metanólica das cascas, extração de pectina em alta concentração (37,6%) em oxalato de amônia, além da identificação dos voláteis linalol, 2-heptanona, 3-hexenil e a substância majoritária, o acetato de linalol como as substâncias responsáveis pelo aroma pareceriam ser (Batista *et al.*, 2011a ; Batista *et al.*, 2011b; Brito *et al.*, 2011). (Souza e Chaves, 2007).

A revisão mais aprofundada desta tese sobre os estudos químicos e biológicos de *P. insignis* foi realizada e encontra-se publicado no artigo de revisão da revista Scientia Amazônia, 2015. No **ANEXO 3** pode-se encontrar o resumo e os dados desse trabalho.

### 3.1.3 PIQUIÁ

*Caryocar villosum* (piquiá) é uma espécie nativa da região amazônica, pertencente à família Caryocaceae. A polpa do seu fruto é consumida pelos habitantes locais na culinária amazonense para preparar pratos regionais com arroz e o óleo comestível, o qual é utilizado como substituto de manteiga (Clay *et al.*, 2000). Esse óleo é utilizado pelas famílias rurais do Nordeste do Brasil para o tratamento de dermatofitoses, tais como micoses (*Tinea capitis*) e doenças fúngicas da pele (“pé de atleta”) (Grenand *et al.*, 2004).

Na Guiana Francesa tradicionalmente a polpa e a casca de piquiá são utilizadas pelos habitantes como veneno de peixe. No estudo realizado por Magid e colaboradores (2006), associou-se tal propriedade à presença de saponinas isoladas.

O interesse nesse fruto está relacionado às substâncias bioativas detectadas. Quando comparado com outras 18 frutas tropicais (nove delas da região amazônica), o piquiá apresentou os maiores valores de substâncias fenólicas totais, flavonoides e atividade antioxidante (Barreto *et al.*, 2009).

Nos estudos realizados por Chisté e Mercadante (2012) e Chisté e colaboradores (2012) foram detectadas as substâncias fenólicas: ácido gálico, ácido elágico e ácido elágico desoxihexosido rhamnosido (HDDP-Glicose), e os carotenoides: luteína e zeaxantina como compostos majoritários. Nas cascas do caule foram encontrados fenólicos glicosilados, saponinas triterpênicas e flavonoides. A partir do extrato metanólico foram isoladas cinco saponinas triterpênicas (ácido  $\beta$ -D-glucurônico,  $\beta$ -D-galactose,  $\alpha$ -L-ramnose,  $\beta$ -D-14-glucose, gallato (sal do ácido gálico)). Algumas dessas substâncias podem ser observados na Figura 3. Saponinas triterpênicas também foram isoladas da polpa, tendo como

seu componente açúcar:  $\beta$ -D-glicose,  $\beta$ -D-galactose,  $\beta$ -D-xilose e os flavonóides glicosídeos,  $\beta$ -D-glicopirranose, 3', 4', 5' - trimetoxifenil, Galloil 1, galloil 2 ( Magid *et al*, 2008; Magid *et al*, 2006a e 2006b).

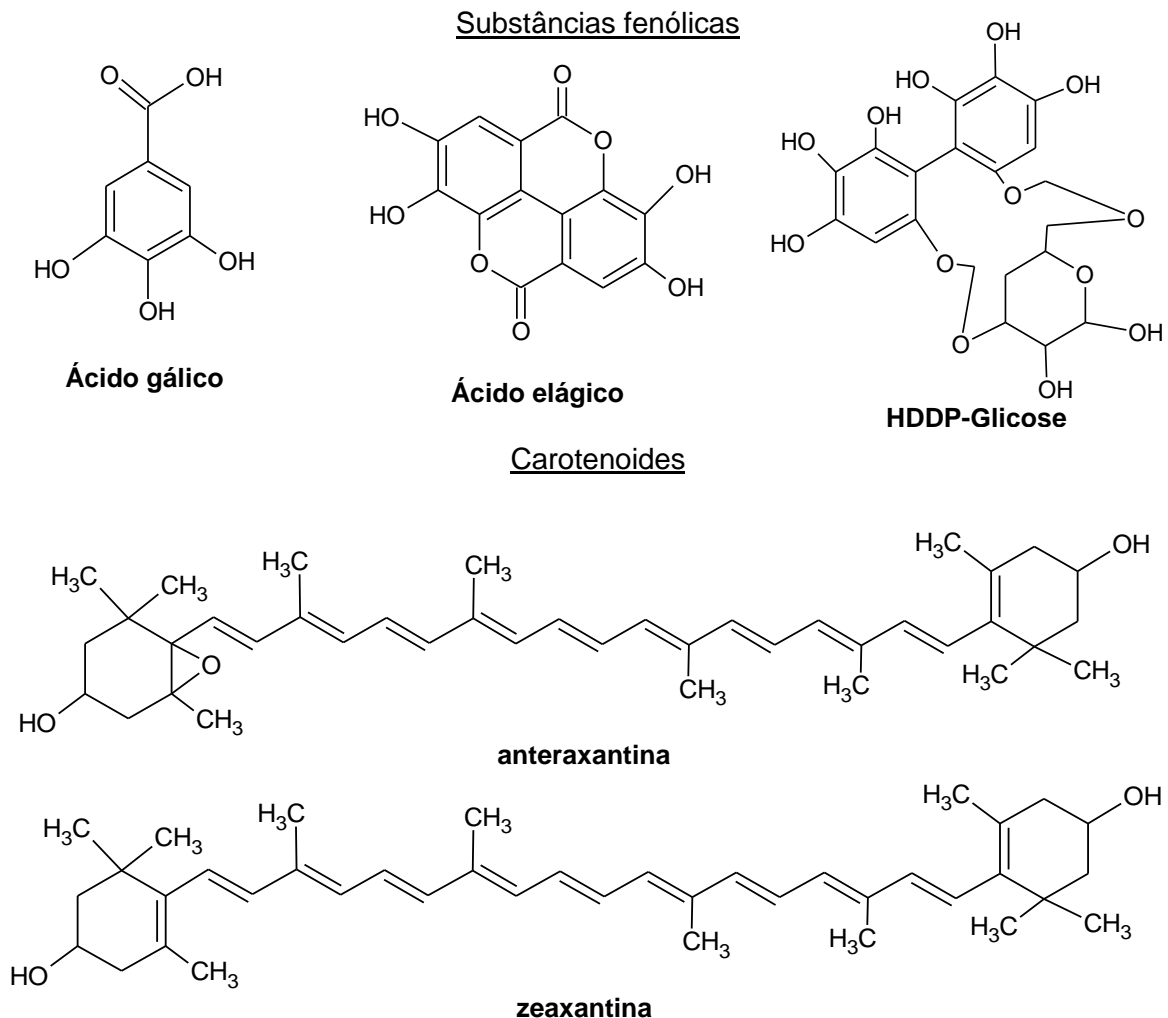


Figura 3: Substâncias químicas detectadas e/ou isoladas de piquiá.

A polpa apresentou efeitos antígenotóxicos, capacidade sequestrante das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Almeida *et al*, 2012; Chisté *et al*, 2012), propriedades antifúngicas contra dermatofitoses (Grenand *et al*, 2004) e atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* (Xavier *et al*, 2011).

Mesmo tendo apresentando excelentes resultados para atividades antioxidantes *in vitro*, os trabalhos científicos envolvendo a espécie *C. villosum* estão relacionados à utilização na indústria madeireira e na polpa, sendo reduzidas as pesquisas sobre as partes não comestíveis deste fruto.

## 3.2 FENOIS E FLAVONOIDES

### A) SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

Dentre os ativos utilizados em pesquisas de produtos naturais, estão os polifenólicos, substâncias cada vez mais correlacionadas com a capacidade de diminuir os riscos para a saúde relacionados ao estresse oxidativo (Campos e Frasson, 2011; Hirata *et al.*, 2004).

Consideram-se substâncias fenólicas, numa definição genérica, estruturas que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Podem ser classificados de acordo com seu esqueleto principal (tabela 2) ou segundo sua ocorrência no reino vegetal (amplamente distribuídos ou de distribuição restrita) (Cunha *et al.*, 2005).

Tabela 2. Esqueleto básico de alguns compostos fenólicos.

Esqueleto básico	Classe de substâncias fenólicas
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6 - C1	ácidos fenólicos
C6 - C1 - C6	xantonas
C6 - C3 - C6	flavonoides e isoflavonoides
(C6 - C3) <sub>2</sub>	Lignanas, neolignanas
(C6 - C3) <sub>n</sub>	ligninas
(C6 - C3 - C6) <sub>2</sub>	biflavonóides
(C6 - C3 - C6) <sub>n</sub>	taninos condensados

Fonte: adaptado de Dewick, 2002 e Lobo e Lourenço, 2007.

Podem ser formados através de duas rotas: via do ácido chiquímico e pela via do acetato. Por meio destas pode-se determinar o padrão de substituição do composto fenólico resultante, onde na via do ácido chiquímico obtêm-se substâncias com grupos hidroxilas em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico e na via do acetato originam-se substâncias com grupos hidroxilas dispostos em *meta* (Lobo e Lourenço, 2007; Dewick, 2002; Geissman e Crout, 1969) (figura 4).

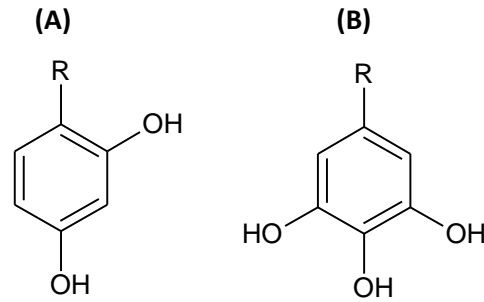


Figura 4: Padrão de oxidação típicos das vias metabólicas. A: via do acetato e B) via do ácido chiquímico

Na formação de compostos fenólicos pela via do acetato (figura 5), o bloco constituinte fundamental é o ácido acético sob a forma de acetil-CoA (acetil coenzima A) que é o iniciador direto de todo o processo. O aumento subsequente da cadeia realiza-se através de um derivado, o malonil-CoA, numa reação análoga à condensação de Claisen. Posteriormente, ocorre a ciclização, uma desidratação e a aromatização (Lobo e Lourenço, 2007; Dewick, 2002).

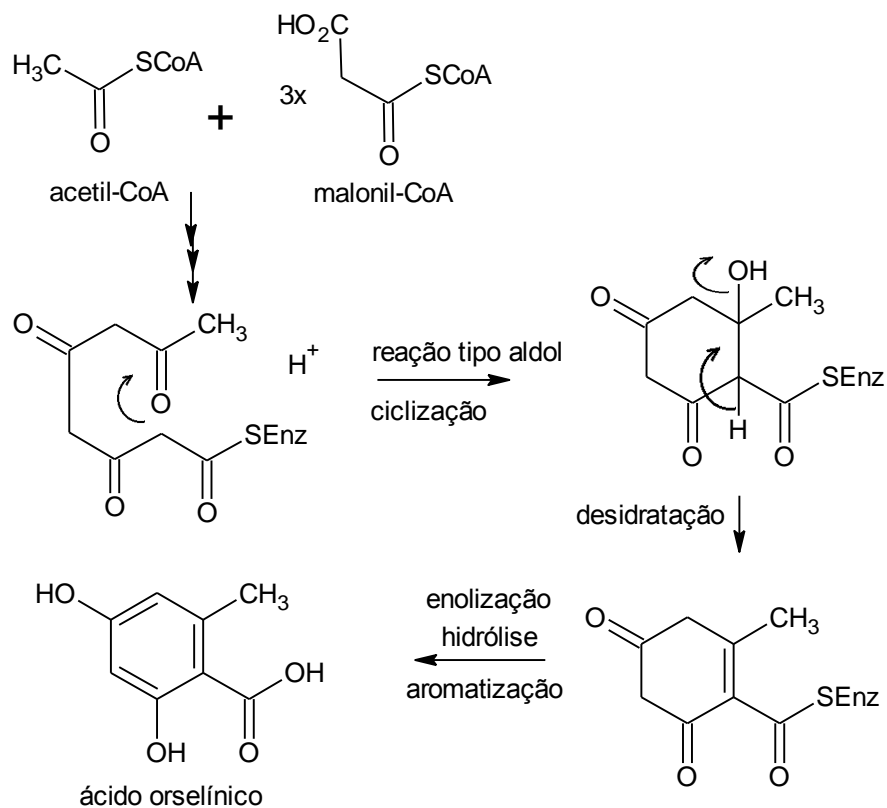


Figura 5. Exemplo da biossíntese de fenólicos oriundos da via do acetato. Fonte: Dewick, 2002.



O esquema biossintético para a formação do ácido chiquímico (figura 6) envolve a adição de uma molécula de fosfoenol piruvato (PEP) a um açúcar, a eritrose-4-fosfato, originando um derivado ácido com sete carbonos, o desoxi-arabino-heptulose-6-fosfato. Essa reação tipo aldol, seguida de uma eliminação do grupo fosfato e adição à carbonila, originam o ácido 3-desidroquínico. Em seguida forma-se o ácido 3-desidrochiquímico através da eliminação *cis* de uma molécula de água. Há então a redução da carbonila a álcool, por meio de NADPH, produzindo o ácido chiquímico (Lobo e Lourenço, 2007).

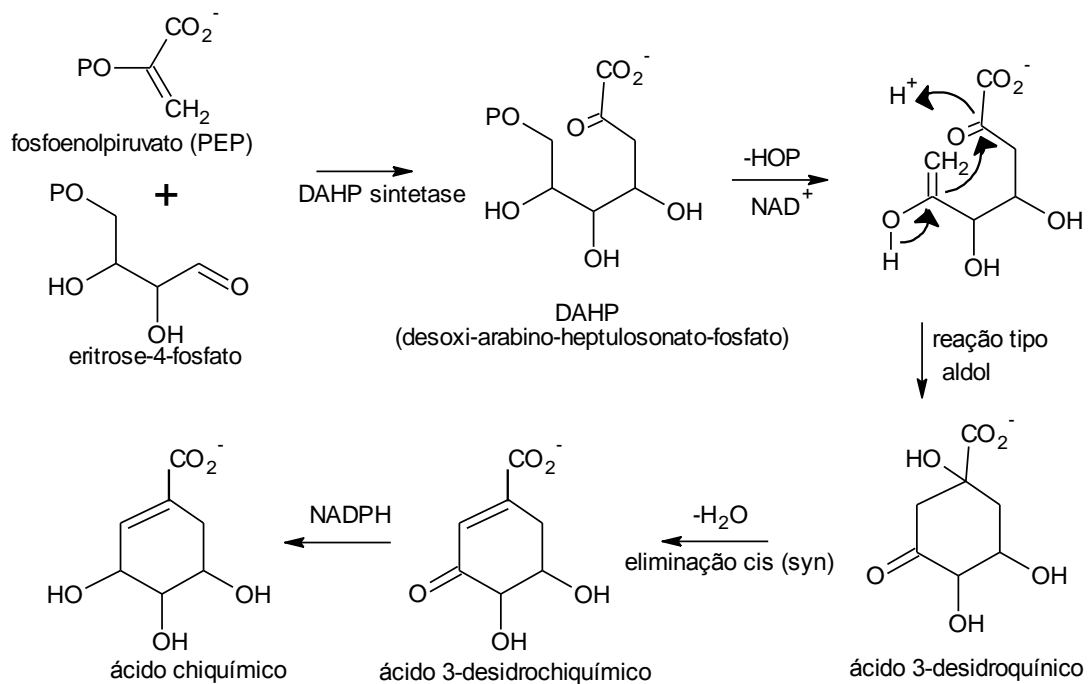


Figura 6: Formação do ácido chiquímico. Fonte: Adaptado de Dewick, 2002.

Verifica-se nas pesquisas uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos. Esta atividade deve-se principalmente às propriedades redutoras e à estrutura química dos fenólicos, que permitem a neutralização ou sequestro de radicais livres e/ou quelação de metais de transição. A ressonância do anel aromático presente nestes compostos é a principal responsável pela formação de intermediários estáveis que após o

processo de redução dos radicais livres, bloqueia reações em cadeia (Barreiros *et al.*, 2006; Cerqueira *et al.*, 2007a).

## B) FLAVONOIDES

Os flavonoides são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (Dornas *et al.*, 2007). Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal. De forma geral, são moléculas de baixo peso molecular caracterizados por apresentarem dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três carbonos. A estrutura básica dos flavonoides consiste num núcleo flavano, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (**A** e **B**) e um pirano (cadeia heterocíclica **C**) acoplado ao anel A (Figura 7) (Cunha *et al.*, 2005).

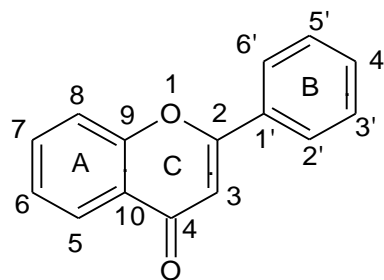


Figura 7: Estrutura básica dos flavonoides

Os flavonoides possuem biossíntese mista, resultado da via do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A primeira origina fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico, que por sua vez, origina o ácido cumárico, responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda resulta no outro anel aromático (anel A) do esqueleto básico dos flavonóides (Dewick, 2002) (Figura 8).

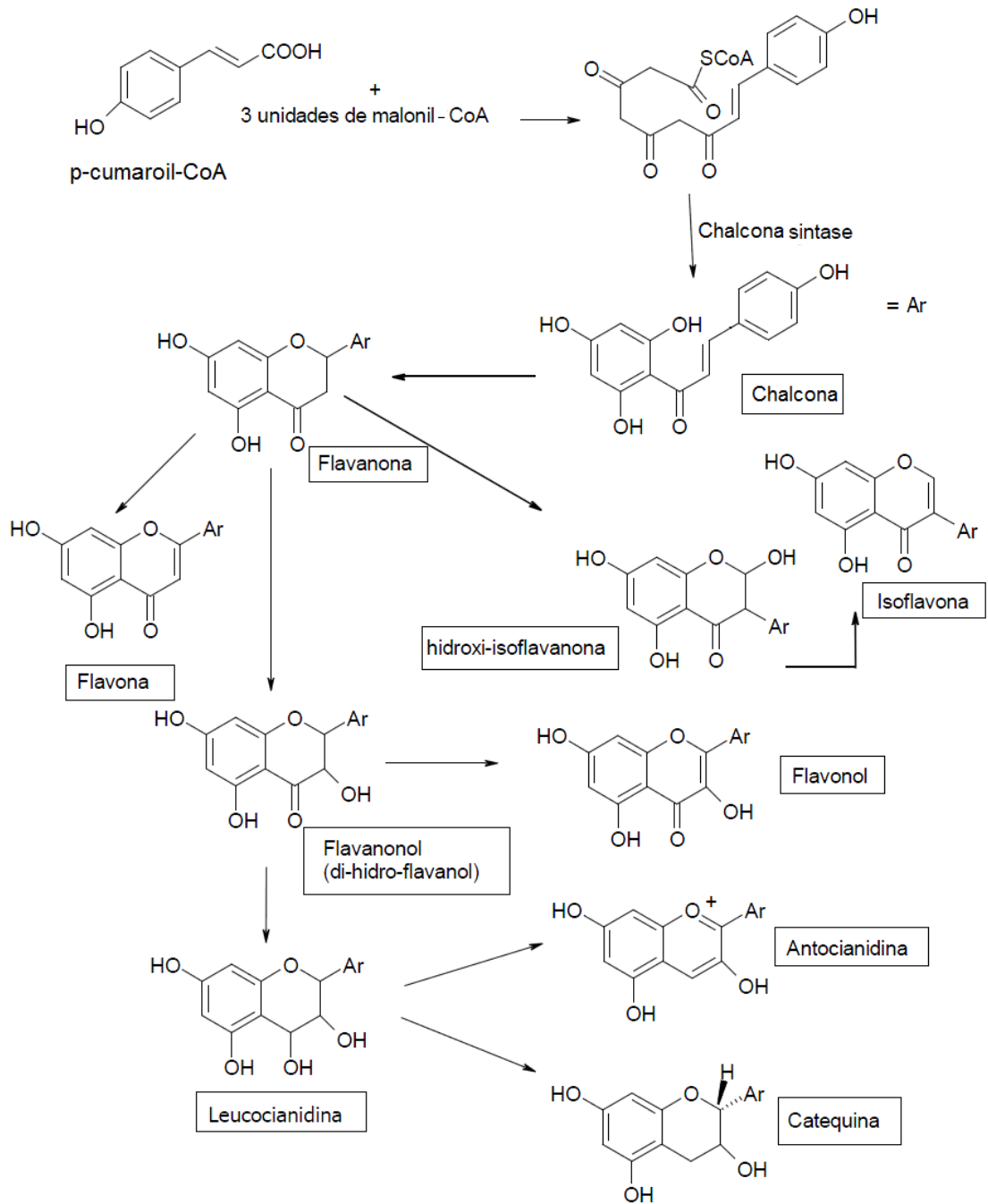


Figura 8: biosíntese geral dos flavonoides

### 3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O uso tradicional das plantas em tratamentos de pele, especialmente para fins cosméticos, é uma prática comum na medicina popular de muitas culturas. A busca por agentes antimicrobianos, inibidores enzimáticos antioxidantes e fotoprotetores torna-se cada vez mais frequentes e pode fornecer indícios que estimulem estudos para a descoberta de potenciais agentes terapêuticos.

#### 3.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A pesquisa por antimicrobianos de origem natural (animal e vegetal) têm sido uma alternativa para a utilização desses conservantes de origem sintéticas. As expectativas do mercado de cosméticos buscam diminuir a incidência de reações de hipersensibilidade ao usuário, como irritação e alergia, e uma menor toxicidade, incentivando assim, a busca de substâncias com potencial antimicrobiano (Lundov *et al.*, 2009; Ostrosky *et al.*, 2008).

Os cosméticos necessitam de conservantes em suas formulações que sejam capazes de inibir o crescimento de microorganismos durante sua fabricação e estocagem e/ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso. Assim, os conservantes devem apresentar atividade antimicrobiana efetiva, sendo seletivamente tóxicos e eficazes contra bactérias, bolores e leveduras (ANVISA, 2013; Pinto *et al.*, 2010; Kabara e Orth, 1997).

Nas varreduras, geralmente são incluídas os microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e alguns fungos filamentosos. Os mecanismos de ação envolvem processos de destruição da

estrutura proteica da parede celular; alteração da permeabilidade da membrana; inibição de sistemas enzimáticos da célula e oxidação de componentes celulares (Barbosa e Torres, 2005; Rang *et al.*, 2004; Calixto, 2001; Trabulsi *et al.*, 1999).

As pesquisas de substâncias antimicrobianas nos vegetais desenvolveu-se após a descoberta de penicilina, e os metabólitos secundários como as substâncias fenólicas, terpenos e flavonoides estão sendo classes muito promissoras. Segundo Rocha Filho (1994), cosméticos contendo flavonoides apresentam atividade microbicida e, além disso, são hidrossolúveis e não causam irritação cutânea, o que facilita sua aplicação cosmética.

Na região amazônica verifica-se que os óleos de andiroba e copaíba estão sendo inseridos no mercado de cosméticos e apresentam atividade antimicrobiana, antifúngica, e antisséptica. Outros destaques são os frutos goiaba (*Psidium guajava*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) que apresentaram atividade contra bactérias gram positivas e negativas e atividade antifúngica (Koolen *et al.*, 2013; Leandro *et al.*, 2012; Ribeiro, 2008; Majhenič *et al.*, 2007).

### **3.3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

A maioria das enzimas pode ser inibida por certas substâncias químicas. Essa inibição por pequenas moléculas e íons específicos é importante nos mecanismos de controle em sistemas biológicos. O estudo de inibidores de enzimas, também se constitui em uma fonte valiosa de informações sobre os mecanismos da ação enzimática (Chang *et al.*, 2009; Champe *et al.*, 2005).

#### **3.3.2.1 TIROSINASE**

Com o intuito de se tratar problemas dermatológicos de hiperpigmentação, há uma tendência mundial no desenvolvimento de cosméticos que possuam propriedades despigmentantes, os quais agem inibindo a biossíntese de melanina (Teixeira *et al.*, 2012). Esta desempenha um papel importante na proteção da pele humana contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (raios UV) do sol. Verifica-se, porém, que o acúmulo de uma quantidade anormal de melanina em diferentes partes específicas da pele pode ocorrer, resultando em manchas mais pigmentadas, tornando-se um problema estético (Chang, 2009; Adhikari *et al.*, 2008).

Para o tratamento desses problemas de pigmentação vários produtos cosméticos e farmacêuticos são utilizados, porém, não são totalmente eficazes ou seguros, o que justifica a intensa pesquisa na busca de novos agentes ativos, principalmente aqueles envolvidos na melanogênese, como a tirosinase (Silvério *et al.*, 2013; Okombi *et al.*, 2006; Grimes, 1999). A inibição da tirosinase é o principal mecanismo de ação de agentes despigmentantes. Dentre as substâncias químicas despigmentantes mais utilizadas destacam-se a hidroquinona, o arbutina, o ácido kójico e o ácido ascórbico e seus derivados (Masuda *et al.*, 1996; Su, 1999; Zhai e Maibach, 2001; Sato *et al.*, 2007).

Há relatos de que compostos fenólicos são potenciais agentes despigmentantes, por possuírem uma estrutura química semelhante à da tirosina, o substrato da tirosinase (Boissy e Manga, 2004). Devido à grande necessidade de novas substâncias despigmentantes, que realmente sejam eficazes e não tragam tantos efeitos nocivos à saúde, torna-se interessante avaliar a atividade de produtos naturais, fontes de fenólicos, que possam substituir efetivamente os compostos sintéticos encontrados no mercado.

### 3.3.2.2 HIALURONIDASE

A hialuronidase é uma enzima que despolicariza o ácido hialurônico (figura 9), reduzindo a viscosidade do meio intercelular, aumentando a permeabilidade das membranas celulares e vasos sanguíneos, tornando o tecido mais permeável à dispersão de outras substâncias e promovendo a reabsorção do excesso de fluidos, mobilizando os edemas e infiltrações (El-Safory *et al.*, 2010; Hynes *et al.*, 2000;).

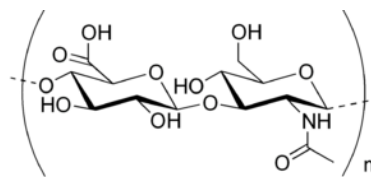


Figura 9: Estrutura química do ácido hialurônico

Os resultados dos estudos sugerem que o nível de ácido hialurônico pode estar correlacionado com a agressividade de células tumorais, de forma que quanto maior a quantidade de ácido hialurônico encontrado nestes tecidos, mais agressivo o tumor. O que indica um passo importante no avanço do processo cancerígeno, uma vez que a inibição desta enzima pode estar relacionada à diminuição desse processo patológico (Menzel e Farr, 1998; Matousek *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

Alguns autores descrevem que a atividade da hialuronidase também pode estar relacionada com outros processos nos tecidos animais como a inflamação e envelhecimento cutâneo. Dessa forma, um estudo sobre a inibição da enzima pode caracterizar possíveis atividades biológicas dos extratos e assim a possível utilização para formulações cosméticas (Park *et al.*, 1998).

### 3.3.3 ATIVIDADE FOTOPROTETORA

A luz solar é composta por espectro contínuo de radiação eletromagnética que apresenta divisão e denominação em concordância com o intervalo de comprimento de onda ( $\lambda$ ). Os raios UV subdividem-se em: ultravioleta A (UVA) entre 320 e 400 nm, ultravioleta B (UVB) entre 290 e 320 nm e ultravioleta C (UVC) entre 100 e 290 nm. A incidência dos raios UV pode ser ilustrado na figura 10 (González *et al.*, 2008; Palm e O`Donoghue, 2007).

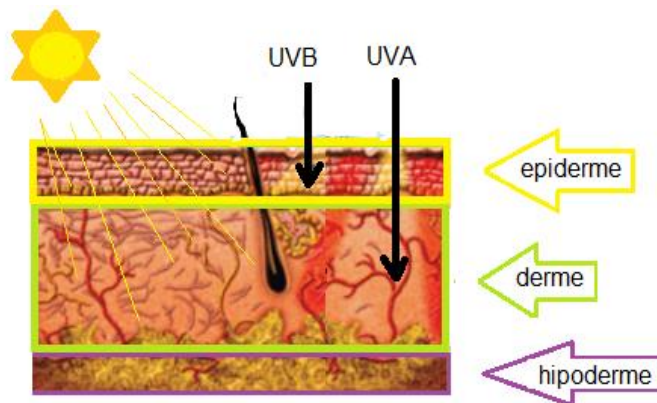


Figura 10: Representação esquemática do poder de penetração da radiação solar nas camadas da pele. Fonte: adaptação de <<http://lindadeviver.files.wordpress.com/2008/11/efeitos-da-radiacao.gif>>

A radiação UVC não chega à superfície terrestre, uma vez que é amplamente absorvida pela camada de ozônio. Entretanto, as radiações UVA e UVB atingem a Terra e podem ser absorvidas por diferentes cromóforos da pele, como melanina, DNA, RNA, proteínas e lipídeos. A exposição solar prolongada crônica leva à uma variedade de efeitos adversos que contribuem para formação de espécies reativas de oxigênio e alterações histoquímicas, incluindo fotoenvelhecimento (enrugamento, elastose e irregularidade da pigmentação), fotocarcinogênese (carcinoma de células basais e escamosas e melanoma maligno) e a diminuição da imunidade do indivíduo (Balogh *et al.*, 2011; Mansur, 2011; Dal`Belo, 2008; González *et al.*, 2008).



Os danos causados pela radiação UV podem ser amenizados com o uso de substâncias denominadas filtros solares que são moléculas ou complexos moleculares que podem absorver, refletir ou dispersar a radiação UV (Balogh *et al.*, 2011). Os filtros solares orgânicos são formados por moléculas capazes de absorver a radiação UV (alta energia) e transformá-la em radiações com energias menores e inofensivas ao ser humano. Estas moléculas são, essencialmente, compostos aromáticos com grupos carboxílicos ou conjugados. No geral, apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila, na posição *orto* ou *para* do anel aromático. Existem três categorias em que se enquadram, sendo elas: filtros UVB, UVA e de amplo espectro (figura 11) (Flor *et al.*, 2007).

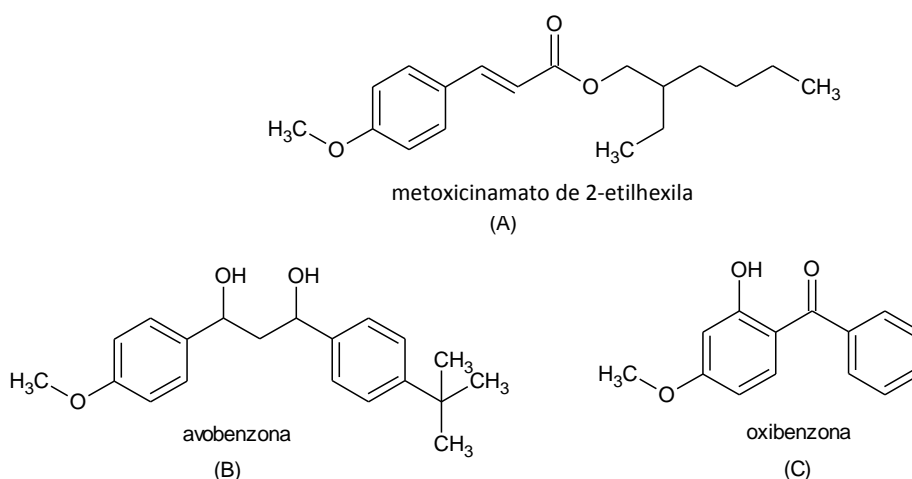


Figura 11: Exemplos de substâncias químicas utilizadas como filtros solares em (A) UVB, (B) UVA e (C) amplo espectro. Fonte: Adaptação de Silva, 2012.

O mecanismo de ação dos filtros orgânicos envolve a absorção da radiação UV e, em seguida, a excitação, onde os elétrons situados no orbital  $\pi$  HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) são excitados para orbital  $\pi^*$  LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e, ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor (Flor *et al.*, 2007). O espectros de absorção nas regiões UVA e UVB estão apresentados no gráfico 2.

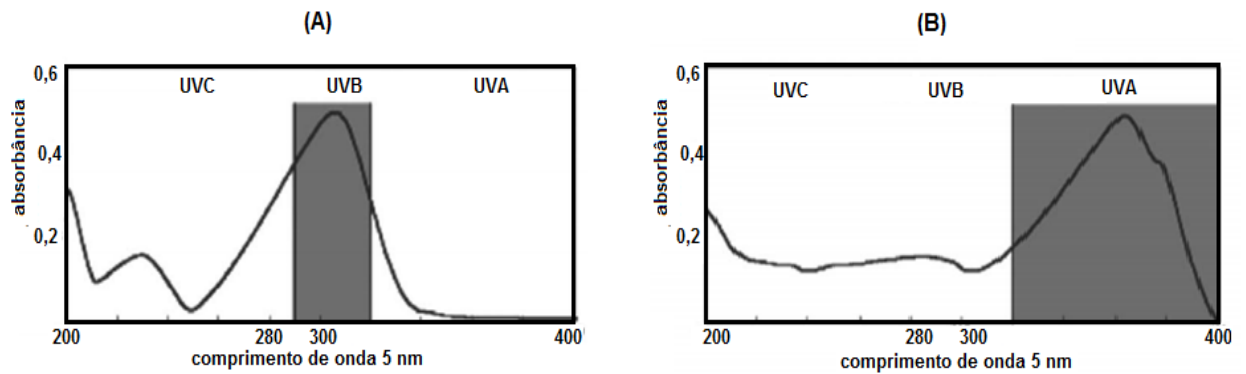


Gráfico 2: Espectro de absorção UV dos filtros (A) p-metoxicinamato de 2 etil-hexila e (B) 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)propano-1,2-dionaoxibenzona. Fonte: Adaptação de Flor *et al.* (2007).

As pesquisas sobre fotoproteção da pele têm mostrado que a incorporação de antioxidantes tópicos nas formulações antissolares constituem-se numa estratégia importante para o aumento do efeito fotoprotetor suplementar dos filtros solares sintéticos permitidos pela lei. Aliado a isso, os entraves dos atuais protetores solares como a baixa resistência a água, pouca estabilidade, potencial alérgico e dermatites fotoalérgicas de contato estimulam a busca de substâncias com potencial ação fotoprotetora (Souza, *et al.*, 2013; Violante *et al.*, 2009).

### 3.3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A pele possui a maior área de superfície do corpo humano, sendo o principal alvo dos radicais livres. Estudos sugerem uma correlação entre o envelhecimento e a redução de agentes enzimáticos e não-enzimáticos, com consequente aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) (Guaratini *et al.*, 2007; Kede e Sabatovich, 2004).

Os radicais livres são espécies químicas que apresentam como característica a presença de um único elétron não-pareado em uma órbita externa. Espécies reativas incluem não só os radicais ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $NO^{\cdot}$ ), mas também intermediários

neutros ou carregados ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROOH}$  e  $\text{ONOO}^-$ ) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ) (Halliwell, 1996; Halliwell, 1994).

Desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, porém, quando em excesso, estão envolvidos em danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízos das funções vitais em diversos tecidos e órgãos (Nordberg e Arnér, 2001, Rover Junior *et al.*, 2001; Halliwell, 1996).

As etapas de reação de radicais de forma geral podem ser divididas em iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação os radicais são gerados. Em seguida, ocorre a propagação, onde um radical reage para produzir outros radicais, formando reações em cadeia. Quando os radicais se combinam produzindo uma molécula na qual os dois elétrons estão emparelhados ou uma molécula estabiliza o radical, ocorre a etapa de terminação (Bruice, 2006).

O equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas de radicais livres pode ser reestabelecido pelos sistemas antioxidantes, onde substâncias presentes em baixas concentrações comparadas à do substrato oxidável, regeneram ou previnem significativamente a oxidação do mesmo (Barreiros *et al.*, 2006; Halliwell *et al.*, 2000).

Verifica-se que a estabilidade dos radicais ocorre devido principalmente às propriedades estruturais das moléculas antioxidantes. Sendo assim, substâncias com a capacidade de produzir radicais pouco reativos e que estabilizam-se ou sofrem desproporcionamento são antioxidantes em potenciais. O mecanismo envolvendo a estabilização de um antioxidante pode ser ilustrado na figura 12 (Barreiros *et al.*, 2006).

O ascorbato (forma que é comumente encontrado do ácido ascórbico no organismo) é um bom agente redutor que produz derivados pouco reativos. Por isso, pode ser oxidado pela maioria das ERO e ERN que chegam ou são formadas nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O mecanismo envolve uma reação de oxidação e produz o radical semidesidroascorbato. Posteriormente, o radical formado é convertido em ascorbato através de um sistema enzimático ou é oxidado irreversivelmente gerando oxalato e treonato (Barreiros *et al.*, 2006).

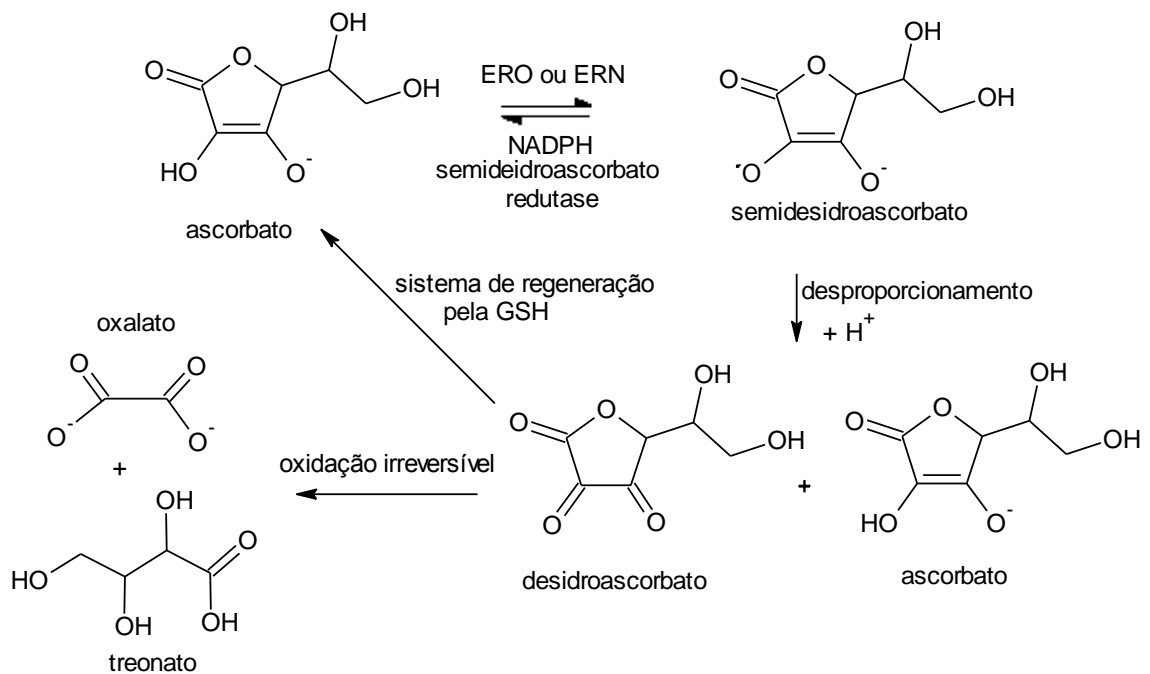


Figura 12: ciclo oxidativo do ascorbato  
Fonte: Adaptação de Barreiros *et al.* (2006).

Entre os antioxidantes mais conhecidos estão as vitaminas C e E, carotenoides e as substâncias fenólicas. Estas apresentam propriedades redutoras e capacidade de estabilização dos radicais formados devido à ressonância do anel aromático, entre os quais pode-se citar a quercetina, rutina, hesperidina, naringina, naringenina, e sakuranetina (figura 13) (Couto e Canniatti-Brazaca, 2010; Bruice, 2006; Melo e Guerra, 2002, Bianchi e Antunes, 1999).

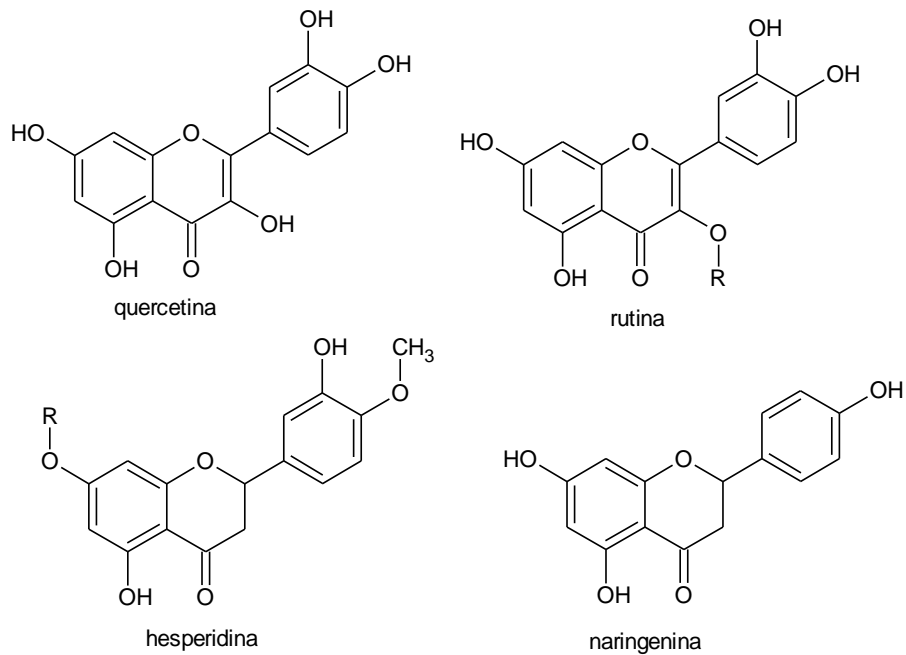


Figura 13: Estruturas químicas de antioxidantes fenólicos.

Presume-se dessa forma que mecanismos antioxidantes capazes de neutralizar os radicais livres pela administração oral ou tópica, protegem a pele dos danos oxidativos e podem ter um papel importante na prevenção de doenças e no processo de envelhecimento cutâneo (Campos e Frasson, 2011; Vieira et al., 2011; Kang *et al.*, 2012).

Segundo Roesler (2009), é possível classificar em quatro categorias os métodos mais empregados na avaliação da atividade antioxidante proporcionada por extratos vegetais, sendo necessária a combinação destes para uma análise completa do potencial antioxidante.

1. Métodos que empregam modelos de radicais relativamente estáveis como o DPPH, ABTS, 2-desoxi-D-ribose, nos quais é avaliada a capacidade do extrato vegetal em doar hidrogênio a fim de formar não radicais, ou seja, seqüestrar os radicais livres (OH<sup>\*</sup>) formados durante a oxidação. Esses métodos costumam ser rápidos, simples e muito convenientes para a varredura um de grande número de amostras.

2. Modelos contendo lipídios ou emulsões lipídicas como  $\beta$ -caroteno, muito utilizado para avaliar amostras menos polares uma vez que o substrato empregado é uma emulsão lipídica.
3. Testes *in vitro* utilizando como substratos sistemas biológicos como células de córtex cerebral de rato/boi, lipoproteína de baixa densidade humana (LDL), cultura de células hepáticas de camundongos e microssomas de fígado de ratos; nos quais a reação de oxidação é iniciada por meio de um agente agressor como  $H_2O_2$ , nitriloacetato (NTA) ou cloreto férrico ( $FeCl_3$ ). Modelos que empregam células são particularmente úteis na determinação dos mecanismos de reação e dose-resposta de um determinado composto, ou seja, é possível estudar a quantidade de amostra necessária para induzir uma ação e alterar uma resposta bem como observar a variedade de respostas em função de desafios diversos impostos as células.
4. Testes *in vivo* utilizando animais para avaliar os efeitos de proteção proporcionados pela ingestão de extratos vegetais, com ou sem intoxicação por substâncias como o tetracloreto de carbono  $CCl_4$ . Nesses estudos, a indução ou decréscimo no conteúdo e atividade das enzimas detoxificantes da fase 1 e 2 é monitorada por métodos bioquímicos bem como os danos às células e tecidos são avaliados por meio de estudos histopatológicos. Somente nesses modelos é possível avaliar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos antioxidantes bem como a real contribuição desses compostos.

Em função dos efeitos secundários provocados pela utilização de antioxidantes sintéticos, como problemas de toxicidade, carcinogênese, aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático, as pesquisas têm buscado produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (Augustyniak *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2008; Guaratini *et al.*, 2007; Simão, 1985).

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A caracterização química avaliando uma grande quantidade de metabólitos vem sendo satisfatoriamente utilizada na química de produtos naturais, sendo comumente denominado “*fingerprint*” ou “impressão digital”. Muitas técnicas analíticas como RMN, espectrometria de massas acopladas a técnicas de separação (CE-MS, CG-MS e LC-MS) ou infusão direta têm sido utilizadas para obtenção de “*fingerprints*”. Dentre essas, a espectrometria de massas possui vantagens importantes em relação às demais técnicas devido à alta sensibilidade e a seletividade combinadas com a possibilidade de confirmar a identidade de componentes presentes em amostras biológicas complexas.

#### 3.4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massa é um método que vem sendo consolidado como uma importante ferramenta analítica na determinação de perfis e estruturas químicas. Conceitua-se como o estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa e sua caracterização de acordo com a razão de sua massa carga ( $m/z$ ), estrutura ou propriedades físico-químicas. Inicialmente essa técnica era usada na determinação de massas atômicas e restrita à análise de gases e substâncias voláteis. Durante a última década passou por grandes avanços tecnológicos, permitindo que a sua utilização fosse expandida para um amplo espectro de classes moleculares (Ham, 2008).

O primeiro experimento prático desse método analítico é descrito em 1930, por Chapman. Posteriormente em 1960, houve a utilização da espectrometria de massas por Dole e colaboradores, iniciando um processo de grande

desenvolvimento para o meio científico. Porém, foi com a ionização por *eletrospray* como método de ionização branda que a espectrometria de massa pôde alcançar maiores aplicabilidades, permitindo a análise de macromoléculas com baixos níveis de fragmentação (Yamashita e Fen, 1984).

A principal vantagem do *electrospray* sobre outras técnicas é a que a dessolvatação ocorre gradualmente em temperaturas relativamente baixas de forma a não gerar fragmentos nem moléculas ionizadas. Atualmente ela vem sendo empregada na busca de informações sobre a estrutura de compostos orgânicos, análise de misturas complexas e devido ao desenvolvimento de técnicas de ionização mais brandas tornou-se possível a utilização em compostos de alta massa molecular e não voláteis, como os polipeptídeos, carboidratos e as proteínas (Cole, 1997).

Os íons são gerados induzindo tanto a perda quanto o ganho de carga elétrica a partir de uma espécie neutra. Uma vez formados, são eletrostaticamente direcionados a um analisador de massa, onde são separados de acordo com a relação  $m/z$  e detectados. A ionização é obtida através da protonação ou desprotonação, ou ainda pela adição de outros íons, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Cl}^-$ , formando adutos. As espécies observadas são chamadas protonadas  $[\text{M-H}]^+$ , desprotonadas  $[\text{M-H}]^-$ .

### **3.4.1.1 TIPO DE IONIZAÇÃO**

Os processos de ionização são fundamentais para espectrometria de massas. Diversas fontes de ionização foram desenvolvidas ao longo da história e entre as mais utilizadas para a análise de substâncias orgânicas de médio e baixo peso molecular destacam-se a técnica de ionização por elétrons (EI), ionização química



(IQ), Bombardeamento rápido de átomos (FAB), ionização por dessorção da matriz assistida por laser (MALDI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por *electrospray* (ESI), sendo esta última a mais utilizada.

A ESI envolve a formação de um feixe eletrostático, onde há a transferência de íons existentes em uma solução para a fase gasosa. Nesse processo, são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons, resultantes da aplicação de uma diferença de potencial da ordem de kV entre um capilar e um contra eletrodo, sob pressão atmosférica (figura 14). Este processo pode ser dividido em três etapas principais, a nebulização da solução da amostra em gotículas carregadas decorrentes da aplicação direta de voltagem no capilar; a liberação dos íons a partir das gotículas; e o transporte dos íons da região de pressão atmosférica da fonte para a região de alto vácuo do analisador (Ham, 2008).

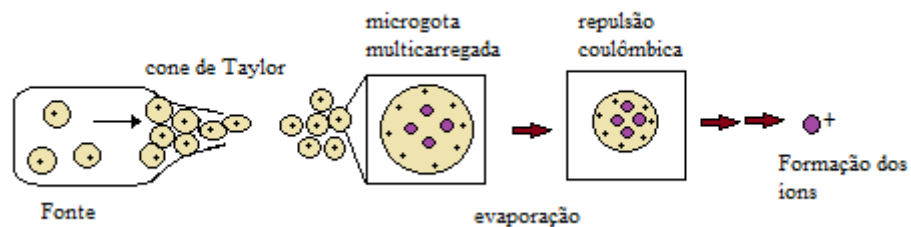


Figura 14: Modelo de ionização por *electrospray*

As gotas formadas na forma de cone (Cone de Taylor) sofrem dessolvatação, num processo conhecido como explosão de Coulomb, resultantes da densidade de carga e do aumento de repulsão entre os íons que venceram a tensão superficial do líquido. Os fatores que influenciam esse processo são: magnitude do campo elétrico, tensão superficial do solvente e condutividade da solução (Yamashita e Fen, 1984).

A massa do solvente é reduzida por evaporação, onde um fluxo de gás inerte secante auxilia nesse processo. O sistema passa para a região de baixa pressão, na

qual há um sistema de bombas e um conjunto de lentes ópticas que conduzem os íons ao analisador de massas. A ativação através de colisão desses íons e subsequente dissociação a vários fragmentos fornece informação estrutural a respeito desses íons, necessária para identificação e caracterização (Moraes e Lago, 2003).

As informações sobre os íons relativos a fragmentos podem ser obtidas por meio de espectrometria sequencial (MS/MS ou Tandem MS) onde são gerados íons pela aplicação de altos campos magnéticos na fonte de ionização com uma molécula de gás. Os íons de uma faixa específica de  $m/z$  são selecionados, dissociados e os íons são analisados (figura 15).

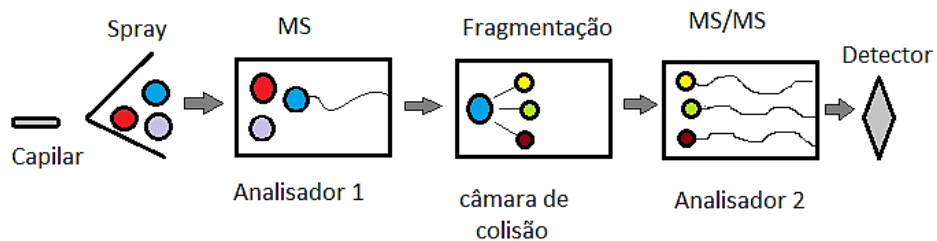


Figura 15: Esquema de seleção do íon precursor e de sua formação. Fonte: Adaptação de Souza, 2008

Com o mesmo princípio de ESI, a ionização por dessorção de *spray* de elétrons (DESI) (figura 16) é um processo de ionização pelo qual a amostra pode ser depositada em alguma superfície, como TLC ou papel, fora do espectrômetro, onde ocorre a ionização. Essa técnica foi desenvolvida por Robert Graham Cooks e nela a superfície onde a amostra está depositada recebe um jato de *spray*, com solvente apropriado, em alta velocidade, provocando a dessorção e ionização do analito e consequente transferência dos íons para a fase gasosa (Cooks et al., 2006).

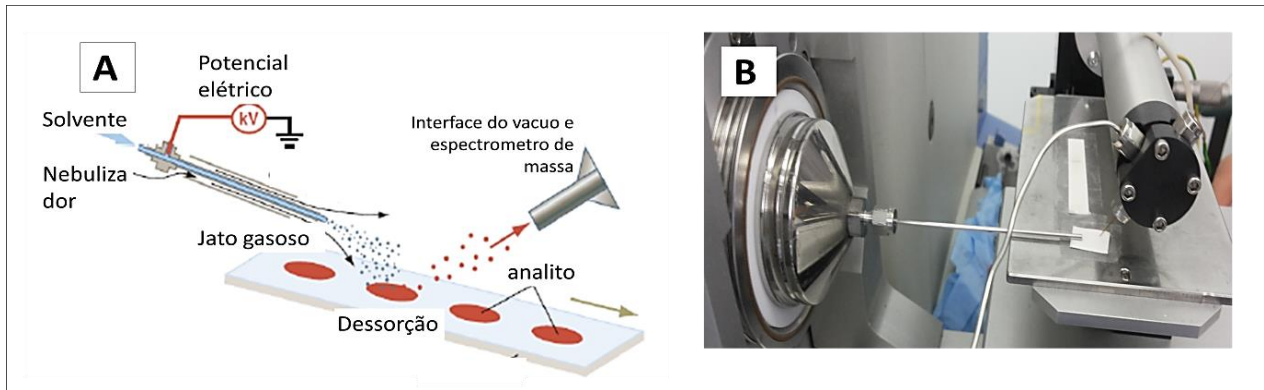


Figura 16: Fonte de ionização do tipo DESI. A) Ilustração do processo e B) Espectrômetro de massa com DESI. Yamaguchi, 2015

As caracterizações estruturais dos perfis de compostos orgânicos vêm acontecendo de forma bem sucedida por pesquisadores utilizando sistemas de ionização por electrospray (ESI e DESI) em espectrometria de massa. Uma das vantagens é devido a ampla faixa de relação  $m/z$  dos íons e a rapidez com que as análises podem acontecer, em comparação com as técnicas tradicionais de isolamento por cromatografia em coluna e partições para a possível identificação das substâncias. Com a espectrometria, espectros de massas de extratos de constituição complexa podem ser obtidos, e seus componentes químicos, detectados e identificados.



## 4. METODOLOGIA

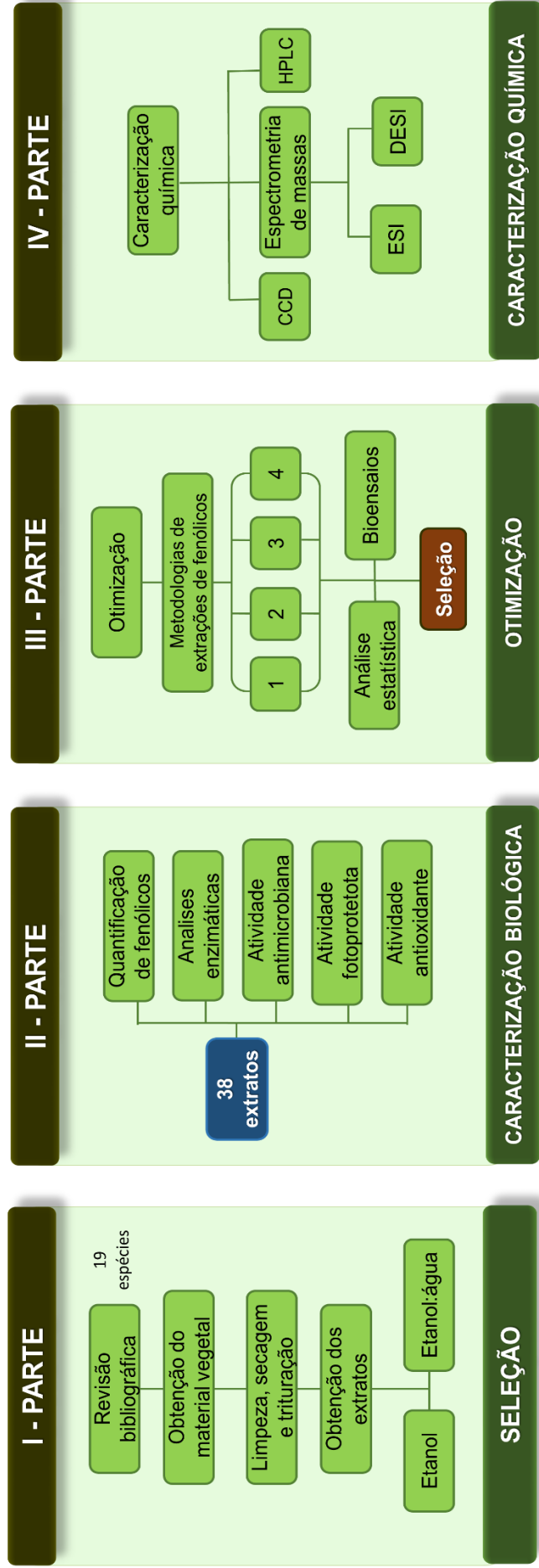
## 4.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O projeto foi dividido em quatro etapas. Inicialmente, foi realizado um levantamento dos principais frutos consumidos na região, com grandes volumes de resíduos e que tivessem poucos, ou nenhum estudo químico e atividades biológicas descritos na literatura. Foram selecionadas 19 espécies e realizadas extrações etanólicas e hidroalcoólicas no laboratório de Química de Biomoléculas do Amazonas (Q-Bioma).

A segunda parte foi realizada em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, orientada pelo professor Emerson Silva. Foram realizados ensaios enzimáticos, com enzimas digestivas e teciduais, ensaios para avaliação do potencial antioxidante por meio da varredura de radicais livres, ensaios de citotoxicidade, potencial fotoprotetor e quantificação de substâncias bioativas (fenóis e flavononoides totais).

Posteriormente foram selecionadas 3 espécies com os melhores resultados das atividades biológicas. A otimização da extração dos compostos fenólicos foi realizada utilizando modelo de superfície de resposta 3D e técnicas multivariadas em parceria com o Laboratório de Estatística da UFAM (LABEST), orientada pelo professor Max Lima. Os resultados foram analisados por meio do melhor conjunto de parâmetros: rendimento, quantificação de fenóis e flavonoides, e atividade antioxidante.

Após a seleção do método, foi realizada a caracterização química em um doutorado sanduíche em parceria com a universidade Canadense *York University* orientada pelo professor Demian Rocha Iba, utilizando sistemas de ionização por electrospray (ESI e DESI) em espectrometria de massa. O esquema do procedimento experimental pode ser verificado no fluxograma 1.



Fluxograma 1: Delimitação experimental da tese.

#### 4.1 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os resíduos dos frutos foram gentilmente cedidos pela Cooperativa Agrícola Coari-Itapeua (CAECI) localizada no município de Coari (AM), com exceção de bacuri, que foi cedida pela empresa “Pousada Bacuri”, localizada no município de Bragança (Pará), onde são plantados 65 hectares de bacurizeiro e a amostra de piquiá, obtida na Reserva Florestal Ducke. A data de obtenção do material vegetal e as partes selecionadas estão apresentadas na tabela, a seguir:

Tabela 3: Nome científico, partes utilizadas e as datas da obtenção do material.

Amostra	Nome científico	Data	Parte
Abiu	<i>Pouteria caimito</i>	6/2012	Casca
Açaí do AM	<i>Euterpe precatoria</i>	7/2012	Semente
Açaí do Pará	<i>Euterpe oleracea</i>	6/2012	Semente
Acerola	<i>Malpighia glabra</i>	4/2012	Semente
Bacuri	<i>Platonia insignis</i>	3/2012	Casca e semente
Bacurizinho	<i>Garcinia madruno</i>	6/2012	Casca e semente
Biribá	<i>Rollinia mucosa</i>	6/2012	Casca
Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	4/2012	Casca da semente
Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum</i>	4/2012	Casca e semente
Cupuí	<i>Theobroma subincanum</i>	4/2012	Casca e semente
Castanha do Brasil	<i>Bertholletia excelsa</i>	4/2012	Casca
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i>	5/2012	Semente
Graviola	<i>Annona muricata</i>	6/2012	Casca
Guaraná	<i>Paullinia cupana</i>	12/2011	Casca
Ingá	<i>Inga edulis var. edulis</i>	6/2012	Casca e semente
Piquiá	<i>Caryocar villosum</i>	5/2012	Casca
Pupunha	<i>Bactris gasipae</i>	12/2012	Semente
Tucumã	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	12/2012	casca
Uxi	<i>Endopleura uchi</i>	5/2012	Casca

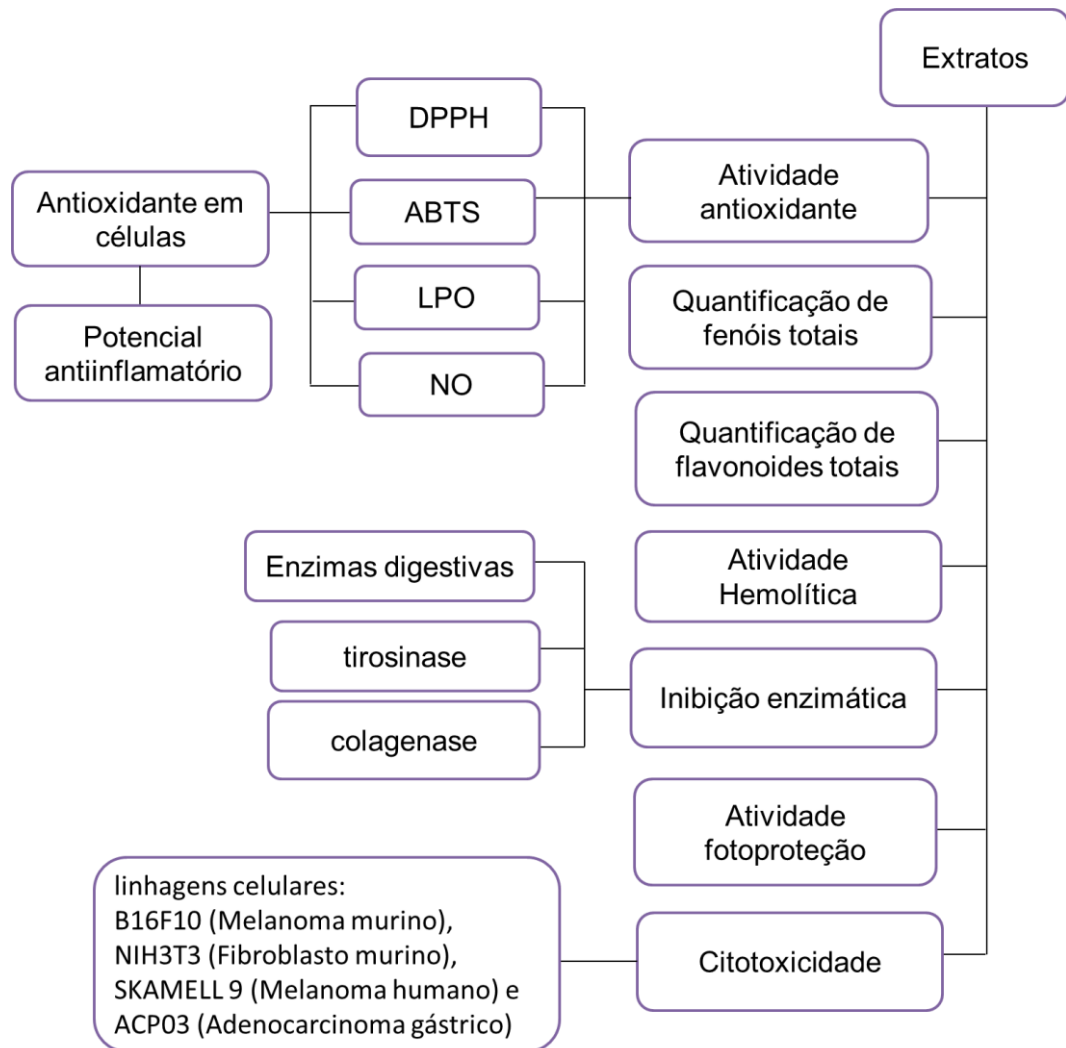
As extrações foram realizadas por maceração, no período de 72 horas, utilizando etanol e etanol:H<sub>2</sub>O (7:3). As amostras dos frutos das duas etapas passaram pelo mesmo procedimento inicial. Após a coleta, as diferentes partes foram separadas, limpas e secas de acordo com suas características: liofilizadas ou secas em estufa com circulação de ar em temperatura ambiente. Em seguida foram triturados com auxílio de um moinho de facas.

As extrações foram padronizadas, onde cada material vegetal (100 g) foi macerado por 48 h, na proporção de massa/solvente de 10%, utilizando etanol e etanol/água (6:4 v/v) como solvente extrator. Para concentração dos extratos foi utilizado evaporador rotatório para a solução em etanol e “*spray dryer*” para a hidroalcoólica. Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram reservados em frascos ambarados e armazenados em geladeira para a realização dos bioensaios.



## 4.2 BIOENSAIOS

Após a obtenção dos extratos as amostras foram analisadas quanto às atividades biológicas, conforme o fluxograma 2.



Fluxograma 2: Esquema das atividades químicas e biológicas realizadas na FCF/AM.

### 4.2.1.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 4.2.1.1 VARREDURA DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH')

Este ensaio baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o à hidrazina

(Figura 17), obtendo dessa forma, a mudança simultânea na coloração de violeta à amarelo com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

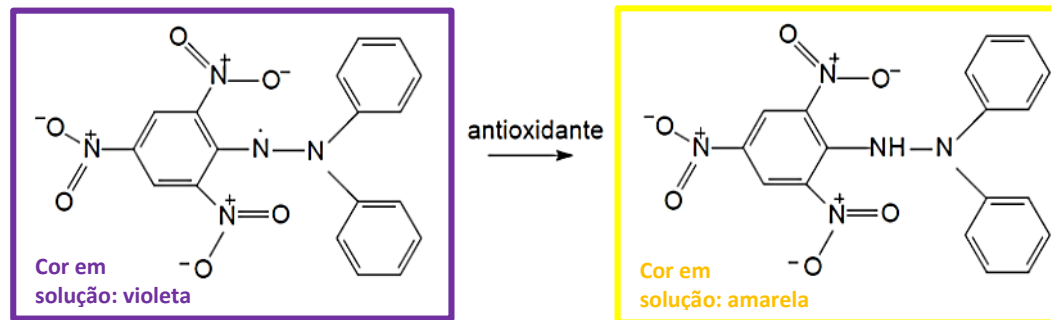


Figura 17: Redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil a 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

O ensaio foi realizado segundo Molyneux (2004) com pequenas modificações, adaptado para realização em microplaca de 96 poços. Uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  das amostras em concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi adicionada num poço. Foram realizadas diluições sucessivas e acrescentado 270  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH (0,3 mM). Após 30 min a absorbância foi medida em leitora de microplaca (Bio-Rad, modelo 3550 UV) a 517 nm. Os experimentos foram analisados em triplicata e partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de DPPH $\cdot$  remanescente no meio reacional (Alvez *et al.*, 2010; Sanchez-Moreno *et al.*, 1998). Por meio de regressão linear foram obtidos os valores de  $\text{CE}_{50}$  (quantidade de oxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%) (Mensor, 2001) e comparados com o padrão quercetina.

$$\%AA = 100 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) * 100$$

Onde %AA é percentagem de estabilização,  $\text{Abs}_{\text{controle}}$  é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH e  $\text{Abs}_{\text{amostra}}$  é a absorbância da mistura reacional em 30 min (DPPH + amostra).

#### 4.2.1.2 VARREDURA DO RADICAL ABTS<sup>•+</sup>

No método do ABTS<sup>•+</sup>, o radical monocátion, cromóforo verde/azul, é gerado pela oxidação de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etil-benzolona-6-sulfonado)] com persulfato de potássio. A adição do antioxidante ao radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, promovendo a supressão da cor da solução (figura 18).

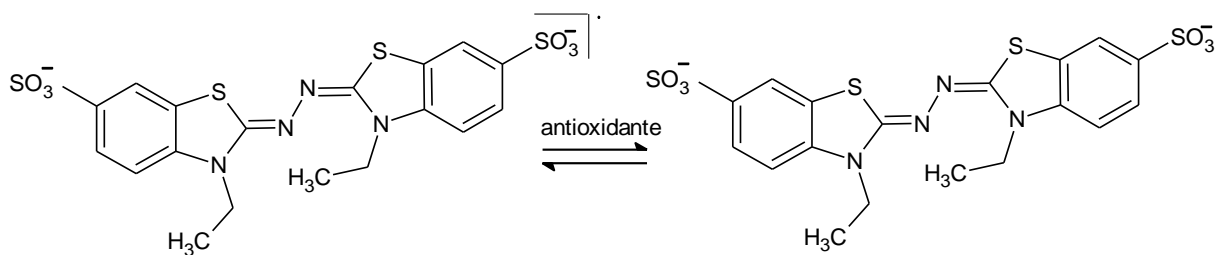


Figura 18: Estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante.

A atividade antioxidante quantitativa foi avaliada em microplaca de 96 poços. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluído em água miliQ e previamente oxidado com 1 parte de persulfato de potássio 5 mM por 16h. Uma alíquota de 30 µL de cada amostra em concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> foi adicionada num poço. Foram acrescentados 270 µL da solução de ABTS<sup>•+</sup>. Após 15 min a absorbância foi medida em leitora de microplaca a 630 nm. Os experimentos foram analisados em triplicata e partir dos resultados obtidos, determinou-se a porcentagem de ABTS<sup>•+</sup> remanescente no meio reacional e comparados com o padrão Trolox<sup>®</sup> (Re *et al.*, 1998).

#### 4.2.1.3 SUPERÓXIDO

No método utilizado para avaliar a capacidade sequestradora, o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) produzido reduz *nitroblue tetrazolium* (NBT) a *formazan* em pH 7,4 e temperatura ambiente (Ewing e Janeiro, 1995; Ozturk *et al.*, 2007). A geração do

formazan é acompanhada por espectrofotometria pela mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura do formazan em 560 nm. As moléculas que atuam como antioxidante reagem com  $O_2^{\cdot -}$  inibindo a produção do formazan (figura 19).

O método utilizado para avaliar a capacidade varredora de ânions radicais superóxido foi o de Ozturk et al. (2007) com pequenas modificações nos volumes para realização do ensaio em microplacas. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra em uma concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi adicionada num poço. Foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  da solução de NBT (reagente 1), seguido de 100  $\mu\text{L}$  da solução de NADH (reagente 2) e realizado a leitura da absorbância.

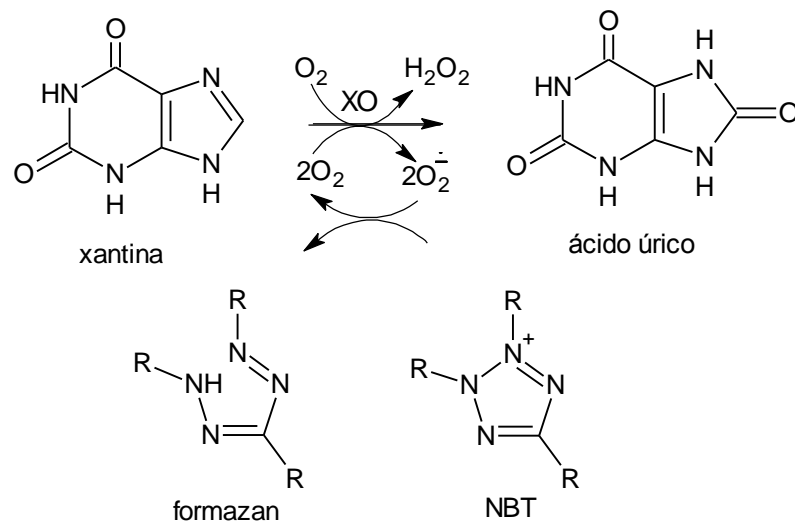


Figura 19: Formação do formazan a partir do NBT.

Em seguida adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução PMS (reagente 3). Após 5 min a absorbância foi medida e realizada o cálculo de inibição de acordo com a seguinte

$$\text{Equação: } \% \text{ Inibição} = 100 - (A2_{\text{amostra}} - A1_{\text{amostra}} / A2_{\text{controle}} - A1_{\text{controle}}) * 100.$$

Reagente1: NBT ( *nitro blue tetrazolium*) 250  $\mu\text{M}$ .

Reagente 2: NADH ( *Nicotinamide adenine dinucleotide* ) 390  $\mu\text{M}$ .

Reagente 3: PMS ( *Phenazine methylsulfate*) 10  $\mu\text{M}$ .

Solvente: tampão TRIS-HCl 16  $\mu\text{M}$

#### 4.2.1.4 SISTEMA CAROTENO / ÁCIDO LINOLEICO

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada utilizando o sistema modelo do  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico, adotando o procedimento proposto por Marco (1968), modificado por Miller (1971). Neste método, os produtos da degradação do ácido linoléico pela oxidação, são medidos indiretamente pela taxa de destruição oxidativa do  $\beta$ -caroteno.

Inicialmente foi feita a mistura reativa com os seguintes materiais: adicionou-se 50  $\mu$ L de ácido linoleico, seguido de 200  $\mu$ L de tween 80, 150  $\mu$ L de solução  $\beta$ -caroteno (2 mg.mL<sup>-1</sup> em clorofórmio) e 500  $\mu$ L de clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio sob nitrogênio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se cerca de 25 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 min e agitou-se vigorosamente.

Para a reação, adicionou-se 240  $\mu$ L da emulsão, 10  $\mu$ L do inibidor (extrato ou padrão ácido ascórbico) e realizou-se a leitura da placa em leitor de Elisa a 340 nm. Incubou-se a placa a 50 °C e efetuou-se a leitura com intervalos de 15 min durante 120 min em espectrofotômetro de microplaca.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, que foi calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle (% Inibição) através da equação a seguir:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A2_{\text{amostra}} - A1_{\text{amostra}} / A2_{\text{controle}} - A1_{\text{controle}}) * 100.$$

#### 4.2.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR

Para a determinação do espectro de absorção dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos dos resíduos, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada extrato na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, foram diluídas em 900  $\mu$ L de DMSO e o espectro de absorção na

região U.V. das amostras foi determinado na faixa de comprimento de onda entre 200 a 500 nm ("U.V. scanning") utilizando espectrofotômetro Beckman DU-70.

## 4.2.3 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

### 4.2.3.1 ENZIMAS TECIDUAIS

#### 4.2.3.1.1 TIROSINASE

A atividade da inibição enzimática da tirosinase foi realizada segundo descrito em Chan *et al.* (2008), com modificações. Inicialmente foi realizado o controle da solução enzimática com concentração de 0,1 mmol/L adicionando-se 80 µL da mesma, 20 µL de DMSO e 100 µL da solução do reagente de cor L-DOPA 1 mmol/L em uma microplaca. Esta solução foi monitorada a cada 5 min durante 20 min até que a sua absorvância fosse de aproximadamente 1,00.

O teste compôs-se inicialmente da adição de 20 µL da amostra a ser analisada com 80 µL da solução enzimática de tirosinase, sendo incubado a 37 °C e por 5 min. Em seguida foram adicionados 100 µL da solução do reagente L-DOPA e novamente incubado a 37 °C, sendo a leitura realizada a cada 5 min por 20 min em comprimento de onda de 420 nm em aparelho leitor de microplaca modelo DTX 800, Beckman.

A substância ácido kójico foi utilizada como padrão referência e o cálculo da concentração,  $CI_{50}$ , é dado através da seguinte fórmula utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{absT_{20} \text{ amostra} - absT_0 \text{ amostra}}{absT_{20} \text{ controle} - absT_0 \text{ controle}} \right) \times 100$$

Onde  $absT_0$  = absorvância inicial (tempo: 0 min) e  $absT_{20}$  = absorvância final (tempo: 20 min).

#### **4.2.3.1.2 HIALURONIDASE**

A inibição da atividade de hialuronidase foi determinada conforme descrito por Marchesan *et al.* (2006). Uma alíquota de 5 µL do padrão, do extrato e do controle foi adicionado em triplicata em poços separados. Acrescentou-se 40 µL de tampão acetato, 30 µL da solução da enzima hialuronidase (Tipo IV-S: obtido de testículo bovino, Sigma Co.) e incubou-se por 5 min a 37 °C. Após a incubação, 125 µL da solução de ácido hialurônico foi adicionado e incubado por 40 min a 37 °C. Em seguida, 40 µL de tetraborato de potássio 0,8 M foi adicionado na mistura de reação que novamente foi incubada em banho de ebulição por 5 min. Em seguida, adicionou-se 90 µL de DMAB (dimetilaminobenzaldeído) e incubou-se por mais 20 min. Finalmente, a absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 560 nm e calculou-se a porcentagem de inibição.

#### **4.2.3.1.3 COLAGENASE**

Em uma placa de 96 poços foram colocados 10 µL do solvente da amostra e do padrão quercetina. Em seguida, foram adicionados 10 µL da solução da enzima colagenase (10 mg/mL) e 80 µL de tampão tricina 50 mM pH 7,5. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 min e, 100 µL do substrato FALGPA (1,6 mM) foram adicionados a ela. A leitura foi realizada de 10 em 10 min em 340 nm até o tempo de 60 min, a temperatura ambiente (Wart, 1981).

#### **4.2.3.2 ENZIMAS DISGESTIVAS**

##### **4.2.3.2.1 α-AMILASE**

O método de inibição da α-amilase de acordo com Subramanian *et al.*, (2008) com modificações. O teste consistiu na adição de 20 µL do extrato nas

concentrações de 1 a 1000 mg/mL diluído em DMSO, juntamente com 200  $\mu$ L de amilase diluída em água deionizada na concentração 0,1 mg/mL.

Para o padrão positivo foi adicionado 20  $\mu$ L de acarbose diluída em DMSO e 20  $\mu$ L de amilase. Para o controle adicionou-se somente 40  $\mu$ L de DMSO. Após incubar por 5 min em estufa a 37 °C foram acrescentados 200  $\mu$ L da solução do substrato da  $\alpha$ -amilase em cada um dos poços, e em seguida efetuada a primeira leitura a 406 nm.

A microplaca foi incubada novamente a 37 °C por mais 10 min e assim foi efetuada a segunda leitura na mesma absorbância. A porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase foi avaliada a partir da seguinte equação utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{\text{abs}T_{20} \text{ amostra} - \text{abs}T_0 \text{ amostra}}{\text{abs}T_{20} \text{ controle} - \text{abs}T_0 \text{ controle}} \right) \times 100$$

#### 4.2.3.2.2 LIPASE

Para a determinação da inibição da lipase foi utilizado a metodologia descrita por Lee *et al.* (1993). Foi utilizada solução de lipase com concentração de 1 mg/mL em tampão fosfato 10 mM com pH ajustado para 8,0. Para o substrato cromogênico utilizou-se uma solução de éster do ácido 1-2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (6-metilresorufina)- em tampão fosfato. Como padrão utilizou-se xenical a 1mg.mL<sup>-1</sup>.

Foram adicionados nos poços individuais 25  $\mu$ L de extrato nas concentrações de 1 a 1000 mg/mL, 25  $\mu$ L de tampão fosfato para análise do controle negativo. Em seguida adicionou-se 75  $\mu$ L da solução enzimática em cada poço e após 5 min de incubação a 37 °C, 80  $\mu$ L do tampão fosfato foi adicionado e assim efetuada a primeira leitura no leitor de microplaca a 405 nm.



Em seguida, 20 µL do substrato cromogênico foi adicionado, sendo a reação submetida à incubação novamente a 37 °C por mais 20 min. Após esse tempo foi realizada a leitura da absorbância final.

Como padrão utilizou-se xenical (orlistat) e o cálculo da inibição foi efetuada a partir da seguinte equação utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{\text{abs}T_{20} \text{ amostra} - \text{abs}T_0 \text{ amostra}}{\text{abs}T_{20} \text{ controle} - \text{abs}T_0 \text{ controle}} \right) \times 100$$

#### 4.2.3.2.3 α-GLICOSIDASE

A análise foi baseada no método segundo Andrade-Cetto *et al*, (2008) com modificação. Nos poços teste foram adicionados 20 µL dos extratos nas concentrações de 1 a 1000 µg.mL<sup>-1</sup> e 180µL enzima da solução de α-glicosidase para incubação. Os extratos foram diluídos com DMSO, sendo também utilizado tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6,9.

Após incubar por 5 minutos em estufa com temperatura de 37 °C, foi efetuada a leitura inicial em absorbância de 405 nm, e em seguida adicionou-se em cada poço 100 µL da solução de substrato 4-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo.

A microplaca foi incubada então por mais 15 min e efetuou-se a segunda leitura (leitura final). Como padrão utilizou-se a acarbose, e o cálculo da inibição é dado através da equação utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{\text{abs}_{\text{final}} \text{ amostra} - \text{abs}_{\text{inicial}} \text{ amostra}}{\text{abs}_{\text{final}} \text{ controle} - \text{abs}_{\text{inicial}} \text{ controle}} \right) \times 100$$

## **4.2.4 ENSAIOS EM CÉLULA**

### **4.2.4.1 ANTIOXIDANTE EM CÉLULA**

#### **4.2.4.1.1 CULTURA DE CÉLULAS**

As células 3T3-L1 (fibroblastos embrionários) foram obtidas a partir do Banco de Célula do Rio de Janeiro, Brasil, e mantidas em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina ( $100 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e estreptomicina ( $100 \text{ U.mL}^{-1}$ ). As células foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  numa atmosfera umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### **4.2.4.1.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

A produção de ROS intracelular foi detectada utilizando o composto não fluorescente que permeia célula, diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF-DA), tal como descrito por Wolfe e Liu (2007). DCF-DA é hidrolisado por esterases intracelulares e, em seguida, oxidado por hidroperóxidos no composto fluorescente, 2'-7'-DCF. Células 3T3-L1 foram cultivadas a uma densidade de  $6 \cdot 10^4$  células / poço numa microplaca de 96 poços em 100  $\mu\text{L}$ . Após 24 horas, o meio de crescimento foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, uma solução a 10  $\mu\text{M}$  de DCFH-DA, dissolvido em tampão de Hank (100 mL) foi adicionado aos poços e incubado durante 30 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . As células foram inicialmente lavadas com PBS (100 mL), em seguida EEP (100 mL) e as amostras foram adicionados. A fluorescência foi imediatamente medida a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm durante 60 minutos a intervalos de 5 min. Os controles com / sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a procedimentos análogos. O flavonoide quercetina, foi usada como controle positivo da atividade antioxidante.

#### **4.2.4.2 CITOTOXICIDADE**

Os testes de citotoxicidade foram realizados em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sob supervisão da Prof. Dra. Marne Vasconcellos.

##### **4.2.4.2.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR**

A citotoxicidade dos extratos para a linhagem celular de fibroblastos 3T3L1 foi determinada pelo método de azul de Alamar, conforme descrito por Nakayama e colaboradores (1997). O ensaio de azul de alamar é um ensaio colorimétrico que envolve a redução celular de resazurina a resorufina. Resumidamente, as células ( $5 \cdot 10^3$  células / poço) foram cultivadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços e expostas aos extratos durante 24, 48 e 72 h. Após a incubação, a solução de azul de alamar (10  $\mu$ l de 0,4 % azul de Alamar (resazurina) em PBS) foi adicionada e as células foram incubadas durante 2 h a 37 °C. A fluorescência foi medida (excitação a 545 nm e emissão a 595 nm) e expressa em percentagem por meio da subtração da fluorescência das células de controle. Os ensaios foram realizados em triplicado.

##### **4.2.4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO**

Foi utilizado sangue de camundongo (*Mus musculus*) diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM). Esse sangue foi lavado 2 vezes em solução salina por centrifugação (5000 rpm/3min). Ao final das lavagens, foi utilizada uma suspensão de eritrócitos a 2%. Os experimentos foram realizados em placas com 96 poços, onde os dois primeiros poços de cada fileira receberam 50  $\mu$ L da substância teste. Do segundo poço em diante, adicionou-se 50  $\mu$ L de salina em todos e a partir daí foram feitas diluições de modo que a concentração fosse sempre a metade da anterior. Depois de 1 h sob agitação constante à temperatura ambiente (25°C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/ 3 min), e a atividade hemolítica foi medida pela absorbância desses sobrenadantes em 450nm. A hemólise total foi

induzida usando Triton X-100 1% (controle positivo), sendo esse tomado como valor base para as medidas encontradas (Jimenez *et al*, 2003).

## 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

### 4.3.1 FENÓIS TOTAIS

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, baseado no método de Singleton e Rossi (1965) com modificações, que se fundamenta na redução do fosfomolibdato-fosfotungstato, a molibdênio, na presença de substâncias fenólicas. Há a formação de complexos de coloração azul que absorvem fortemente entre 620 e 700 nm. Alíquotas de 10 µL das amostras (concentradas em 1 mg/mL) foram transferidas para uma placa de 96 poços. Adicionou-se 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1/10 em água destilada) e incubou-se por 8 min. Adicionaram-se então, 240 µL de carbonato de sódio (0,4% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e após 3 min, registrara-se a absorbância em 620 nm.

A curva analítica foi construída nas concentrações entre 0,26 a 33µg de ácido gálico por mL de solução. O resultado foi expresso de duas formas, em percentagem e como micrograma (µg) de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 gramas de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata

$$\% \text{ Polifenóis} = (Abs_{amostra} / Abs_{padrão}) \times 100$$

### 4.3.2 FLAVONOIDES TOTAIS

A quantidade de flavonoides totais foi determinado pelo método colorimétrico segundo Chang *et al.* (2002) com modificações. A técnica baseia-se na medida da absorbância, a 510 nm, do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio,

formando compostos de coloração amarelada. O  $\text{Al}^{3+}$  forma complexos estáveis com os flavonoides em álcool, ocorrendo um desvio para maiores comprimentos de onda (batocrômico) e uma intensificação da absorção.

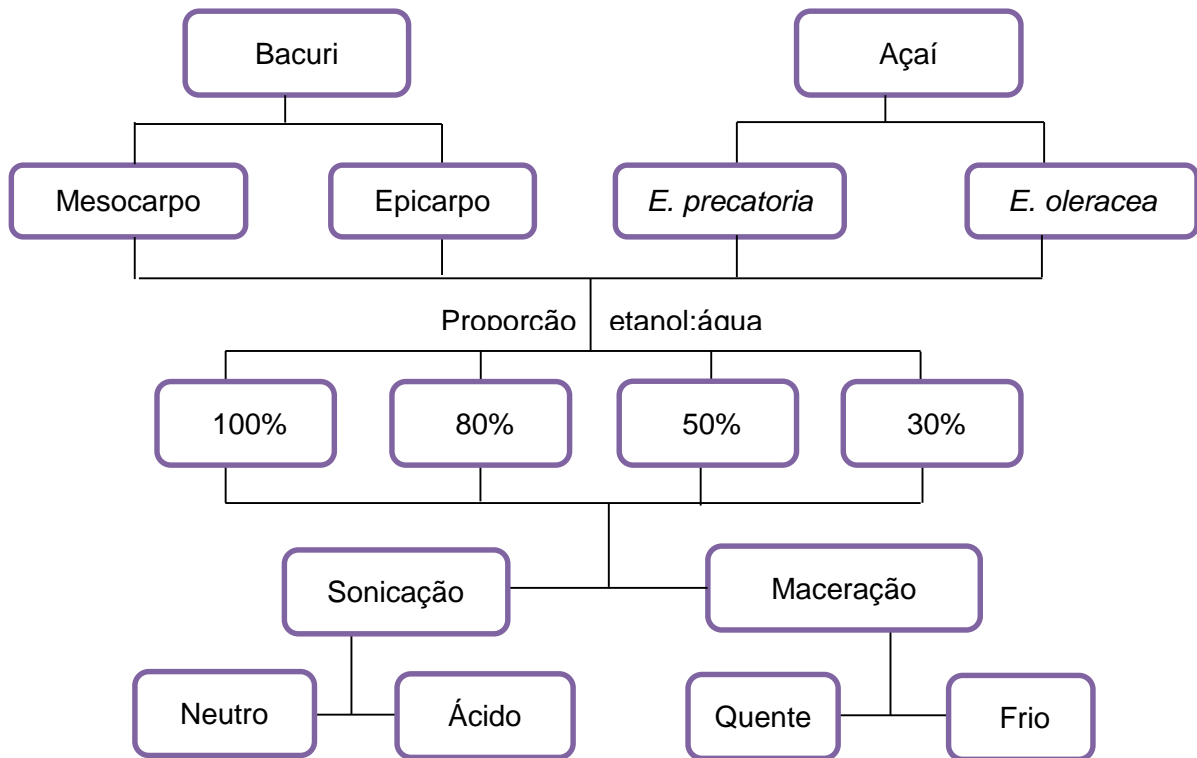
Os extratos foram diluídos em DMSO na concentração de 1 mg/mL. Em seguida foram-se adicionado 30  $\mu\text{L}$  de cada extrato e 90  $\mu\text{L}$  de etanol em cada cavidade da microplaca. Adicionou-se em seguida 6  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio a 10%, 6  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio 1M e 168  $\mu\text{L}$  de água destilada. A placa foi então incubada por 30 min em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a determinação da absorbância da leitura no comprimento de onda de 405 nm, em leitor de ELISA.

Os resultados foram obtidos utilizando-se, primeiramente a diferença das absorbâncias das amostras e do padrão pela absorbância dos respectivos brancos. Logo após foi determinada a concentração de flavonoides. A quercetina foi utilizada como padrão e os resultados foram expressos em percentagem (%) de flavonoides presentes nas amostras.

$$\% \text{ flavonoides} = (Abs_{\text{amostra}} / Abs_{\text{padrão}}) \times 100$$

## 4.4 OTIMIZAÇÃO DAS EXTRAÇÕES DE FENÓLICOS

As amostras de sementes de açaí e bacuri foram recoletadas em maiores quantidades e realizou-se a otimização do método de extração conforme o fluxograma 3.



Fluxograma 3: Metodologias de extrações utilizadas na otimização

### 4.4.1 SONICAÇÃO

#### 4.4.1.1 SOLVENTE NEUTRO

Adicionou-se o material vegetal, seguido da adição de etanol e extraiu-se em ultrassom por 30 minutos. Após a extração do material vegetal, a solução foi filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório.

#### 4.4.1.2 SOLVENTE ATIVO (ACIDIFICADO)

O material vegetal foi adicionado em etanol acidificado (10  $\mu$ L de HCl 10% em 100 mL de solvente) e extraído em ultrassom por 30 minutos. Após a extração do

material vegetal, a solução foi filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório.

## **4.4.2 MACERAÇÃO**

### **4.4.2.1 A FRIO**

Adicionou-se o material vegetal e o solvente em um frasco âmbar por um período de 48 h horas em temperatura ambiente. Após a extração do material vegetal, a solução foi filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório. Foram testados diferentes proporções de solventes (etanol 100% e etanol:água nas proporções de 80, 50 e 30%).

### **4.4.2.2 A QUENTE**

Adicionou-se o material vegetal e o solvente em um frasco âmbar e realizou-se a extração a quente, em uma temperatura de 50 °C, por um período de 2 h sob agitação com um bastão de vidro. Após a extração do material vegetal, a solução foi filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório.

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o efeito do tipo de extração e do solvente, utilizou-se uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) baseada em um delineamento de experimento fatorial com resposta multivariada, utilizando o fator 2<sup>4</sup>, utilizando o fator técnica de extração nos 04 níveis: maceração a quente (MQ), maceração em temperatura ambiente (MF), sonicação com solvente neutro (SN) e sonicação com solvente ativado (SA) e o fator solvente nos níveis solvente etanol e água (EtOH:H<sub>2</sub>O): 100% (1:0), 80% (4:1), 50% (1:1) e 20% (1:4). A resposta multivariada é representada pela terna: % rendimento, % de fenólicos, % de flavonoides, capacidade antioxidante (ABTS<sup>•+</sup>) e Capacidade antioxidante (DPPH<sup>•</sup>). A MANOVA é desbalanceada, pois foram obtidas três medidas do percentual de rendimento e nove medidas de leituras do percentual nos demais itens avaliados.

O modelo estrutural utilizado para o delineamento fatorial foi representado por

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_j + \beta_k + \gamma_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

em que  $\mu = (\mu_R, \mu_{Fe}, \mu_{Fl})$  é o vetor de médias globais,  $\tau_j = (\tau_{jR}, \tau_{jFe}, \tau_{jFl})$  mede o efeito do *j*-ésimo método de extração,  $\beta_k = (\beta_{kR}, \beta_{kFe}, \beta_{kFl})$  representa o efeito do *k*-ésimo tipo de solvente,  $\gamma_{jk} = (\gamma_{jkR}, \gamma_{jkFe}, \gamma_{jkFl})$  mede o efeito da interação método-solvente e  $\epsilon_{ijk}$  representa o erro aleatório. As comparações de médias entre os níveis dos fatores (método, solvente e método-solvente), foram realizadas através do teste de Tukey.



## 4.6 CARACTERIZACAO QUIMICA

### 4.6.1 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

#### 4.6.1.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O perfil dos extratos brutos foi avaliado por espectrometria de massas. Os extratos foram devidamente solubilizados em metanol de grau CLAE, adicionados em placas cromatográficas de ultra eficiência e eluidas em duas dimensões. Os espectros foram adquiridos utilizando fonte *electrospray* (ESI) e por dessorção (DESI) acopladas a um espectrometro de massa de armadilha de ions (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). O programa Xcalibur 2,0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, EUA) foi utilizado para aquisição e processamento de dados. Utilizou-se fluxo de 3 mL/min. Os espectros de massa foram adquiridos, tanto no modo negativo e quanto no positivo, com varredura entre  $m/z$  150 a  $m/z$  950. A identificação dos íons foi realizada após a obtenção das imagens utilizando dissociação induzida por colisão (MS/MS) com energia de colisão entre 10 e 40.

#### 4.6.1.2 IMAGEM DE PLACAS DE HPTLC

A imagem das placas de HPTLC foi realizada por continuamente a digitalização da superfície na direção x, a uma velocidade de superfície entre 400 e 600 mm/s, enquanto o tempo por linha estava entre 1,11 e 1,67 no modo de varredura completa no intervalo 150-900. No final de cada direção x, o ciclo era reiniciado até que toda a área (4 centímetros x 4cm) tivesse sido coberto. Este procedimento resultou em de cerca de 20.000 espectros de massa

## **4.6.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

### **4.6.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA**

O comportamento cromatográfico das amostras foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas cromatográficas de fase normal de gel de sílica para os extratos obtidos e suas frações. Os eluentes foram preparados conforme a natureza da amostra visando a melhor separação cromatográfica. Como reveladores, foram utilizados luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  e  $356 \text{ nm}$ ), sulfato cérico, vanilina sulfúrica, cloreto férrico e NP-PEG.

### **4.6.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

Os compostos fenólicos e flavonoidicos foram separados numa coluna Synergi Hidro C18 (4 mm, 150 cm x 4,6 mm, Phenomenex) em 0,7 mL/min de fluxo, com temperatura da coluna de 29 °C, utilizando um gradiente linear de água: ácido fórmico (99,5: 0,5, v/v) (solvente A) e acetonitrila: ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (solvente B), como a fase móvel em gradiente de A: B de 99:1 a 50:50 em 30 min, depois de 50:50 a 1:99, em 15 min. Esta última razão (1:99), foi mantida durante um adicional de 5 min. Os fenólicos foram quantificados por comparação com padrões externos, utilizando seis curvas analíticas pontuais (em triplicata).



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 - RESÍDUOS AMAZÔNICOS E SUAS BIOATIVIDADES

Os resíduos das frutas Amazônicas geradas como subprodutos das polpas são produzidos em larga escala e geralmente possuem maior proporção de massa do que a parte utilizada pela indústria. Há espécies em que o percentual de polpa é inferior a 15%, como é o caso do bacuri, açaí, buriti, entre outros. Há poucos estudos caracterizando esses materiais e nos últimos anos vêm crescendo o interesse no aproveitamento devido as pesquisas demonstrarem um elevado potencial biológico somado ao baixo custo destes subprodutos. A figura 20 ilustra algumas frutas que foram objeto deste estudo.



Figura 20: frutos amazônicos

Os resultados dos rendimentos podem ser visualizados no gráfico 3 e são descritos na tabela 04.

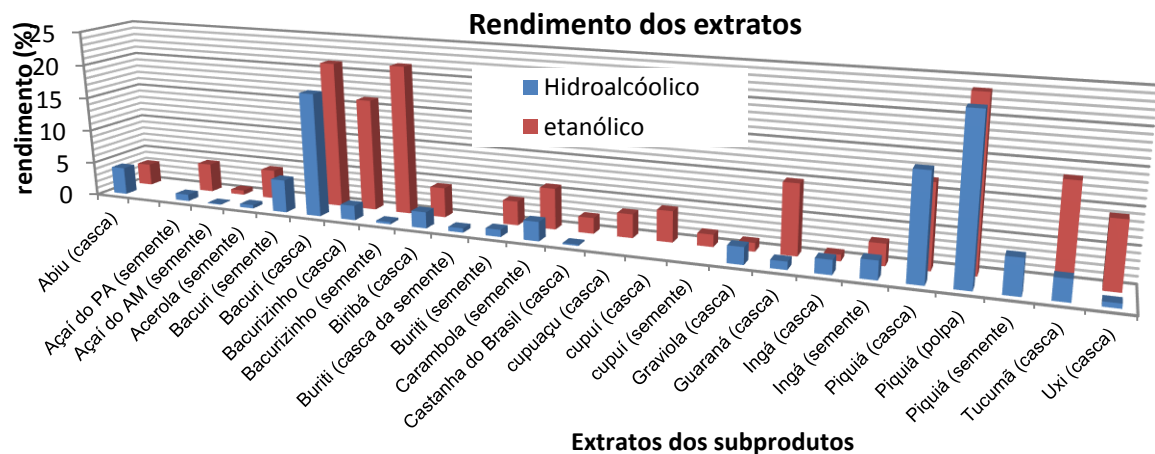


Gráfico 3: Rendimento dos extratos

Os valores dos rendimentos variaram de 0,11 à 23,62%, tendo cada matéria prima sua particularidade. Os maiores rendimentos foram encontrados na casca e na semente de bacurizinho com 16,29 e 21,63%; na casca de guaraná: 13,58%; e na casca e na polpa de piquiá, com 14,73 e 23,62%, respectivamente. Os menores rendimentos foram encontrados nas sementes de açaí (0,11%), acerola (0,5%) e cascas de castanha (0,15%).

Tabela 04: Rendimento dos extratos (%).

Planta/parte	Solvente extrator	
	Hidroalcolico	etanólico
Abiu (casca)	4,04	3,19
Açaí do PA (semente)	0,97	4,24
Açaí do AM (semente)	0,11	0,65
Acerola (semente)	0,5	4,3
Bacuri (semente)	4,8	NR
Bacuri (casca)	17,98	21,31
Bacurizinho (casca)	2,12	16,29
Bacurizinho (semente)	0,32	21,63
Biribá (casca)	2,35	4,32
Buriti (casca da semente)	0,62	NR
Buriti (semente)	1,03	3,47
Carambola (semente)	2,77	5,9
Castanha do Brasil (casca)	0,18	2,26
Cupuaçu (casca)	NR	3,39
Cupuí (casca)	NR	4,43
Cupuí (semente)	NR	1,74
Graviola (casca)	2,43	1,22
Guaraná (casca)	1,13	9,95
Ingá (casca)	2,03	0,91
Ingá (semente)	2,62	3,04
Piquiá (casca)	14,73	11,76
Piquiá (polpa)	22,72	23,62
Piquiá (semente)	4,97	NR
Pupunha (sementes)	NR	0,44
Tucumã (casca)	3	13,58
Uxi (casca)	0,66	9,31

NR = não realizado

Rendimentos altos como os de bacuri e piquiá não são encontrados comumente tanto em frutas, quanto em espécies vegetais. Os extratos de sementes

encontrados nesse trabalho, como o de bacurizinho (21,63%) e de açaí (4,24%) também foram superiores aos reportados em outras sementes descritas na literatura, como os extratos de sementes de limão que apresentaram a média de 11,83% na extração em etanol (Luzia e Jorge, 2010).

Os rendimentos nos extratos de cascas e sementes apresentam variação dependendo das classes de substâncias presentes em cada extrato e do solvente utilizado. Em um trabalho com resíduos utilizando as cascas dos frutos de coco (*Cocos nucifera*), rambutã (*Nephelium lappaceum*) e mangostão (*Garcinia mangostana*), os rendimentos dos extratos etanólicos foram de 5,8, 10,7 e 7,2%, respectivamente. Porém, ao serem extraídos por solventes com gradiente crescente de polaridade, o solvente mais polar, metanol, extraiu um rendimento superior ao encontrado anteriormente, com 15,9, 25,5 e 18,8%, respectivamente (Khonkarn *et al.*, 2010).

Verifica-se com isso que as condições de extração são fatores muito importantes no rendimento e podem interferir consideravelmente no resultado final. Para um melhor aproveitamento, faz-se necessário uma programação tendo em vista parâmetros como solvente, número de extrações consecutivas e método de extração.

Os extratos hidroalcoólicos apresentaram de forma geral, menor rendimento que os etanólicos. Um dos fatores que contribui é a metodologia de evaporação do solvente utilizado, aspensão. A evaporação em “spray drier” é uma técnica muito utilizada pela indústria farmacêutica para formulações e de alimentos. O processo mais conhecido é a desidratação de leite, caracterizando popularmente a máquina como “máquina do leite em pó” (Gabites, Abrahamson e Winchester, 2010; Anwar *et al.*, 2013; Langrish e Premarajah, 2013).

A secagem por aspersão consiste, basicamente, na atomização do líquido em um compartimento que recebe um fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água ou solvente hidroalcolólico permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto. Esse método apresenta muitas vantagens como a produção em larga escala, a formação de um pó sólido, de fácil aplicação em fórmulas cosméticas e em encapsulamento (Nonhebel e Moss, 1971 *apud* Oliveira e Petrovick, 2010).

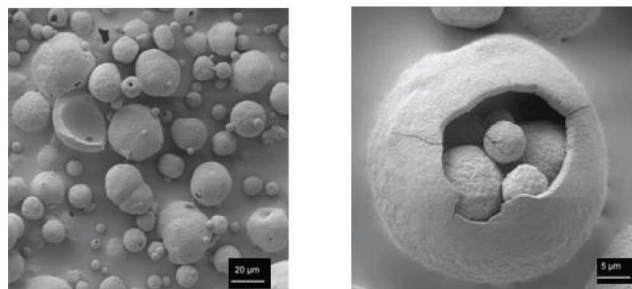


Figura 21. Microfotografia de extrato seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* 500 e 2000x (Soares, 2002).

As características do pó produzido em secadores por aspersão dependem principalmente das variáveis operacionais do secador (temperaturas de entrada e saída do ar do secador) e da composição química do extrato. Nesse trabalho, algumas matérias primas como o piquiá, tucumã, castanha e bacuri apresentaram um ótima consistência, resultando em um sólido semelhante à figura 21. Porém nas outras amostras como carambola, cará e cupuaçu formou-se um extrato caramelizado, como pode ser visualizado na figura 22:



Figura 22: Extrato de carambola seco por aspersão

Um dos mecanismos para minimizar esse efeito é o uso de aditivos promotores de secagem, procedimento indispensável na secagem por aspersão da maioria das polpas de frutas, visto que esses materiais, por conterem alto teor de açúcares, são propícios a caramelização, inviabilizando o processo (Oliveira *et al.*, 2006). Nessa parte experimental não foram adicionadas nenhum aditivo, tendo em vista que esse não era o objetivo deste trabalho. Estudos futuros que visem à aplicação dos materiais que apresentarem resultados mais promissores poderão vir a serem trabalhados mais detalhadamente nesta técnica.

## 5.2 ENZIMAS DIGESTIVAS

A tendência global de pessoas com obesidade vem crescendo e representa uma grande ameaça à saúde mundial, estando associada ao aparecimento de diversas doenças crônicas, como a diabetes. O principal objetivo na busca por drogas hipoglicemiantes e inibidoras de lipase é descobrir um agente eficiente que seja seguro e que não apresente efeitos colaterais devido a sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (Negri, 2005).

Um dos métodos utilizados nas pesquisas científicas está relacionado à inibição das enzimas digestivas que hidrolisam os carboidratos. Dentre essas enzimas estão a amilase e a glicosidase. Muitas espécies de plantas e frutas têm sido testadas experimentalmente com esse intuito. Neste trabalho foi realizada avaliação para três enzimas digestivas e os resultados do potencial dos subprodutos na inibição das enzimas amilase, lipase e glicosidase está sumarizado nas tabela 5.

A  $\alpha$ -amilase é uma enzima monomérica que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos no processo digestivo para posterior ação das glicosidases, liberando açúcares simples para serem absorvidos nas membranas dos enterócitos, desempenhando importante papel no



controle de níveis de glicose no sangue (Rhandir e Shetty, 2007). A redução da absorção de carboidratos na saúde humana, pela inibição da amilase, pode ser uma alternativa terapêutica no controle glicêmico (Negri, 2005).

A atividade da inibição de  $\alpha$ -amilase é avaliada por meio da formação de maltose resultante da ação desta enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose (ligação  $\alpha$  1,4) reduz o DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) formando um produto de cor característica cuja absorbância máxima é determinada a 540 nm.

Tabela 5: Inibição enzimática dos extratos

Amostra	extratos hidroalcoólicos			extratos etanolicos		
	Amilase	Lipase	Glicosidase	Amilase	Lipase	Glicosidase
Abiu (casca)	72,84±0,76	<1	<1	62,35±1,94	19,78±4,35	<1
Açaí do AM (semente)	48,80±1,10	24,43±2,56	78,63±3,62	66,50±1,31	13,03±7,19	93,37±0,83
Açaí do Pará (semente)	16,50±0,53	36,09±6,50	89,42±0,97	48,22±3,39	43,96±1,43	94,44±0,52
Acerola (semente)	50,62±1,50	<1	<1	80,27±1,39	17,80±1,05	88,75±2,10
Bacuri (semente)	21,93±0,45	55,75±18,76	95,27±0,09	62,95±0,66	30,72±0,93	75,59±6,13
Bacurizinho (casca)	53,64±1,54	44,59±8,74	92,66±0,71	14,65±0,17	26,10±4,91	96,86±0,13
Bacurizinho (semente)	41,54±0,98	4,43±3,44	74,17±2,52	77,45±2,05	51,67±3,76	85,75±2,53
Biribá (casca)	48,45±1,57	39,60±2,37	45,60±9,18	21,27±1,38	52,41±7,07	80,02±0,54
Buriti (casca da semente)	46,11±0,40	27,04±9,17	76,60±6,15	60,69±1,68	18,00±0,66	81,81±0,79
Carambola (semente)	63,11±2,31	13,54±0,33	28,77±0,57	88,53±0,40	26,83±3,43	65,81±7,18
Castanha (casca)	15,82±1,14	41,53±2,58	95,87±0,05	13,55±0,53	42,38±4,71	62,22±0,44
Cupuaçu (casca da semente)	NR	NR	NR	69,23±1,20	11,31±2,34	85,44±0,23
Cupuaçu (casca)	NR	NR	NR	51,33±1,41	36,97±1,14	82,37±2,91
Cupuí (casca)	NR	NR	NR	13,50±0,71	48,00±0,75	96,71±0,04
Graviola (casca)	77,00±0,34	<1	<1	41,78±1,39	55,54±1,106	66,18±3,51
Guaraná (casca)	47,65±0,90	9,98±2,17	75,24±6,26	57,42±1,66	1,21±4,98	<1
Ingá (casca)	16,82±0,26	18,08±17,06	48,49±11,88	36,30±2,19	53,84±1,89	89,21±0,35
Ingá (semente)	56,70±0,88	<1	<1	20,26±0,49	59,33±1,62	90,18±0,64
Piquiá (casca)	21,14±0,73	31,94±4,24	69,89±0,41	23,10±0,65	30,82±5,59	59,67±7,26
Piquiá (polpa)	19,76± 0,6	16,65±2,88	64,21±2,55	20,03±0,08	34,89±2,03	46,40±0,51
Piquiá (semente)	34,94±1,66	23,13±4,74	25,21±4,03	81,34±0,89	<1	54,84±4,52
Tucumã (casca)	21,76±2,10	<1	25,85±14,24	79,27±3,09	23,25±2,52	81,37±3,22
Uxi (casca)	53,53±1,81	<1	44,78±23,20	92,56±2,85	37,71±4,69	93,24±0,46

Os extratos que apresentaram a maior capacidade de inibição foram os de uxi (92,50%) e tucumã (79,27%) e as sementes de acerola (80,27%), bacurizinho (77,45%) e carambola (88,53%). Os extratos em etanol apresentaram maior potencial inibitório comparado com os hidroalcoólicos. Os maiores percentuais de inibição podem ser verificados no gráfico e na tabela 5.

Alguns compostos orgânicos estão sendo associados à atividade inibitória de enzimas digestivas. Segundo Silva (2008), os inibidores não protéicos são moléculas de baixo peso molecular, como os compostos fenólicos. Segundo Salunkhe *et al.* (1990), os fenóis interagem com as proteínas formando complexos, possivelmente responsável pela inibição. Dessa forma, esses dados corroboram com os resultados para as amostras que apresentaram a maior capacidade de inibição neste trabalho, já que estas apresentaram maiores teores de fenólicos totais.

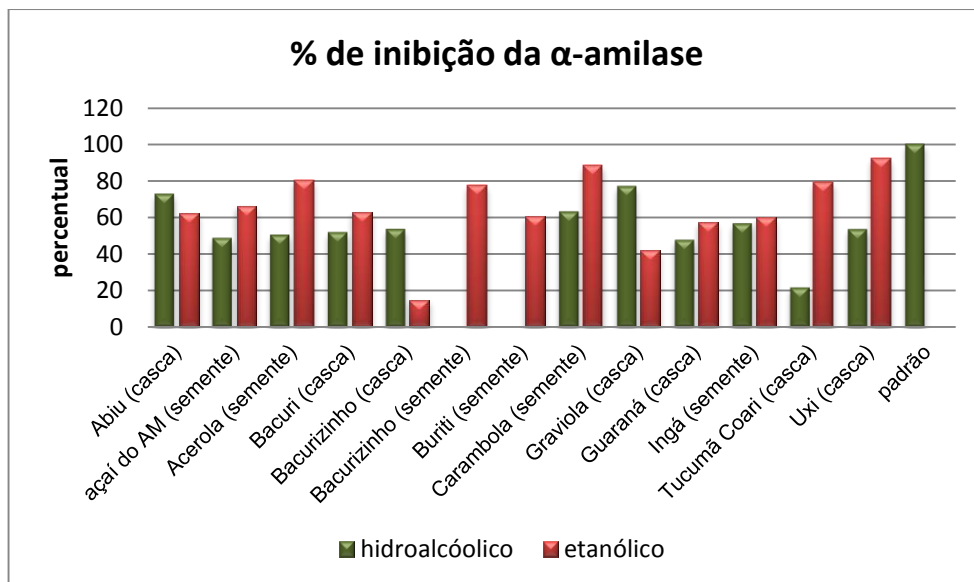


Gráfico 4 : Percentagem de inibição de  $\alpha$ -amilase em concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Poucos estudos estão disponíveis na literatura sobre a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase em frutos e resíduos. No trabalho de Correia (2004), observou-se que os extratos fenólicos produzidos a partir de resíduos de abacaxi demonstraram ação

anti-amilolítica. Em um estudo similar, com resíduos de abacaxi e goiaba, ambos apresentaram capacidade de inibir completamente a ação da enzima  $\alpha$ -amilase (Souza, 2009)

A inibição da enzima  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase mostra-se uma estratégia interessante para o controle de hiperglicemia e obesidade através da redução da quebra do amido e da absorção da glicose no intestino (Kwon *et al.*, 2006). A inibição de glicosidase baseia-se na ação desta enzima sobre um substrato sintético, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo, que, ao ser hidrolisado, libera o cromóforo *p*-nitrofenil. A enzima lipase está envolvida no metabolismo dos lipídios e sua inibição promove uma redução na absorção de triglicerídeos, ocasionando diminuição do aproveitamento calórico e perda de peso (Friedman;Brandon, 2001).

Alguns estudos abordam a inibição conjunta das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Extratos fenólicos de berinjela (*Solanum melongena*) mostraram elevada atividade inibitória da  $\alpha$ -glicosidase seguida de moderada inibição da  $\alpha$ -amilase (Kwon *et al.*, 2008). Neste trabalho, as correlações entre as atividades foram heterogêneas. Entre as inibições, a inibição da  $\alpha$ -amilase foi mais proporcional à inibição da  $\alpha$ -glicosidase que a lipase. A comparação pode ser verificada no gráfico 5. A inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase foi elevada para as amostras de sementes de açaí e bacuri e para os extratos de cascas de castanha, biribá e ingá, com percentagem superior a 80%.

Alguns estudos descrevem as cascas de frutas como uma boa alternativa para o estudo da inibição de enzimas digestivas. As cascas de bacuri, bacurizinho e cupuí apresentaram inibição superior a 95% na enzima glicosidase corroborando com os resultados na literatura para outros frutos. A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), fruta tipicamente brasileira, rica em antocianinas presentes nas cascas, demonstrou

elevada capacidade inibitória sobre enzimas digestivas. O extrato de cascas de uva Norton inibiu a atividade de  $\alpha$ -glicosidase e a ingestão oral desse extrato reduziu a glicemia pós-prandial em ratos, sugerindo um efeito anti-diabético (Zhang *et al.*, 2011).

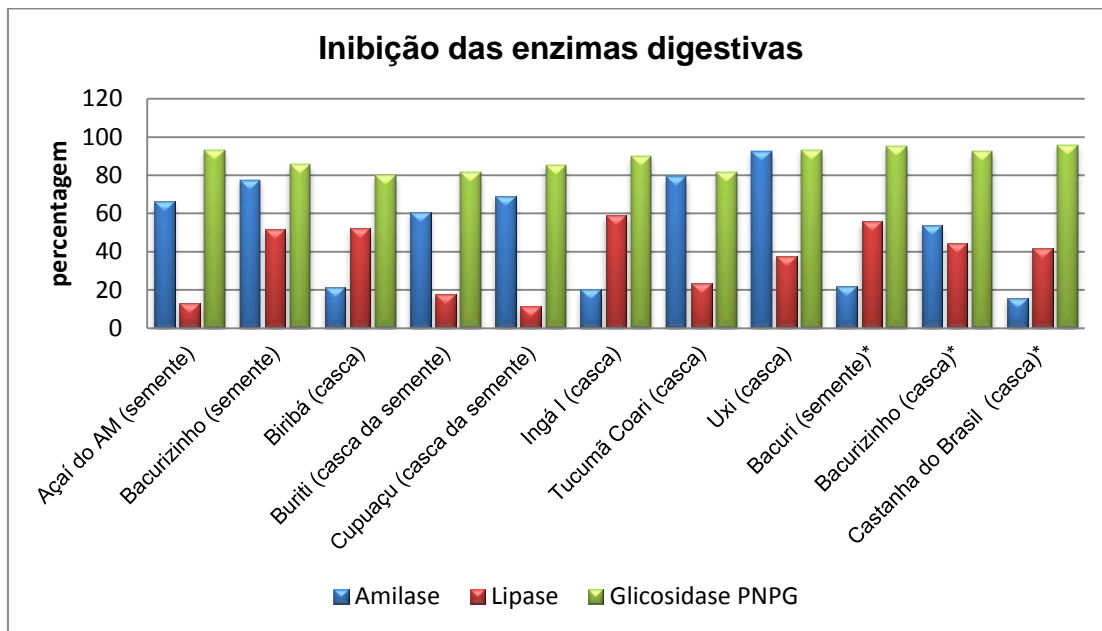


Gráfico 5 : Percentagem de inibição das enzimas digestivas em concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 5.3 TIROSINASE E COLÁGENASE

Nenhuma amostra apresentou inibição maior do que o indicado como uma boa atividade inibitória para enzimas (acima de 50%). Os resultados podem ser verificados na tabela 6.

Os extratos hidroalóolicos de casca de piquiá (35,15%), casca e semente de ingá (23,54 e 24,87%), casca de uxi (24,78%) e os etanólicos, casca de castanha do Brasil (23,31%) e casca de piquiá (30,60%) foram os extratos que apresentaram maiores percentagens de inibição da enzima tirosinase e nenhuma das amostras apresentou atividade de inibição da enzima colagenase.

Tabela 6 : Percentagem de inibição das enzimas teciduais dos extratos.

Amostra	hidroalcóolicos	etanólicos
Abiu (casca)	12,43±2,31	14,93±1,89
Açaí do AM (semente)	16,91±0,84	14,16±0,84
Açaí do Pará (semente)	14,83±5,00	23,25±1,89
Acerola (semente)	16,84±5,34	19,96±0,64
Bacuri (casca)	18,49±1,56	18,79±2,62
Bacurizinho (casca)	5,70±6,25	<1
Bacurizinho (semente)	14,55±4,18	<1
Biribá (casca)	<1	<1
Buriti (casca da semente)	16,89±3,98	18,90±4,16
Buriti (semente)	19,86±5,83	3,69±7,04
Carambola (semente)	20,68±1,20	11,45±2,70
Castanha do Brasil (casca)	<1	23,31±5,23
Cupuaçu (casca)	<1	21,14±0,91
Cupuí (casca)	<1	17,45±1,11
Cupuí (semente)	13,69±7,04	17,50±0,91
Graviola (casca)	24,37±2,37	<1
Guaraná (casca)	14,12±6,33	<1
Ingá (casca)	23,54±2,06	<1
Ingá (semente)	24,87±1,98	<1
Piquiá (casca)	35,15±1,98	30,60±2,64
Piquiá (polpa)	26,97±3,57	22,46±3,21
Piquiá (semente)	18,86±5,13	<1
Tucumã (casca)	19,65±4,90	17,28±2,31
Uxi (casca)	24,78±2,47	7,26±1,51

## 5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Diversos compostos presentes nos frutos, como os polifenóis, são descritos como capazes de matar ou inibir o crescimento de microorganismos. Essas características são relevantes, principalmente em áreas tropicais, como a região amazônica, onde as condições climáticas propiciam o maior crescimento dos microorganismos (Jobim *et al.*, 2013). Nesse trabalho foram selecionadas 30 cepas (tabela 7) para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos.

Tabela 7: Lista dos microorganismos testados.

<b>código</b>	<b>Microorganismo</b>
ATCC 12022	<i>Shigella flexneri</i>
ATCC H9812	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica sorovar Braenderup</i>
ATCC 33090	<i>Listeria innocua</i>
ATCC 15313	<i>Listeria monocytogenes</i>
ATCC 19112	<i>Listeria monocytogenes</i>
ATCC 19117	<i>Listeria monocytogenes</i>
ATCC 14458	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 12598	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 8095	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 12600	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 13813	<i>Streptococcus agalactiae</i>
ATCC 903	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
ATCC 9809	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
ATCC 10557	<i>Streptococcus oralis (Streptococcus sanguis)</i>
ATCC 7953	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
ATCC 12344	<i>Streptococcus pyogenes</i>
ATCC 14506	<i>Enterococcus faecalis (Streptococcus faecalis)</i>
ATCC12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
ATCC27851	<i>Staphylococcus sunulans</i>
ATCC 29971	<i>Staphylococcus xylosum</i>
UFPEL	<i>Staphylococcus intermedius</i>

Os halos de inibição foram moderados e não ultrapassaram o diâmetro encontrado para o padrão (imipenem). Os valores mais próximos foram para os

extratos de piquiá (casca e polpa) ao inibirem a bactéria *Enterobacter cloacae*, com halo de 19 mm e 20 mm, respectivamente, tendo o padrão, 23 mm (figura 23).

Tabela 08: Atividade antimicrobiana dos extratos.

Extrato	Microorganismo sensível	Halo	Impenem (padrão)
Bacuri (casca)	<i>Shigella flexneri</i>	13mm	24mm
Bacurizinho (casca)	<i>Bacillus subtilissubsp. subtilis</i>	12mm	39mm
Bacurizinho (semente)	<i>Bacillus subtilissubsp. subtilis</i>	12mm	39mm
Bacurizinho (semente)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	15mm	20mm
Castanha do Brasil (casca)	<i>Bacillus subtilissubsp. subtilis</i>	12mm	39mm
Piquiá (casca)	<i>Enterobacter cloacae</i>	19mm	23mm
Piquiá (casca)	<i>Shigella flexneri</i>	17mm	24mm
Piquiá (polpa)	<i>Enterobacter cloacae</i>	20mm	23mm
Piquiá (polpa)	<i>Shigella flexneri</i>	15mm	24mm

O extrato da casca de castanha do Brasil apresentou uma pequena inibição para o *Bacillus subtilis subsp.* Na avaliação da atividade antimicrobiana da amêndoa dessa espécie, no trabalho reportado por Buratto *et al.* (2011) o extrato etanólico também não foi capaz de inibir o crescimento das cepas de bactérias, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, semelhantes aos resultados encontrados.

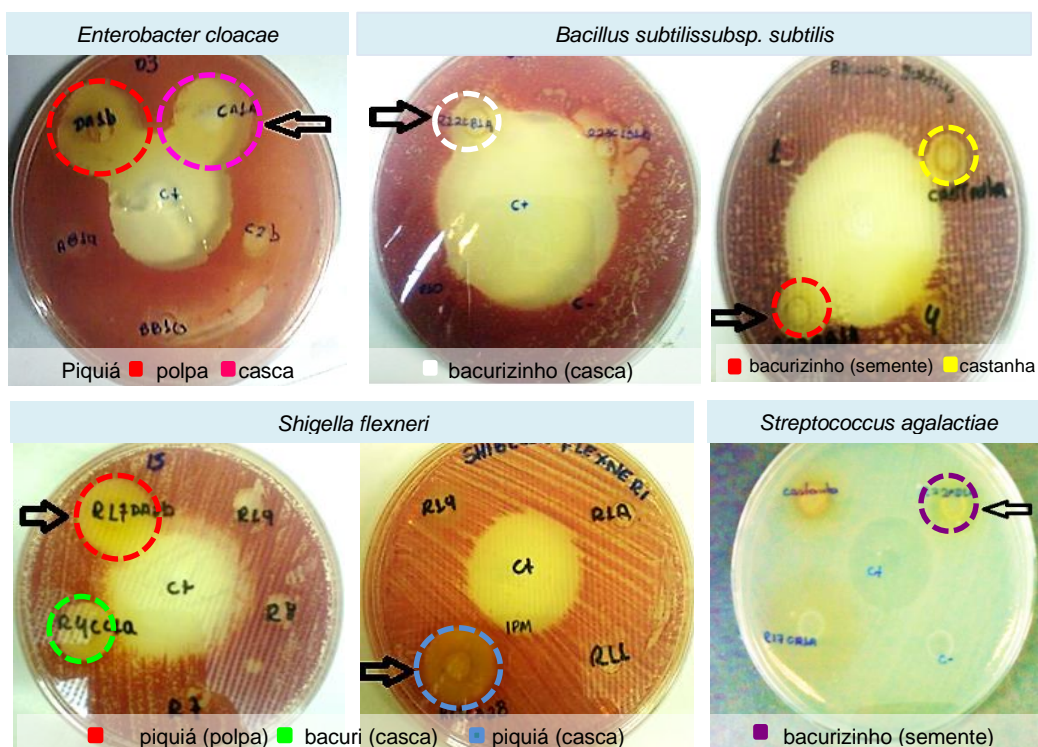


Figura 23: Atividade antimicrobiana pelo método de difusão

Para a inibição de *Bacillus subtilis subsp subtilis*, os melhores resultados dos extratos foram inferiores a 50% do que o de referência, demonstrando que é necessária uma concentração muito alta de amostra para que aconteça a inibição. Os extratos que apresentaram inibição superior a 50% em comparação com o padrão, tiveram suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) avaliadas.

As amostras não apresentaram atividade em comparação com os critérios sugeridos por Holetz *et al.* (2002) (tabela 9), em que os extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações acima de 500 µg/mL possuem atividade fraca, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas.

Tabela 9: Critério de avaliação da atividade antimicrobiana.

CIM DO EXTRATO	RESULTADO
Abaixo de 100 µg/mL	Boa atividade antimicrobiana
Entre 100 e 500 µg/mL M	Moderada atividade antimicrobiana
Entre 500 e 1000 µg/mL	Fraca atividade antimicrobiana
Acima de 1000 µg/mL	Inativo

Fonte: Holetz *et al.* (2002).

Em nenhuma das amostras, a concentração capaz de inibir foi inferior a 1 mg/mL. Os valores de CIM estapresentados na tabela 10 e ilustrados na figura 24. Dessa forma, presume-se que os extratos não possuem efeito antimicrobiano para esses microorganismos avaliados ou contenham constituintes antibacterianos em concentrações baixas, insuficientes para serem considerados efetivos.

Há muitas espécies de microorganismos patológicos que ao decorrer do tempo acabam tornando-se resistentes. A forma como acontece o cultivo, a linhagem utilizada e a forma de preparo da técnica são fatores que influenciam consideravelmente o resultado final e que podem apresentar algumas divergências entre os resultados descritos na literatura.



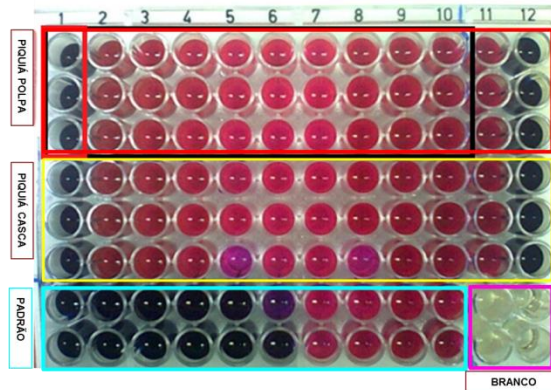


Figura 24: Ilustração da análise da CIM dos extratos.

Tabela 10: Valores das concentrações inibitórias mínimas dos extratos.

Extrato	Micro-organismo sensível	CIM	Imipenem (padrão)
Bacuri (casca)	<i>Shigella flexneri</i>	> 1mg/mL	0,0625mg/mL
Piquiá (polpa)	<i>Enterobacter cloacae</i>	1mg/mL	0,03125mg/mL
Piquiá (polpa)	<i>Shigella flexneri</i>	> 1mg/mL	0,0625mg/mL
Piquiá (casca)	<i>Enterobacter cloacae</i>	1mg/mL	0,03125mg/mL
Piquiá (casca)	<i>Shigella flexneri</i>	> 1mg/mL	0,0625mg/mL

Os resultados encontrados para os extratos da casca de graviola foram similares aos descritos por Silva (2011), em que os extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas, cascas e frutos mostraram-se ineficientes frente aos microorganismos *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, no trabalho de Vieira *et al.* (2010), avaliando o potencial bactericida de extratos da casca de graviola frente aos mesmos microorganismos aqui testados *S. aureus*, *E. coli* e *S. enteritidis* e um diferente, *Vibrio cholerae*, mostraram que os extratos aquosos apresentaram efeito bactericida frente a *S. aureus* e *Vibrio cholerae*. Esses autores encontraram resultados diferentes aos encontrados neste estudo, porém este fato pode estar associado a metodologia de extração.

A caracterização da atividade antimicrobiana de plantas em busca de novas substâncias, a partir de fontes naturais, que ajudem a combater a resistência microbiana é bem reportada na literatura. No trabalho realizado com folhas de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia, os extratos de *Psidium guajava*

(goiabeira), *Bryophyllum calycinum* (pirarucu), *Uncaria guianensis* (unha de gato), *Arrabidaea chica* (pariri) e *Mansoa alliacea* (cipó d'alho) apresentaram atividades moderadas e forte frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* (Ribeiro, 2008). Os óleos de sementes de açaí (*Euterpe oleraceae*) e casca de duas espécies de pupunha (*Bactris gasipaes* e *Bactris dahlgreniana*) apresentaram efeito inibitório frente à *Staphylococcus aureus* (Mendonça Filho e Pereira, 2012).

A presença da atividade antimicrobiana majoritariamente em substâncias de baixa polaridade é uma das explicações para os resultados encontrados. Muitos trabalhos reportam essa atividade para óleos fixos, essenciais e resinas (Packer e Luz, 2007). Um dos produtos naturais utilizados popularmente é o óleo de copaíba, que segundo a literatura, possui capacidade de inibir o crescimento das bactérias, fungos e protozoários (Leandro *et al.*, 2012; Izumi *et al.*, 2012; Deus *et al.*, 2011).

A procura por produtos naturais antimicrobianos é uma das tendências mundiais das indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética, tendo em vista um aumento de infecções e o aparecimento de resistência microbiana. Dessa maneira, torna-se importante a busca contínua de novos agentes antimicrobianos que sejam eficazes e econômicos para combater infecções por microrganismos patogênicos.

Embora neste trabalho não tenha sido detectado a presença de inibição em baixa concentração para os microorganismos testados, isso não significa que esses extratos não sejam ativos, pois segundo alguns artigos disponíveis na literatura, há um amplo espectro de microorganismos que são seletivos e dependendo da parte do material vegetal, solvente utilizado e técnica de extração, poderá haver um aumento da atividade (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Assim, o fracionamento e diferentes técnicas de extração dos extratos que apresentaram alguma capacidade inibitória seria recomendado para trabalhos futuros envolvendo esses subprodutos.

## 5.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS: FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

Há um crescente interesse nos compostos fenólicos, principalmente pelas correlações que esse grupo apresenta com atividades biológicas. Entre os métodos de quantificação, o espectrofotométrico é uma das técnicas mais comumente empregadas para estimar o conteúdo de polifenóis e flavonoides totais devido à capacidade de absorção na região ultravioleta.

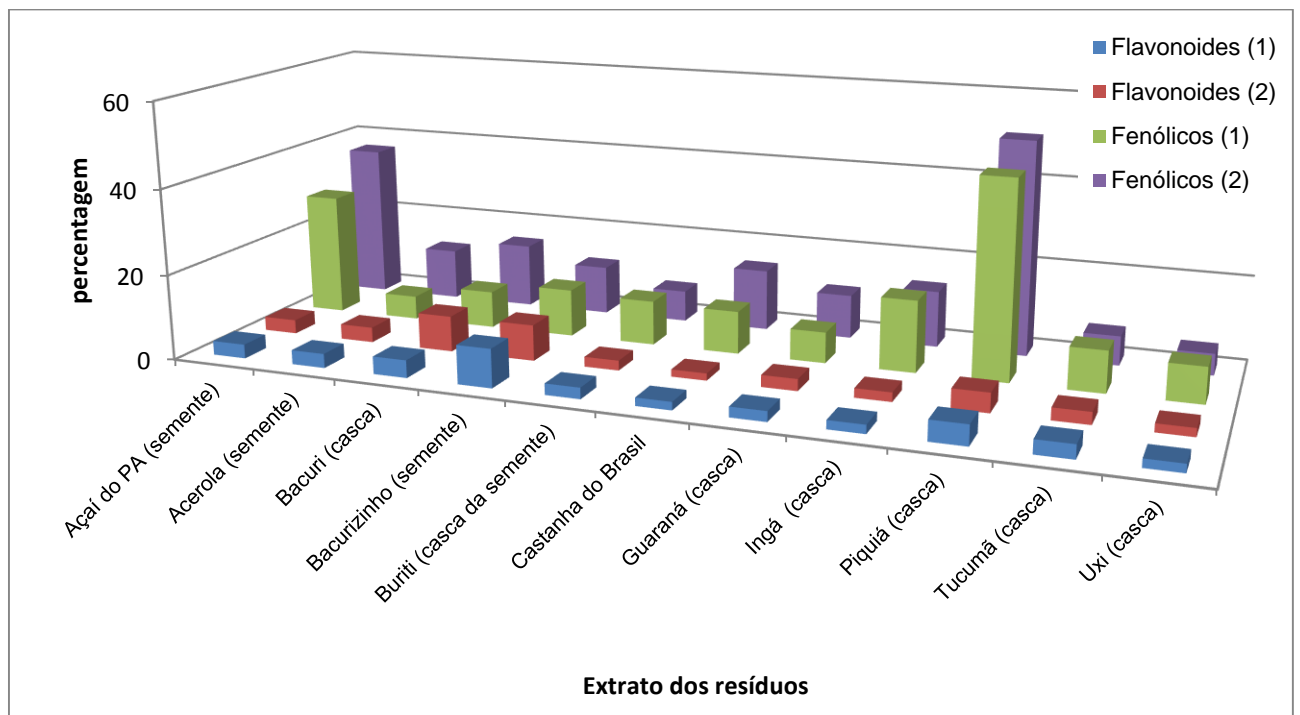
Nesse trabalho, o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais nos resíduos de frutas foi quantificado espectrometricamente e resultou em uma variação ampla, conforme a matéria prima analisada. As espécies que apresentaram maiores percentuais de fenólicos totais foram: casca de piquiá, sementes de açaí, casca de bacuri, casca da semente de castanha do Brasil e casca de ingá, tanto nos extratos etanólicos, quanto hidroalcoólicos. Os valores mais significativos podem ser observados no gráfico 6.

O piquiá demonstrou a maior percentagem de substâncias fenólicas. Os extratos das cascas do fruto apresentaram maiores quantidades de fenólicos (50,57 e 46,34%) e um número considerável de compostos flavonoídicos (4,56 e 4,09%) em extrato etanólico e hidroalcoólico respectivamente. A quantidade de substâncias fenólicas encontrada na casca foi maior do que a encontrada em polpas de outras frutas que são utilizadas como alimento pela população, como a banana, o cajá e a goiaba, e com polpas e resíduos de outras frutas tropicais (Barreto *et al.*, 2009; Rufino *et al.*, 2011; Clerici *et al.*, 2011).

Devido às espécies serem originadas de famílias distintas, o comportamento da extração em diferentes solventes foi heterogênea. Observou-se que em alguns extratos o percentual de fenólicos totais foi maior no solvente etanólico, como no

caso de piquiá, bacuri e açaí. Em outros, o solvente hidroalcolico apresentou maior percentual, como em ingá, castanha e tucumã. Essa diferença pode ser explicada devido à polaridade das substancias fenólicas presentes. A diferença na polaridade destas pode estar relacionada à presença de hidroxilas, cadeias carbônicas mais curtas, entre outras. Tais características também refletem-se na percentagem de substâncias flavonoidicas. O resumo dos resultados das análises antioxidante e da determinação de fenóis e flavonoides totais é apresentado nas tabelas 11 e 12.

Gráfico 6: Percentual de fenólicos e flavonoides totais dos extratos.



(1) solvente etanólico e (2) hidroalcolico

A semente de açaí do Pará (*Euterpe oleracea*) também apresentou elevada quantidade de substancias fenólicas, superiores ao descrito para a polpa, com valores de  $229,26 \pm 9,32$  e  $371,89 \pm 23,95$  mg EAG/ g de amostra e com percentual de  $28,78 \pm 0,88$  e  $36,59 \pm 1,13\%$  nos solventes hidroalcolico e etanólico respectivamente.

A demanda da polpa de açaí vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Sua utilização vai desde o consumo como bebida energética até a produção

de cosméticos e está ganhando o mercado internacional. A presença de substâncias fenólicas, principalmente antocianinas, é bem reportada na literatura e apresenta diversas atividades biológicas (Yamaguchi et al., 2015)..

A semente é descartada nos rios e florestas e alguns agricultores as utilizam como adubo orgânico, porém de forma empírica, sem estudos científicos. A presença de uma elevada quantidade de substâncias fenólicas pode ser uma alternativa para a cadeia produtiva de açaí devido ao leque de utilização que esta classe apresenta.

Outras espécies ricas em substâncias fenólicas e flavonoídicas foram os dois bacuris (bacuri e bacurizinho). Embora apresentem nomes semelhantes, são originados de diferentes famílias botânicas. Em ambos os casos, a percentagem de substâncias fenólicas foi superior na semente que a detectada na casca.

O oposto aconteceu com piquiá, ingá e cupuí, onde o percentual fenólico foi superior na casca que na semente, semelhante ao descrito por Roesler e colaboradores (2007) com uma espécie do mesmo gênero do piquiá, o pequi (*Caryocar brasiliense*) onde as frações que apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos também foram as cascas, em comparação tanto com a semente quanto com a polpa utilizada para consumo, o que assemelha-se ao encontrado para os resíduos deste trabalho.

Os fenólicos estão envolvidos na formação de lignina, polímero presente na parede celular de plantas, fato que explica sua abundância em sementes e cascas de frutas, bem como em caules e folhas de vegetais (Morton *et al.*, 2000). Estudos têm relatado que frutos são fontes de substâncias fenólicas e que as cascas e as sementes podem ser uma alternativa para a utilização.

Tabela 11: Resumo dos testes espectrofotométricos dos extratos hidroalcoolicos (6:4 etanol:água), na proporção 10% (m/v).

Amostra	fenois (%)	fenois mgEAG/g	flavonoides (%)	DPPH ( $\mu\text{m/mL}$ )	DPPH (%) 100 $\mu\text{g/mL}$	LPO (%)	ABTS ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABTS (%) 100 $\mu\text{g/mL}$
Abiu (casca)	4,80 $\pm$ 0,67	<1	1,86 $\pm$ 0,76	>200	6,09 $\pm$ 0,62	<1	>200	6,13 $\pm$ 0,19
Açaí do PA (semente)	28,78 $\pm$ 0,88	229,26 $\pm$ 9,32	3,29 $\pm$ 0,14	15,33 $\pm$ 0,08	78,76 $\pm$ 1,99	16,04 $\pm$ 1,06	12,33 $\pm$ 0,08	71,47 $\pm$ 1,76
Açaí do AM (semente)	6,77 $\pm$ 0,29	<1	3,10 $\pm$ 0,13	108,50 $\pm$ 0,39	46,55 $\pm$ 3,99	3,87 $\pm$ 0,09	36,81 $\pm$ 0,25	70,40 $\pm$ 2,69
Acerola (semente)	12,09 $\pm$ 3,98	45,01 $\pm$ 1,34	3,55 $\pm$ 0,06	132,14 $\pm$ 8,62	32,03 $\pm$ 0,67	<1	58,95 $\pm$ 1,29	64,34 $\pm$ 0,97
Bacuri (semente)	10,83 $\pm$ 0,18	40,06 $\pm$ 1,97	8,69 $\pm$ 0,72	55,61 $\pm$ 0,94	68,12 $\pm$ 0,68	9,661993	40,48 $\pm$ 1,54	68,26 $\pm$ 1,73
Bacuri (casca)	8,72 $\pm$ 0,	<1	474,14 $\pm$ 0,31	108,21 $\pm$ 9,42	47,38 $\pm$ 1,74	10,62 $\pm$ 0,92	80,73 $\pm$ 2,04	59,63 $\pm$ 3,94
Bacurizinho (casca)	8,27 $\pm$ 1,35	<1	5,90 $\pm$ 0,48	67,24 $\pm$ 4,26	54,12 $\pm$ 0,70	4,82 $\pm$ 0,40	79,41 $\pm$ 4,68	62,50 $\pm$ 2,449
Bacurizinho (semente)	11,18 $\pm$ 0,09	14,68 $\pm$ 1,34	9,09 $\pm$ 1,85	86,44 $\pm$ 3,28	58,36 $\pm$ 1,06	9,13 $\pm$ 1,62	66,36 $\pm$ 1,88	71,51 $\pm$ 1,47
Biribá (casca)	4,40 $\pm$ 0,17	<1	1,82 $\pm$ 0,05	>200	20,77 $\pm$ 2,05	<1	>200	27,37 $\pm$ 0,83
Buriti (casca da semente)	10,47 $\pm$ 0,40	<1	2,63 $\pm$ 0,14	95,40 $\pm$ 1,97	49,21 $\pm$ 1,38	<1	52,68 $\pm$ 1,13	62,69 $\pm$ 0,70
Buriti (semente)	8,43 $\pm$ 0,33	<1	1,80 $\pm$ 0,10	>200	13,11 $\pm$ 1,13	<1	192,49 $\pm$ 11,80	28,24 $\pm$ 1,61
Carambola (semente)	5,05 $\pm$ 0,76	<1	2,15 $\pm$ 0,19	156,88 $\pm$ 13,78	39,62 $\pm$ 2,04	<1	125,12 $\pm$ 7,51	39,081,85
Castanha do Brasil (casca)	11,16 $\pm$ 0,42	40,32 $\pm$ 3,71	4,49 $\pm$ 0,12	>200	49,31 $\pm$ 4,11	8,40 $\pm$ 0,31	46,76 $\pm$ 1,01	44,41 $\pm$ 0,77
Graviola (casca)	5,80 $\pm$ 0,09	<1	2,21 $\pm$ 0,19	>200	17,07 $\pm$ 0,39	<1	>200	14,08 $\pm$ 1,22
Guaraná (casca)	7,29 $\pm$ 0,98	2,27 $\pm$ 0,12	2,41 $\pm$ 0,06	97,77 $\pm$ 5,55	48,21 $\pm$ 2,78	<1	61,96 $\pm$ 1,77	63,94 $\pm$ 3,63
Ingá (casca)	16,89 $\pm$ 0,91	93,63 $\pm$ 3,70	2,91 $\pm$ 0,08	29,98 $\pm$ 0,62	75,68 $\pm$ 0,85	1,12 $\pm$ 1,02	21,32 $\pm$ 0,15	68,45 $\pm$ 1,03
Ingá (semente)	5,51 $\pm$ 0,90	<1	1,51 $\pm$ 0,05	>200	5,16 $\pm$ 0,18	<1	>200	14,42 $\pm$ 1,07
Piquiá (casca)	46,34 $\pm$ 2,58	415,33 $\pm$ 4,17	4,09 $\pm$ 0,16	8,52 $\pm$ 0,37	81,52 $\pm$ 0,45	30,98 $\pm$ 0,35	5,45 $\pm$ 0,04	85,85 $\pm$ 0,34
Piquiá (polpa)	50,38 $\pm$ 2,21	466,59 $\pm$ 2,73	5,73 $\pm$ 0,02	8,48 $\pm$ 0,49	81,71 $\pm$ 0,36	27,53 $\pm$ 0,50	4,43 $\pm$ 0,06	85,64 $\pm$ 0,03
Piquiá (semente)	10,07 $\pm$ 0,83	35,09 $\pm$ 1,03	2,54 $\pm$ 0,16	62,64 $\pm$ 2,42	55,64 $\pm$ 1,73	<1	29,80 $\pm$ 0,24	71,29 $\pm$ 0,20
Tucumã (casca)	9,84 $\pm$ 0,41	29,26 $\pm$ 1,39	3,23 $\pm$ 0,17	47,56 $\pm$ 0,17	69,17 $\pm$ 0,32	11,72 $\pm$ 1,47	19,76 $\pm$ 0,52	75,36 $\pm$ 0,37
Uxi (casca)	8,52 $\pm$ 1,70	<1	1,97 $\pm$ 0,05	167,61 $\pm$ 5,34	38,12 $\pm$ 0,68	<1	72,84 $\pm$ 1,93	63,12 $\pm$ 2,14
padrão	100	985,65 $\pm$ 40,93	100	5,57 $\pm$ 0,02	90,63 $\pm$ 3,73	54,70 $\pm$ 0,76	-	6,13 $\pm$ 0,19

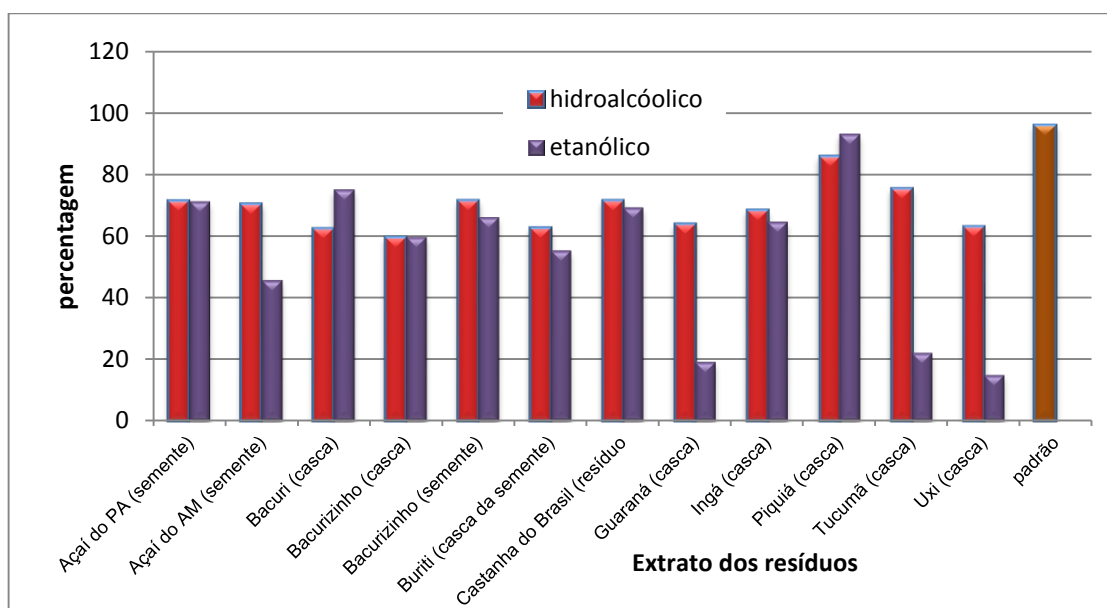
Tabela 12: Resumo dos testes espectrofotométricos dos extratos em etanol, na proporção 10% (m/v).

Amostra	Rendimento	fenois (%)	fenois mgEAG/g	flavonoides (%)	DPPH ( $\mu\text{m}/\text{mL}$ )	DPPH (%)	LPO (%)	ABTS ( $\mu\text{m}/\text{mL}$ )	ABTS (%)
Abiu (casca)	3,19	5,24 $\pm$ 0,19	<1	2,02 $\pm$ 0,03	>200	5,58 $\pm$ 0,28	7,91 $\pm$ 0,14	>200	1,45 $\pm$ 0,12
açai do PA (semente)	4,24	36,59 $\pm$ 1,13	371,89 $\pm$ 23,95	3,26 $\pm$ 0,21	9,25 $\pm$ 1,74	80,62 $\pm$ 0,83	8,21 $\pm$ 1,61	11,15 $\pm$ 2,48	71,10 $\pm$ 0,52
açai do AM (semente)	0,65	7,33 $\pm$ 0,08	2,71 $\pm$ 0,09	3,54 $\pm$ 0,30	57,84 $\pm$ 3,96	71,48 $\pm$ 4,05	<1	46,40 $\pm$ 1,01	45,72 $\pm$ 0,42
Acerola (semente)	4,3	5,58 $\pm$ 0,72	<1	3,33 $\pm$ 0,24	>200	36,57 $\pm$ 1,40	<1	52,32 $\pm$ 4,09	63,72 $\pm$ 6,62
Bacuri (casca)	11,31	15,19 $\pm$ 0,66	85,74 $\pm$ 7,04	8,39 $\pm$ 1,31	22,49 $\pm$ 0,66	72,43 $\pm$ 0,51	11,58 $\pm$ 1,08	22,56 $\pm$ 0,86	74,99 $\pm$ 0,23
Bacurizinho (casca)	16,29	10,03 $\pm$ 0,71	31,23 $\pm$ 0,75	7,22 $\pm$ 0,77	124,16 $\pm$ 3,81	47,72 $\pm$ 0,56	24,90 $\pm$ 2,07	125,21 $\pm$ 7,37	59,69 $\pm$ 0,29
Bacurizinho (semente)	21,63	11,54 $\pm$ 0,63	47,63 $\pm$ 0,67	8,45 $\pm$ 0,29	25,53 $\pm$ 0,52	77,39 $\pm$ 46	8,25 $\pm$ 0,49	58,00 $\pm$ 0,58	66,04 $\pm$ 2,52
Biribá (casca)	4,32	4,14 $\pm$ 0,04	<1	2,31 $\pm$ 0,27	>200	29,73 $\pm$ 0,80	8,74 $\pm$ 0,15	>200	19,17 $\pm$ 0,70
Buriti (casca da semente)	3,47	7,40 $\pm$ 0,20	3,44 $\pm$ 0,21	2,33 $\pm$ 0,37	91,47 $\pm$ 2,82	57,89 $\pm$ 3,64	<1	68,51 $\pm$ 6,60	55,28 $\pm$ 4,09
Carambola (semente)	5,9	4,39 $\pm$ 0,16	<1	2,17 $\pm$ 0,05	>200	22,87 $\pm$ 1,87	<1	>200	15,36 $\pm$ 0,43
Castanha do Brasil (casca)	2,26	5,52 $\pm$ 0,02	<1	2,52 $\pm$ 0,16	93,78 $\pm$ 13,22	40,79 $\pm$ 2,38	<1	170,76 $\pm$ 8,6	36,82 $\pm$ 2,54
Cupuaçu (casca)	8,39	3,62 $\pm$ 0,29	<1	1,95 $\pm$ 0,12	85,17 $\pm$ 2,77	48,10 $\pm$ 4,10	<1	84,90 $\pm$ 0,92	44,47 $\pm$ 0,27
Cupuí (semente)	4,43	6,47 $\pm$ 0,32	<1	3,03 $\pm$ 0,24	91,31 $\pm$ 5,53	51,36 $\pm$ 0,38	<1	65,33 $\pm$ 1,44	69,71 $\pm$ 5,58
Cupuí (casca)	1,74	6,85 $\pm$ 0,11	<1	2,31 $\pm$ 0,04	113,02 $\pm$ 0,77	47,97 $\pm$ 0,92	12,10 $\pm$ 0,31	63,85 $\pm$ 0,45	71,46 $\pm$ 5,56
Graviola (casca)	1,22	4,36 $\pm$ 0,35	<1	2,63 $\pm$ 0,19	>200	20,57 $\pm$ 1,14	<1	>200	20,82 $\pm$ 1,75
Guaraná (casca)	9,95	10,36 $\pm$ 0,27	35,18 $\pm$ 2,91	2,78 $\pm$ 0,62	>200	29,49 $\pm$ 1,28	<1	>200	19,30 $\pm$ 0,47
Ingá (semente)	3,04	11,53 $\pm$ 0,27	47,02 $\pm$ 2,94	5,07 $\pm$ 0,14	>200	12,98 $\pm$ 0,25	1,85 $\pm$ 0,35	167,78 $\pm$ 3,41	16,06 $\pm$ 1,71
Ingá (casca)	0,91	13,34 $\pm$ 0,62	66,11 $\pm$ 6,50	2,17 $\pm$ 0,13	43,46 $\pm$ 1,24	64,18 $\pm$ 1,47	<1	48,56 $\pm$ 1,79	64,54 $\pm$ 4,30
Piquiá (casca)	11,76	50,57 $\pm$ 2,96	452,39 $\pm$ 15,19	4,59 $\pm$ 0,12	7,81 $\pm$ 0,34	82,63 $\pm$ 1,34	19,98 $\pm$ 0,43	3,93 $\pm$ 0,12	92,92 $\pm$ 0,20
Piquiá (polpa)	23,62	53,51 $\pm$ 2,37	491,71 $\pm$ 8,67	4,91 $\pm$ 0,27	7,95 $\pm$ 0,27	81,93 $\pm$ 1,57	10,39 $\pm$ 0,38	4,34 $\pm$ 0,29	92,76 $\pm$ 0,31
Pupunha (semente)	4,48	4,61 $\pm$ 0,29	<1	2,78 $\pm$ 0,24	117,31 $\pm$ 2,73	41,82 $\pm$ 0,51	<1	>200	28,59 $\pm$ 1,41
Tucumã Coari (casca)	13,58	6,95 $\pm$ 0,15	<1	2,87 $\pm$ 0,50	99,97 $\pm$ 3,72	49,06 $\pm$ 0,51	<1	>200	22,16 $\pm$ 1,29
Uxi (casca)	9,31	5,10 $\pm$ 0,71	<1	1,98 $\pm$ 0,04	>200	29,78 $\pm$ 0,62	<1	>200	14,95 $\pm$ 0,81
padrão	-	100	985,65 $\pm$ 40,93	100	5,57 $\pm$ 0,02	90,63 $\pm$ 3,73	54,70 $\pm$ 0,76	3,19 $\pm$ 0,12	96,71 $\pm$ 5,58

## 5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

As diferentes metodologias para determinação da capacidade antioxidante podem estar sujeitas a interferências, por isso atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, visto que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (Huang *et al.*, 2005). A avaliação da atividade antioxidante dos subprodutos foi realizada por meio da varredura dos radicais livres DPPH e ABTS e pelo método  $\beta$ -caroteno. Os resultados dos maiores percentuais dos radicais estão ilustrados nos gráficos 7 e 8.

Gráfico 7: Capacidade de varredura dos radicais ABTS dos extratos



(1) solvente etanólico e (2) hidroalcoólico

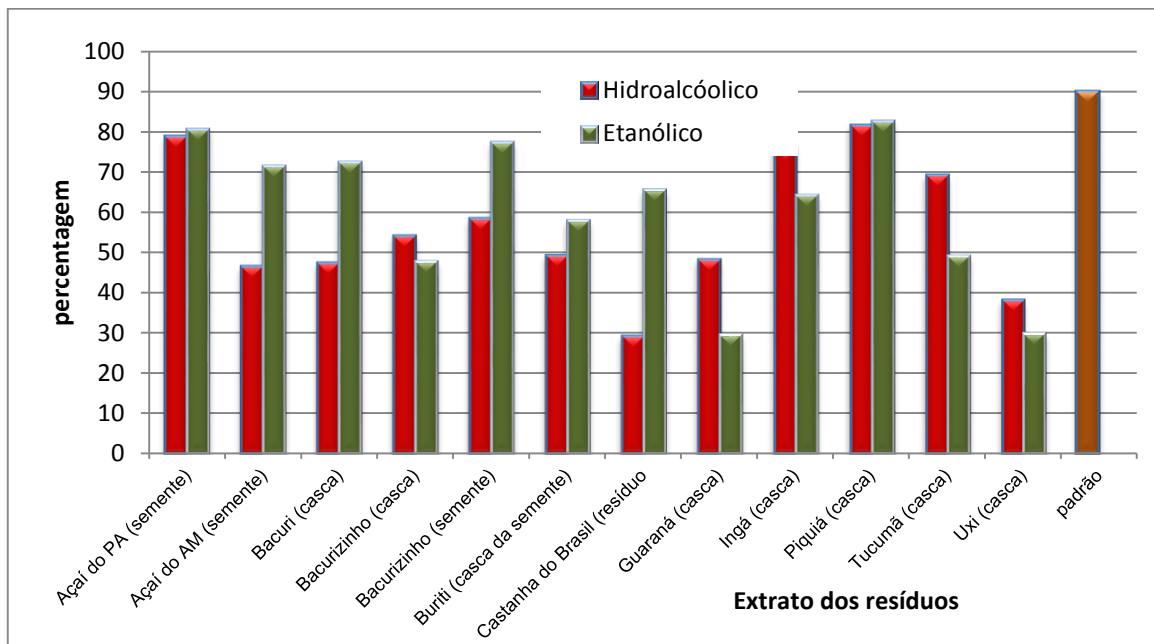
As amostras apresentaram uma alta capacidade de sequestrar os radicais livres, com uma baixa concentração capaz de estabilizar (Capacidade sequestro  $CS_{50}$ ) 50% dos radicais, destacando-se as amostras de piquiá, açai, bacuri, bacurizinho e castanha do Brasil.

Os extratos dos resíduos apresentaram maior capacidade de sequestro do radical DPPH quando extraídos com etanol do que em meio hidroalcoólico. Em



polpas de frutas congeladas (acerola, bacuri e cajá) verificou-se que os extratos hidroalcolóicos apresentaram maior capacidade de sequestro do radical DPPH que os encontrados em extrato aquoso (Vieira *et al.*, 2011). Dessa forma, presume-se que as substâncias responsáveis pela estabilização desses radicais apresentem menor polaridade comparada com o solvente aquoso.

Gráfico 8: Capacidade de varredura dos radicais DPPH dos extratos



(1) solvente hidroalcolóico e (2) etanólico

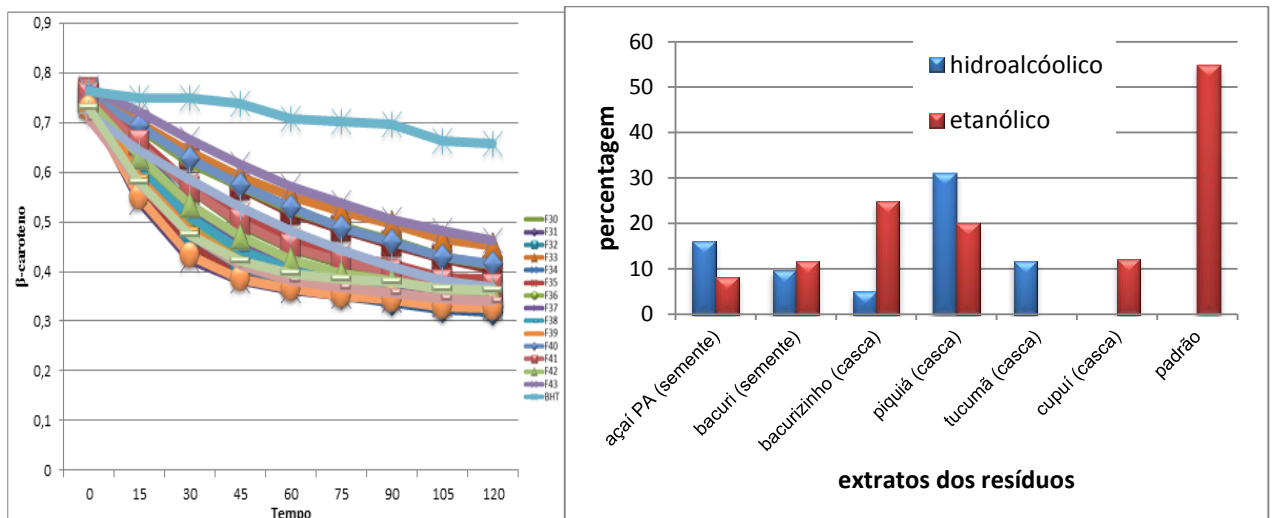
A atividade antioxidante dos extratos de piquiá foram maiores nos extratos etanólicos e apresentaram resultados próximos ao do padrão quercetina. Não há trabalhos envolvendo a quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante das cascas e sementes de piquiá, sendo este um trabalho inédito. Este resultado corrobora com os trabalhos anteriores, porém com a polpa, em que esta apresentou elevada capacidade de sequestrar outras espécies reativas: de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (Chisté *et al.*, 2012).

Os métodos de DPPH e ABTS baseiam-se na habilidade redutora dos antioxidantes, presentes nas amostras, sobre os radicais por meio de transferência

de elétrons, a qual é mensurada por meio do decréscimo da absorvância. Diferente dos outros dois métodos, o do  $\beta$ -caroteno determina a capacidade de um antioxidante de proteger um substrato lipídico da oxidação.

A maioria das amostras apresentaram baixa capacidade antioxidante por meio do descoramento do  $\beta$ -caroteno comparadas com os outros dois testes. O resultado do método do  $\beta$ -caroteno pode ser ilustrada no gráfico 9. O extrato de casca piquiá destacou-se por apresentar uma capacidade de inibição do descoramento do  $\beta$ -caroteno maior que a de todas as outras amostras. Casca e sementes de cupuí, que não se mostraram muito eficientes nos outros métodos, apresentaram valores consideráveis.

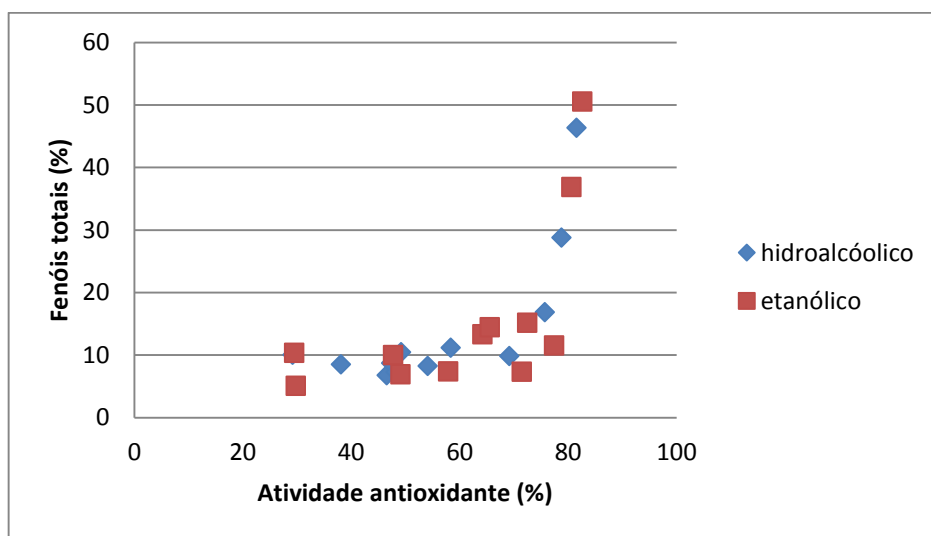
Gráfico 9: Atividade antioxidante pelo método de  $\beta$ -caroteno



De forma geral, houve uma correlação significativa entre os valores de capacidade antioxidante determinados pelos métodos antioxidantes e a quantificação de substâncias fenólicas (método Folin Ciocalteu) (gráfico 10). Esta correlação deve-se devido ao fato de ambos apresentarem mecanismo de ação semelhantes (transferência de elétrons).

Os resultados obtidos por meio do método de descoloramento de  $\beta$ -caroteno não mostraram correlação significativa com os obtidos pelos outros dois métodos. Apesar deste método também estar baseado na transferência de átomos de hidrogênio do antioxidante para os radicais livres formados, esta reação ocorre em meio lipofílico, e isto pode afetar significativamente a atuação dos antioxidantes presentes nas amostras (Gonçalves, 2010).

Gráfico 10: Correlação da atividade antioxidante (DPPH) e fenois totais



Oliveira e colaboradores (2009) publicaram uma revisão abordando a utilização de compostos antioxidantes, (principalmente polifenóis) de resíduos industriais e da agroindústria, nos quais identificaram importantes antioxidantes em materiais que inicialmente eram descartados e que atualmente estão sendo utilizados pela indústria como casca de cenouras tomates, mangas e de batatas.

Verifica-se que estas partes geralmente são descartadas pela população, tornando-se lixo orgânico, mas que apresentaram uma elevada capacidade antioxidante. A possível utilização destes materiais pode aumentar sua utilização e animar estudos biotecnológicos que visem à utilização integral destes frutos e estudos mais aprofundados sobre a atividade antioxidante, já que processos oxidativos estão sendo relacionados a diversas patologias.

A partir dos resultados *in vitro*, reuniu-se os dados da quantificação espectrométrica e da capacidade antioxidante, resultando no artigo “AMAZON BIOREFINARIES FROM FRUIT WASTE TO ANTIOXIDANT SUPPLEMENTS”. No **ANEXO 4** pode-se encontrar o resumo desse trabalho.

## 5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CÉLULA

Foram selecionados dez extratos para a análise da atividade antioxidante em células. Os resultados da atividade em células confirmaram os resultados encontrados na atividade antioxidante *in vitro* e na quantificação das biomoléculas, em que as amostras de piquiá (casca, semente e polpa), bacuri (casca) e bacurizinho (casca) foram os resultados mais próximos do padrão (quercetina).

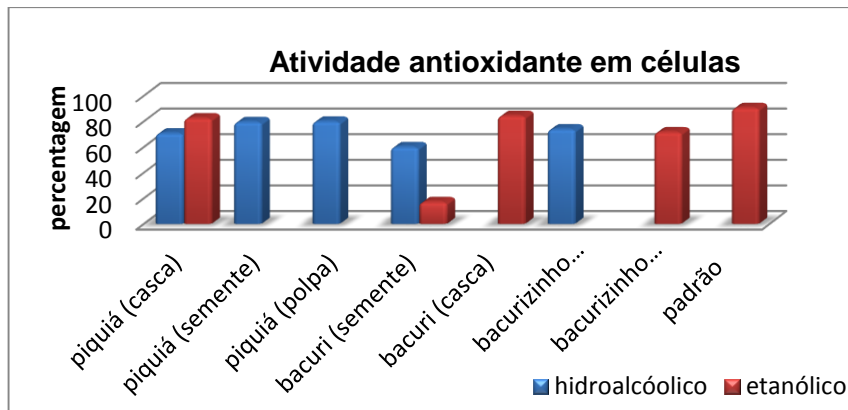
Tabela 13: Percentagem da atividade antioxidante em linhagem celular dos extratos em concentração de 20 µg/mL

Amostra	% Inibição
bacuri (casca) <sup>2</sup>	84,30 ± 0,25
bacuri (semente) <sup>2</sup>	17,05 ± 4,08
bacuri (semente) <sup>1</sup>	59,93 ± 1,82
bacurizinho (casca) <sup>2</sup>	71,56 ± 3,37
bacurizinho (semente) <sup>1</sup>	73,84 ± 0,74
piquia (casca) <sup>2</sup>	82,43 ± 0,64
piquia (casca) <sup>1</sup>	70,69 ± 2,77
piquia (polpa) <sup>1</sup>	79,89 ± 6,50
piquia (semente) <sup>1</sup>	79,48 ± 8,61
Quercetina (padrão)	90,47 ± 1,28

1= Hidroalcolico e 2= etanólico

Observa-se que em um extrato há uma mistura complexa de substâncias enquanto no padrão utilizado há apenas uma substância isolada. Dessa forma, as amostras testadas nesse trabalho podem apresentar uma atividade muito mais elevada ao serem fracionadas.

Gráfico 11: Percentagem da atividade antioxidante em linhagem celular dos extratos em concentração de 20 µg/mL



Não foram encontrados na literatura disponível estudos em relação à atividade antioxidante em linhagens celulares dos extratos de resíduos de piquiá e bacuri, sendo estes, os primeiros resultados descritos sobre o tema. Esse experimento foi realizado em uma única concentração e os resultados encontrados abrem possibilidades de continuação dessa linha experimental em trabalhos que possam ser desenvolvidos futuramente para a busca da concentração eficiente por meio de curvas de concentração. A amostra de piquiá foi submetida à análise em diferentes concentrações e os resultados foram reunidos e publicados na revista Química Nova. O resumo encontra-se no **ANEXO 5**.

O teste antioxidante utilizando a linhagem celular NIH 3T3 avalia a influência dos extratos e substâncias isoladas no estresse oxidativo causado pela exposição do peróxido de hidrogênio nas células. Como consequência, poderão ocorrer mecanismos de proteção a esses danos (Wolf e Liu, 2007; Liu *et al.*, 2010). Alguns trabalhos vêm utilizando essa técnica para investigação de constituintes e extratos antioxidantes, como o trabalho de Solomon *et al.* (2006), que mostrou capacidade antioxidante de extratos originados de figo (*Ficus carica*) e uma correlação positiva com compostos fenólicos, flavonoides e com antocianinas, principalmente cianidina-3-ramanoglicosídeo. Outros trabalhos envolvem frutos amazônicos mais populares,

como sementes de guaraná (Bittencourt *et al.*, 2011) e polpas de açaí, (Kang *et al.*, 2011), que apresentaram capacidade antioxidante em outras linhagens celulares.

Os frutos do cerrado também foram analisados quanto a atividade antioxidante e os extratos etanólicos obtidos de resíduos de semente e casca de *Annona crassiflora* (araticum), semente de *Eugenia dysenterica* (cagaita) e casca de *Caryocar brasiliense* (pequi) apresentaram potencial de inibir a peroxidação lipídica, porém por um mecanismo diferente do utilizado neste trabalho. A indução química foi feita com microsomas de fígado de rato e quantificação dos malonaldeídos (MDA). A concentração dos extratos na faixa de 0,7 a 4,5 µg/mL confirmou a alta atividade antioxidante previamente obtida pelo radical DPPH e pela quantificação de substâncias fenólicas.

Na descrição de Radewicz *et al.* (2010) utilizando diversos compostos fenólicos, como genesteína, resveratrol, narigenina, quercetina, epicatequina e epigallocatequina e no trabalho observado por Roesler *et al.* (2007 e 2008) com ácido cafeico e seus derivados como cafeoil e dicafeoiltartárico e cafeoil glucose; ácido quínico, ácido ferúlico, rutina, xantoxilina, ácido gálico; quercetina e quercetina 3-O-arabinose, houve uma boa atividade antioxidante nos isolados e em extratos enriquecidos com esses componentes fenolicos.

## 5.8 FOTOPROTEÇÃO

A utilização de protetores solares é a principal abordagem cosmética contra efeitos nocivos da radiação UV, reduzindo o número de patologias ocasionadas pela exposição prolongada e como medida preventiva para o envelhecimento da pele (Wang *et al.*, 2010; Balogh *et al.*, 2011).

Nesse trabalho foi estudado o perfil de fotoproteção dos extratos por meio da determinação da absorbância no espectro de ultravioleta, determinando o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e a absorbância máxima ( $A_{\text{máx}}$ ) numa varredura entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm (regiões correspondentes a UVA, UVB e UVC). Os resultados das absorções nesses comprimentos de onda e a absorção máxima dos extratos pode ser visualizado na tabela 14.

Dentre os extratos dos subprodutos de frutos avaliados, os maiores valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  foram detectados nos extratos etanólico e hidroalcoólico de piquiá (casca), com picos de absorção de 298nm (2,822) e 308 (3,702), respectivamente. O extrato de casca da semente de Castanha-do-Brasil apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  de 297 (5,347), enquanto o extrato de semente de bacurizinho mostrou  $\lambda_{\text{máx}}$  de 325 (1,250) e o de açaí do AM mostraram  $\lambda_{\text{máx}}$  de 286 (3,048). Os espectros de absorção dessas amostras podem ser visualizados na figura 25.

Verificou-se picos regulares e contínuos nas regiões correspondentes a UVA e UVB para as amostras de cascas de bacuri, bacurizinho, castanha-do-Brasil e piquiá. As características desses extratos recebem destaque, devido ao amplo espectro de absorção, levando-se em consideração que os filtros solares geralmente absorvem apenas em uma parte da região do ultravioleta (UVA ou UVB), sendo necessária uma combinação entre os filtros para uma proteção completa. Verifica-se

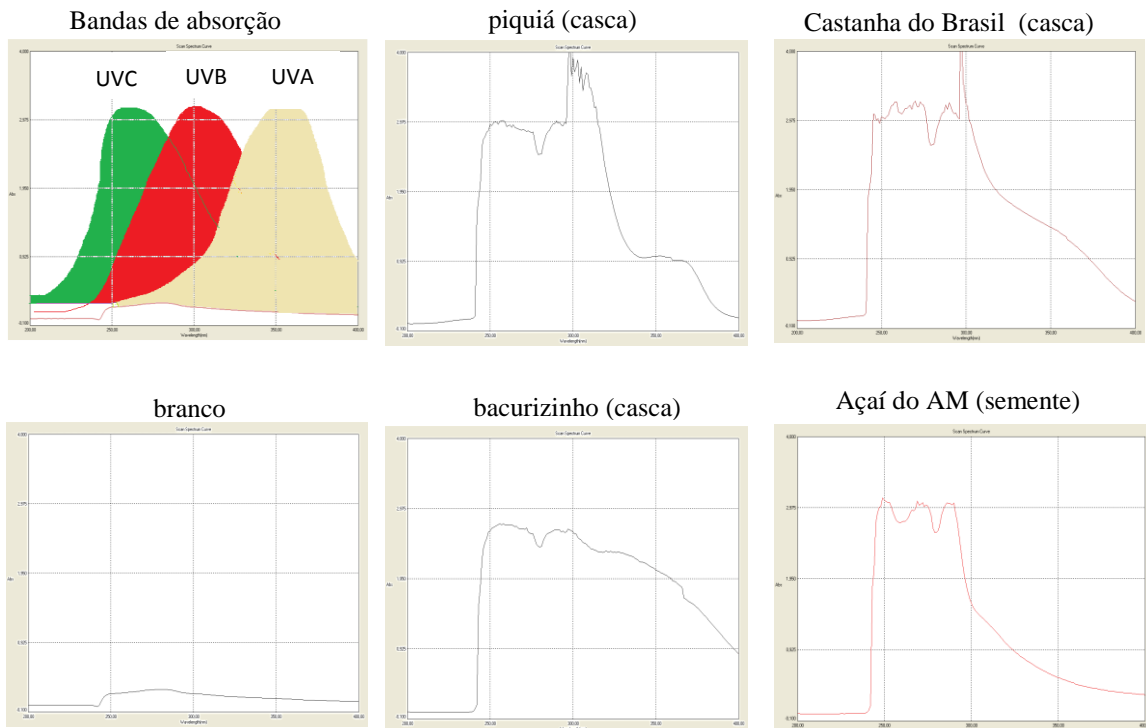
que a presença de uma matéria prima que possua absorção contínua nas regiões do UV pode minimizar o alto grau de irritabilidade consequente da combinação de fotoprotetores aplicados à pele (Palm & O`Donoghue, 2007).

**Tabela 14.** Perfil de absorção de extratos hidroalcoólicos e etanólicos na concentração 1,00 mg.mL<sup>-1</sup>.

Amostra	Extratos Hidroalcoólicos				Extratos Etanólicos			
	$\lambda_{\text{máx}}$	(C) 240 nm	(B) 300 nm	(A) 360 nm	$\lambda_{\text{máx}}$	(C) 240 nm	(B) 300 nm	(A) 360 nm
Abiu (casca)	367 (0,015)	0,063	0,131	0,018	nd	nd	nd	nd
Açaí do AM (semente)	286 (2,091)	0,01	<b>1,57</b>	0,485	286 (3,048)	0,024	<b>1,582</b>	0,434
Açaí do Pará (semente)	276 (1,479)	0,018	<b>0,985</b>	0,462	283 (2,121)	0,024	<b>1,21</b>	0,479
Acerola (semente)	274 (0,981)	0,086	0,777	0,395	282 (1,177)	0,052	0,693	0,176
Bacuri (casca)	297 (2,964)	0,097	2,774	0,895	375 (2,343)	0,091	<b>3,14</b>	2,571
Bacurizinho (casca)	285 (0,832)	0,24	0,687	0,356	297 (2,678)	0,024	<b>2,639</b>	<b>1,913</b>
Bacurizinho (semente)	325 (1,250)	0,102	<b>1,075</b>	0,637	nd	nd	nd	nd
Biribá (casca)	274 (1,290)	0,012	0,44	0,181	367 (0,110)	0,001	0,204	0,097
Buriti (casca da semente)	245 (1,846)	0,089	0,76	0,659	367 (0,030)	0,049	0,147	0,035
Buriti (semente)	281 (0,321)	0,049	<b>1,267</b>	<b>1,092</b>	nd	nd	nd	nd
Carambola (semente)	280 (0,840)	0,069	0,423	0,102	282 (1,632)	0,063	0,626	0,069
Castanha (casca)	367 (0,662)	0,204	0,777	0,659	297 (3,347)	0,114	<b>3,241</b>	<b>1,199</b>
Cupuaçu (casca)	274 (0,073)	0,012	0,001	0,042	281 (1,379)	0,029	0,451	0,136
Cupuí (casca)	275 (0,531)	0,241	0,034	0,047	281 (0,235)	0,001	0,176	0,097
Cupui (semente)	282 (0,341)	0,014	0,022	0,056	279 (0,863)	0,035	0,372	0,181
Graviola (casca)	275 (0,485)	0,091	0,299	0,035	271 (0,570)	0,027	0,339	0,17
Guaraná (casca)	274 (0,844)	0,086	0,17	0,125	269 (0,649)	0,047	0,164	0,108
Ingá (casca)	282 (0,954)	0,083	0,603	0,215	367 (0,114)	nd	0,282	0,108
Ingá (semente)	267 (0,581)	0,069	0,288	0,074	245 (1,468)	0,024	0,597	0,181
Piquiá (casca)	298 (2,822)	0,108	<b>2,763</b>	0,581	298 (2,822)	0,108	<b>2,763</b>	<b>0,952</b>
Piquiá (semente)	258 (2,109)	0,091	<b>1,222</b>	0,457	nd	nd	nd	nd
Tucumã (casca)	283 (2,294)	0,091	<b>1,374</b>	0,451	280 (1,282)	0,125	0,671	0,192

ND = não detectável



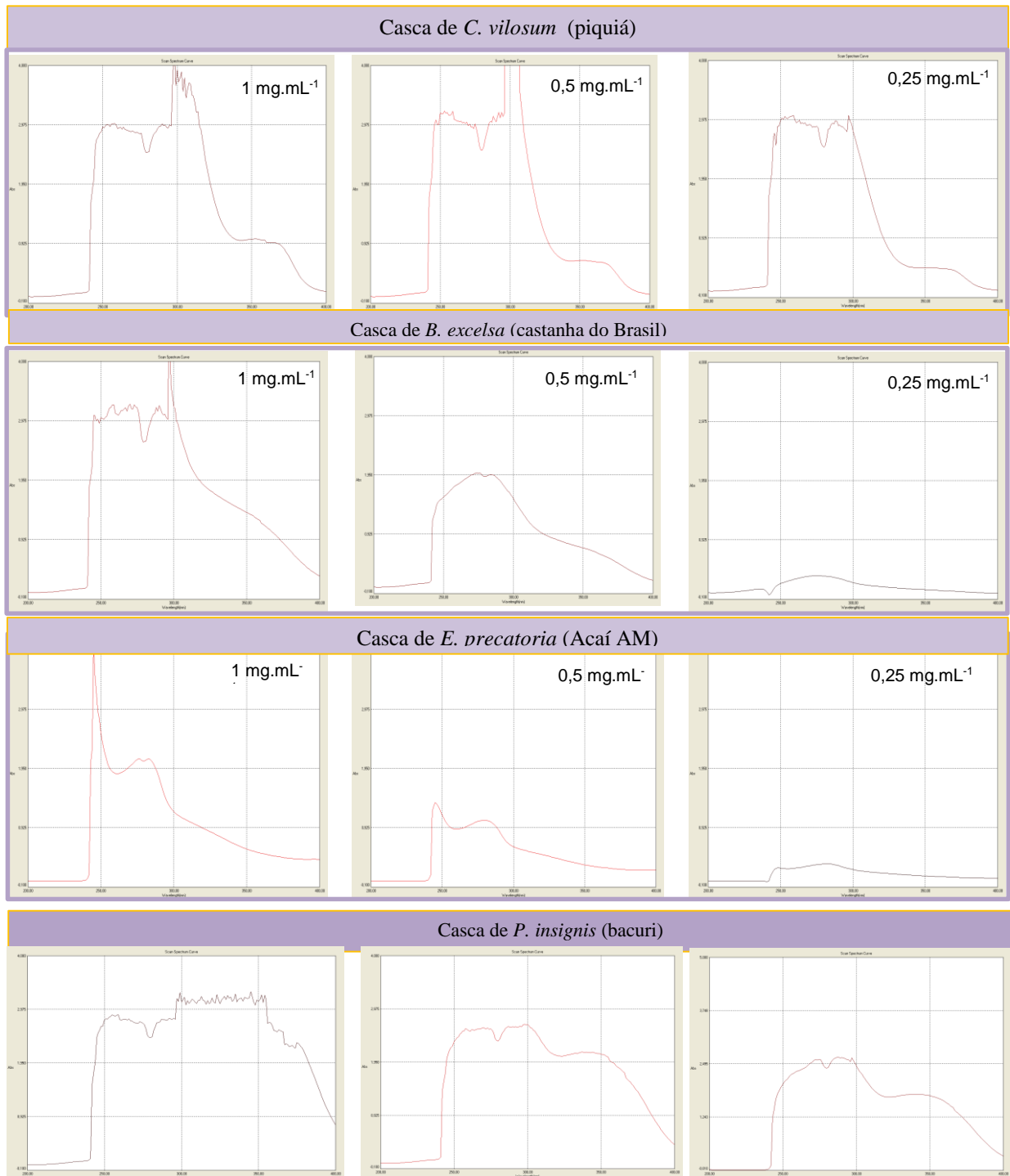


**Figura 25** – Espectro de absorção dos extratos de resíduos em concentração de 1,00 mg.mL<sup>-1</sup>.

Os extratos apresentaram picos máximos semelhantes ao encontrados em substâncias isoladas que atualmente são utilizadas nas formulações de fotoproteção, como o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 283 nm (região UVC e UVB), octildimetil-PABA, com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 311 nm (região UVB), e butil metóxi-dibenzoil-metano, com o  $\lambda_{\text{máx}}$  em 358 nm (região UVA) (Flor *et al.*, 2007). As maiores intensidades nos comprimentos de onda equivalentes a UVB e UVC foram encontrados nos extratos de piquiá (casca), com valores de UVB (3,899) e UVC (0,952), e nas cascas de bacurizinho UVB (2,639) e UVC (1,913) e bacuri UVB (3,14).

As amostras que apresentaram as maiores absorções (piquiá, bacuri, açaí do Amazonas e Castanha do Brasil) foram diluídas para concentrações de 0,50 e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>. Ao ser diluída, a amostra de piquiá continuou apresentando uma considerada capacidade de absorção no UV, maior que a encontrada em outros

trabalhos reportados na literatura (Souza *et al.*, 2005; Violante *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013). Os gráficos com as diluições podem ser verificados na figura 26. A absorvância encontrada na faixa de fotoproteção foi alta, sendo necessária apenas uma baixa concentração do extrato para absorver as radiações.



**Figura 26** – Espectro de absorção dos extratos diluídos em 1,00 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,50 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>.

Para algumas amostras, os extratos etanólicos apresentaram maior capacidade de absorção que os hidroalcoólicos. Segundo a literatura, classes de substâncias contendo compostos aromáticos simples como fenólicos e flavonoides são comumente extraídos com solventes alcoólicos, enquanto as classes glicosiladas são comumente extraídas com solventes com maior polaridade (Markhan *et al.*, 1998). Essas substâncias apresentam grande capacidade de absorção, dissipando a energia UV absorvida de uma maneira inofensiva. Tal afirmação é confirmada ao analisarmos que as espécies que possuíram maior capacidade de absorção  $\lambda_{\text{máx}}$  apresentam segundo a literatura, uma elevada percentagem de substâncias fenólicas.

Segundo a revisão de Flor *et al.* (2007), as diferenças nos máximos de absorção é explicada segundo a teoria de orbitais moleculares (TOM). Utilizando como parâmetro estrutural uma substância aromática simples, o benzeno. A presença de uma espécie doadora de elétrons aumenta a possibilidade de ressonância e a estabilidade do anel. Sendo mais estável, a energia dos orbitais ligantes diminui e, conseqüentemente, a dos antiligantes aumenta, elevando assim a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO. Por outro lado, a adição de uma espécie receptora de elétrons ao anel aromático diminui a estabilidade do sistema. Desta forma, a energia dos orbitais ligantes aumenta e a dos antiligantes diminui, reduzindo a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO e, como conseqüência, sua banda de absorção é a que ocorre em maiores comprimentos de onda (Huheey *et al.*, 1993; Gillam & Stern 1957).

Análises *in vitro*, como as espectrofotométricas, foram desenvolvidas baseando-se no espectro de absorção e apresentam uma boa correlação na previsão do FPS (fator de proteção solar) e em testes *in vivo* (Mansur *et al.*, 1986;

Ferrari *et al.*, 2002). Pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novas formulações fotoprotetoras, sejam sintéticas ou de produtos naturais, são necessárias para obtenção de produtos ideais, com menores possibilidades de sensibilidade na pele e com melhor fotoestabilização (Guarantini *et al.*, 2009; Balough *et al.*, 2011). Dentre os estudos de produtos naturais descritos na literatura, cita-se a capacidade fotoprotetora do própolis, *Aloe vera*, chá verde (*Camellia sinensis*), *andiroba* (*Carapa guianensis*) e espécies de *Bauhinia* (Bobin *et al.*, 1995; Morley *et al.*, 2005; Belo 2008; Heinrich *et al.*, 2011).

Alguns estudos avaliam a ação dos antioxidantes na fotoproteção, por meio da prevenção na formação de eritema cutâneo e efeitos protetores frente aos danos moleculares gerados por estresse oxidativo induzido pela radiação UV (Wang *et al.*, 2010). Dessa forma, os extratos de piquiá e bacurizinho recebem destaque por enquadrarem-se nesses dois quesitos. Segundo Barretos e colaboradores (2009), Chisté *et al.*, (2012) e Ascari *et al.*, (2013) o piquiá apresenta elevados teores de substâncias fenólicas, como os ácidos gálico e elágico e capacidade de sequestrar radicais livres. O bacurizinho e as espécies desse gênero também possuem diversos relatos na literatura sobre a capacidade antioxidante e antimicrobiana de seus frutos, caracterizados quimicamente pela presença de biflavonoides, xantonas e benzofenonas (Osório *et al.*, 2013; Deachathai *et al.*, 2005).

Os subprodutos avaliados não apresentam descrição na literatura sobre o perfil fotoprotetor. Apenas o estudo de algumas polpas é reportado, entre elas a de acerola. No trabalho de Souza *et al.* (2013) a polpa apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  de 290 nm, próxima ao encontrado nos extratos das sementes de acerola deste trabalho. Porém, apresentou fator de proteção solar baixo, com  $\text{FPS} \geq 2$ .

As pesquisas descritas na literatura sobre os subprodutos de polpas de frutas concentram-se majoritariamente na análise antioxidante (Berto *et al.*, 2015; Chiste *et al.*, 2012). Oliveira e colaboradores (2009) publicaram uma revisão abordando a utilização de compostos antioxidantes (principalmente polifenóis) de resíduos industriais e da agroindústria, nos quais identificaram importantes antioxidantes em materiais que inicialmente eram descartados e que atualmente estão sendo utilizados pela indústria como casca de cenouras, casca de tomates, cascas de mangas e de batatas. Souza *et al.* (2011) quantificou os polifenóis e a atividade antioxidante dos resíduos de acerola, goiaba (*Psidium guayaba*), abacaxi (*Ananas comosus*), cupuaçu, bacuri (*Platonia insignis*) e graviola (*Annona muricata*) e destacou esses materiais como fonte de substâncias bioativas.

Uma parte desses resultados foram submetidos a publicação intitulada como “AVALIACAO *IN VITRO* DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE RESÍDUOS DE FRUTAS AMAZONICAS”, revista Scientia Amazonia. O resumo deste artigo encontra-se no **ANEXO 6**.

Os dados encontrados neste trabalho podem ser utilizados como ferramenta para auxiliar no direcionamento de testes mais aprofundados, como avaliação do FPS e atividades que são correlacionadas com a fotoproteção como atividades antimicrobiana e antioxidante.

## 5.9 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

Existe uma crescente necessidade de se minimizar custos de produção por meio de maiores rendimentos sem perda apreciável na produtividade, além da necessidade em se extrair ao máximo compostos com atividade biológica (Garcia-Sales *et al.*, 2010).

Percebe-se assim a importância do uso de ferramentas que auxiliem na interpretação dos dados, buscando melhor conhecimento das variáveis do processo. O planejamento experimental é utilizado para análises em que diversas variáveis explanatórias (fatores) influenciam uma dependente (resposta), permitindo a identificação de relações matemáticas e estatísticas entre níveis pré-determinados, resultando em uma resposta para o processo envolvido mais adequado (Thompson, 1982). Os resultados obtidos são apresentados na forma de tabelas e gráficos e separados conforme a espécie analisada, possuindo nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Entre os parâmetros têm-se:

### **i) Rendimento:**

O rendimento de uma extração depende tanto do solvente utilizado quanto da metodologia selecionada, sendo necessários estudos preliminares para seleção do melhor método a fim de se obter o melhor processo de extração (Yu *et al.*, 2005). Os métodos apresentam mecanismos diferentes e dependendo do objeto de estudo, podem aumentar a chance de obter frações ricas em determinadas classes de substâncias. A extração de fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método empregado, o tempo e as condições de extração, e a presença de interferentes tais como gorduras, terpenos e clorofilas (Nacz e Shahidi, 2004).

### **ii) Temperatura**

Para substâncias fenólicas, como os flavonoides, é necessário que as metodologias empregadas possam minimizar a possibilidade de degradações encontradas na maioria das substâncias dessa classe. Devido a isso, sistemas de extrações que empregam temperaturas elevadas (acima de 50 °C) podem comprometer a estabilidade destas moléculas.

### **iii) Polaridade**

Além da metodologia de extração, há variação nos componentes do extrato em função da polaridade do solvente extrator utilizado. Dessa forma, devido à diversidade em suas classes químicas, torna-se muito difícil desenvolver um procedimento padrão apropriado para a extração de todos os fenólicos (Nacz e Shahidi, 2006). Tal qual o princípio químico prevê “semelhante dissolve semelhante” e assim, substâncias fenólicas são comumente extraídas por solventes de média polaridade como acetato de etila, diclorometano e acetona; ou metanol e etanol, para os fenólicos que apresentam maior polaridade.

A escolha dos solventes para extração deve basear-se, principalmente, na seletividade que o mesmo apresenta pelos compostos a serem extraídos. No entanto, outras características não podem ser ignoradas, como a facilidade de manuseio, proteção ao ambiente e toxicidade. Em geral o hexano remove interferentes como lipídeos, carotenóides e clorofila; o acetato de etila e o éter dietílico extraem fenólicos de baixo peso molecular; a acetona extrai fenóis poliméricos; e o metanol extrai açúcares, ácido orgânicos e fenóis mais polares (Nacz e Shahidi, 2006).

Verifica-se porém, que no contexto de sustentabilidade, que é uma das propostas desse trabalho, esses solventes são tóxicos, de difícil descarte e inviáveis ao se pensar na utilização em grande escala para as indústrias e moradores locais.

Com isso, optou-se em utilizar como variáveis solventes com menor toxicidade e maior disponibilidade no mercado (etanol e água).

A aproximação da pesquisa com o cotidiano dos moradores é de inteira importância para que os resultados possam ser aplicados no contexto social. Atualmente o doce e o licor da casca de bacuri são realizados de forma caseira, sendo utilizado o solvente etanol em diversas proporções hidroalcoólicas. Por meio desta pesquisa pode-se ter noção da quantidade de substâncias fenólicas que essas utilizações podem extrair e quais seriam as combinações mais eficientes, levando em consideração que é realizada de forma empírica a maceração a frio.

#### **iv) Influência do pH**

Verifica-se que alguns fenólicos ocorrem na forma de ligações com glicosídeos ou ésteres. A hidrólise ácida é interessante nessa ótica, para que aconteça a quebra das ligações fenólicas e aumente a capacidade de extração do solvente (Naczki e Shahidi, 2006).

Alguns autores atribuem o aumento da atividade antioxidante em extrações devido à acidificação do meio. Em frações aquosas de farelo de trigo a atividade antioxidante foi potencializada em condições muito ácidas (Baublis, Decker e Clydesdale, 2000). Em um experimento com bagaço de uva variando o pH de 3,5 a 1,5, o solvente extrator mais ácido apresentou maior capacidade antioxidante.

Neste trabalho utilizou-se apenas uma quantidade pequena (10 µL de HCl 10% em 100 mL de solvente) de ácido. Optou-se por não acidificar com índice muito extremo devido a possível produção de artefatos no meio.

#### **v) Atividade antioxidante**

Diversos métodos e sistemas de solventes têm sido usados para a extração de compostos fenólicos de produtos naturais visando determinar a melhor combinação



de fatores que possam influenciar na atividade de interesse. Uma das mais avaliadas é a atividade antioxidante devido à boa correlação que esta possui com as substâncias fenólicas e pelo fato de estarem presentes nos mecanismos de diversas patologias como o processo inflamatório, doenças degenerativas, entre outras.

Os ensaios *in vitro* como capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS aparecem como uma estratégia para comparação entre as variáveis utilizadas, devido à possibilidade da análise de muitas amostras num reduzido espaço de tempo, servindo como parâmetro para estudos com modelos mais específicos.

Para a seleção do método de extração foram considerados os rendimentos dos extratos brutos, os percentuais de substâncias bioativas, fenóis e de flavonoides, e a atividade antioxidante por meio da capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS.

#### **vi) Metodologia de extração.**

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido (. O tempo de extração é outro parâmetro que afeta a disponibilidade de compostos fenólicos. Tempos prolongados de extração aumentam a chance de oxidação dos fenólicos, a menos que agentes redutores sejam adicionados ao sistema solvente. Além disso, a razão amostra/solvente também influencia diretamente a recuperação de fenólicos de plantas (Naczki e Shahidi, 2004).

Atualmente, vem sendo testadas técnicas de extração e isolamento de compostos com o intuito de reduzir o consumo de solventes, acelerar e tornar mais eficiente o processo de extração. Dentre as técnicas testadas incluem-se: extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, extração assistida por microondas, maceração e extração assistida por ultrassom (sonicação) (Garcia-

Salas *et al.*, 2010). Nesse trabalho optou-se pela seleção dos métodos de sonicação e maceração devido a facilidade de reprodução destes em ambientes que não sejam acadêmicos e pelo fato deste último já ser empregado pela população de forma artesanal.

Todos esses fatores foram analisados e avaliando os resultados da MANOVA em termos de valor-p, observou-se que tanto o tipo de solvente quanto o método de extração e o efeito da interação entre solvente-método de extração, afetaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o percentual de rendimentos, fenólicos e de flavonóides. Entretanto, observou-se na matriz de correlação parcial dos erros, em cada uma das amostras, correlações fracas. O conjunto de variáveis respostas (rendimento, fenólicos, flavonoides e capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS) indicaram que a vantagem da análise multivariada era pequena e que análises individuais deveriam ser realizadas usando um delineamento de experimento fatorial (ANOVA). Os resultados das análises estatísticas para as quatro matérias primas selecionadas serão descritas nos próximos tópicos conforme cada matriz e o gráfico a seguir ilustrada a média dos resultados totais.

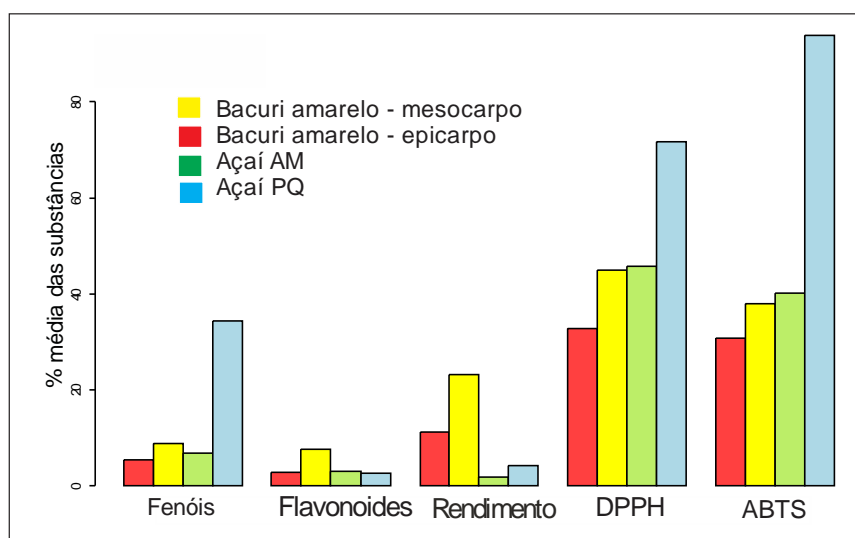


Gráfico 12: Percentual médio de substâncias extraídas por cada resíduo.

Pode-se notar que o açaí do PA possui percentual médio de fenol bem superior aos demais frutos e também maior atividade de DPPH e ABTS, enquanto o Bacuri amarelo (mesocarpo) possui maior percentual médio das substâncias flavonoidicas e maior rendimento. Os resultados apresentados nas sessões a seguir foram obtidos pela análise de variância (ANOVA).

### 5.9.1. AÇAÍ DO PARÁ (*E. oleraceae*)

Para a seleção do método de extração foram considerados os rendimentos dos extratos brutos, os percentuais de substâncias bioativas, fenóis totais, e o percentual de atividade antioxidante por meio da capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS (tabela 15).

método	Proporção EtOH:H <sub>2</sub> O	Rendimento (%)	Fenóis totais (%)	DPPH (%)	ABTS (%)
Maceração a frio (CM)	100	6,56 ± 0,22	44,11 ± 2,40	73,57 ± 1,15	94,33 ± 0,12
	80	5,37 ± 0,49	32,23 ± 1,26	70,78 ± 0,84	94,36 ± 0,36
	50	4,19 ± 0,21	35,62 ± 1,89	72,47 ± 0,73	93,06 ± 0,46
	20	2,87 ± 0,06	22,68 ± 2,19	66,48 ± 2,94	92,60 ± 0,75
Maceração a quente (HM)	100	5,63 ± 0,20	44,06 ± 1,31	74,59 ± 1,38	94,00 ± 0,24
	80	5,23 ± 0,29	33,76 ± 2,00	73,92 ± 2,48	94,58 ± 0,28
	50	4,80 ± 0,24	37,00 ± 0,89	73,81 ± 4,78	93,39 ± 0,28
	20	4,47 ± 0,19	28,50 ± 1,33	70,86 ± 4,61	93,02 ± 0,74
Sonicação neutro (NS)	100	3,79 ± 0,16	38,22 ± 2,06	72,92 ± 1,38	94,23 ± 0,34
	80	3,56 ± 0,16	33,94 ± 2,24	72,39 ± 0,88	94,44 ± 0,27
	50	3,12 ± 0,22	37,22 ± 0,86	73,19 ± 1,26	93,91 ± 0,12
	20	3,15 ± 0,09	29,86 ± 1,95	64,09 ± 1,97	93,77 ± 0,43
Sonicação ácida (AS)	100	4,53 ± 0,17	37,18 ± 2,15	74,07 ± 0,63	94,52 ± 0,66
	80	3,24 ± 0,09	33,03 ± 2,34	72,38 ± 0,39	94,26 ± 0,23
	50	3,02 ± 0,10	32,46 ± 1,22	73,35 ± 1,29	93,49 ± 0,44
	20	3,11 ± 0,06	29,97 ± 0,85	69,44 ± 0,02	93,75 ± 0,24

Tabela 15: Resultados das análises de otimização das sementes de *E. oleraceae*.

A tabela 16 apresenta a correlação entre as variáveis observadas. É considerada a existência de correlações o quanto mais próximo de um em módulo.

	Flavonoides	Fenóis	Rendimento	DPPH	ABTS
Flavonoides	1.0000	0.0834	0.1682	0.1218	-0.0705
Fenóis	0.0834	1.0000	-0.2382	0.0578	0.0549
Rendimento	0.1682	-0.2382	1.0000	-0.1462	-0.0466
DPPH	0.1218	0.0578	-0.1462	1.0000	0.2215
ABTS	-0.0705	0.0549	-0.0466	0.2215	1.0000

Tabela 16: Matriz de correlação dos erros referentes as variáveis respostas das extrações de sementes de *E. oleraceae*.

Assim, a matriz de correlação parcial dos erros obtida para o conjunto de variáveis respostas (rendimento, fenólicos e atividade antioxidante) indicou a presença de correlações fracas indicando que análises individuais para o percentual de rendimentos, fenólicos e de flavonoides deveriam ser realizadas usando um delineamento de experimento fatorial. Os resultados foram obtidos pela análise fatorial individual (ANOVA) é descrita na tabela 17 e nos gráficos 13 e 14.

#### Análise de Variância Univariada Açaí do Pará

	Causa de variação	Gl.	SQ	MQ	Fc	Valor-p
Rendimento	Técnica Extração	3	25.694	8.565	193.137	0.000
	Solvente	3	20.339	6.780	152.883	0.000
	Técnica Extração*Solvente	9	9.984	1.109	25.015	0.000
	Resíduos	32	1.419	0.044		
Fenólicos totais	Técnica Extração	3	154.800	51.600	16.470	0.000
	Solvente	3	3205.300	1068.440	341.040	0.000
	Técnica Extração*Solvente	9	684.900	76.100	24.290	0.000
	Resíduos	128	401.000	3.130		
Flavonoides totais	Técnica Extração	3	1.797	0.599	30.856	0.000
	Solvente	3	9.886	3.295	169.783	0.000
	Técnica Extração*Solvente	9	2.880	0.320	16.488	0.000
	Resíduos	128	2.484	0.019		
DPPH	Técnica Extração	3	171.690	57.231	12.425	0.000
	Solvente	3	824.130	274.709	59.642	0.000
	Técnica Extração*Solvente	9	142.810	15.867	3.445	0.001
	Resíduos	128	589.560	4.606		
ABTS	Técnica Extração	3	5.727	1.909	10.884	0.000
	Solvente	3	34.613	11.538	65.778	0.000
	Técnica Extração*Solvente	9	8.228	0.914	5.212	0.000
	Resíduos	128	22.451	0.175		

Tabela 17: ANOVA para os valores dos rendimentos, fenólicos e flavonoides dos extratos dos resíduos de nos fatores método de extração e solvente. Efeitos com valor-p < 0,05 são considerados significativos; gl = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio.

Em todos os gráficos, verificou-se a prevalência de etanol 100% como o melhor solvente extrator. A única exceção foi para a atividade antioxidante com ABTS, onde a proporção de 80% apresentou resultados próximos. A metodologia utilizando o cátion ABTS é realizada em meio aquoso assim, esse pode ser um dos fatores que explicaria essa divergência. Os maiores rendimentos em etanol 100% observados podem ser explicados pela polaridade do solvente.

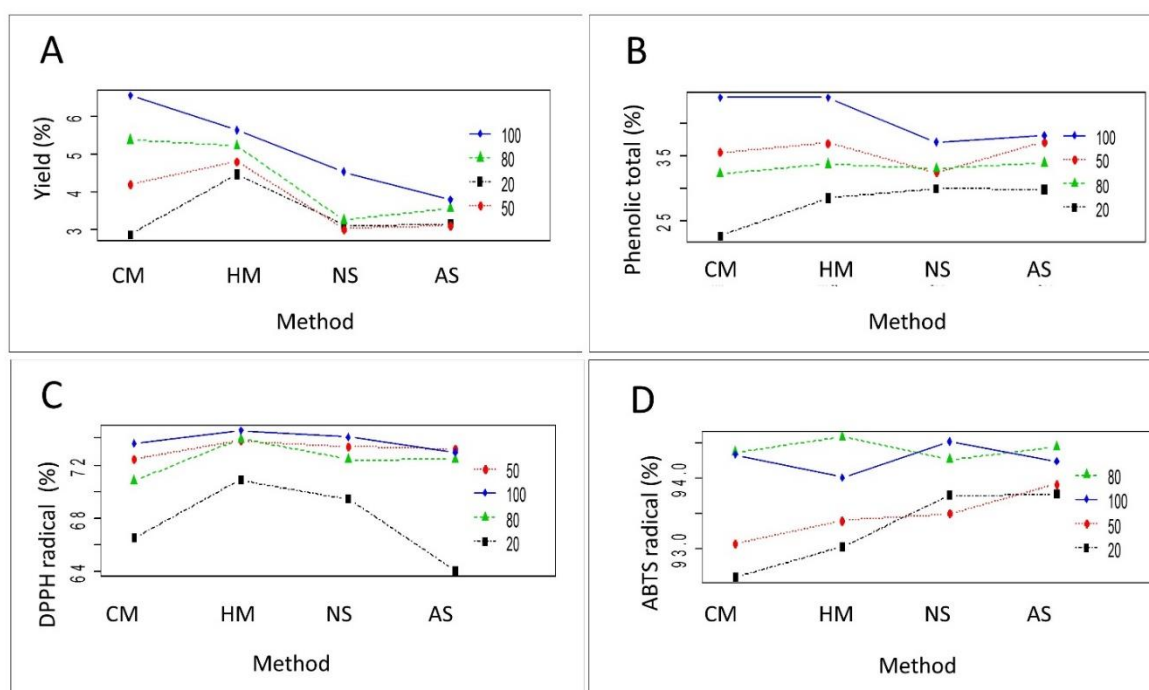


Gráfico 13: Influência do solvente nas metodologias para os resultados de A) Rendimento; B) compostos fenólicos, C) antioxidante frente ao DPPH e D) em radical ABTS de *E. oleraceae*.

A maioria das substâncias fenólicas não são encontrados na forma livre na natureza, mas como ésteres ou unidas a moléculas de açúcar, como no caso das antocianinas e flavonoides glicosilados. Por isso, muitos trabalhos têm descrito solventes hidroalcoólicos para a extração de substâncias fenólicas, uma vez que eles têm uma grande afinidade com solventes polares (Othman, Ismail & Adenan, 2007; Rockenbach *et al.*, 2008). Nesse trabalho, no entanto foi verificado que a

percentagem de fenólicos diminui com o aumento da polaridade. Assim, conclui-se que as classes encontradas devam estar relacionadas com a presença de substâncias anglicanas, fenólicas, menos polares ou de baixo peso molecular, que proporcionaram maiores interações entre solvente-amostra nos extratos etanólicos. Para analisar todos os parâmetros de forma simultânea foi realizado gráficos de superfície onde os melhores parâmetros puderam ser visualizados (gráfico 14).

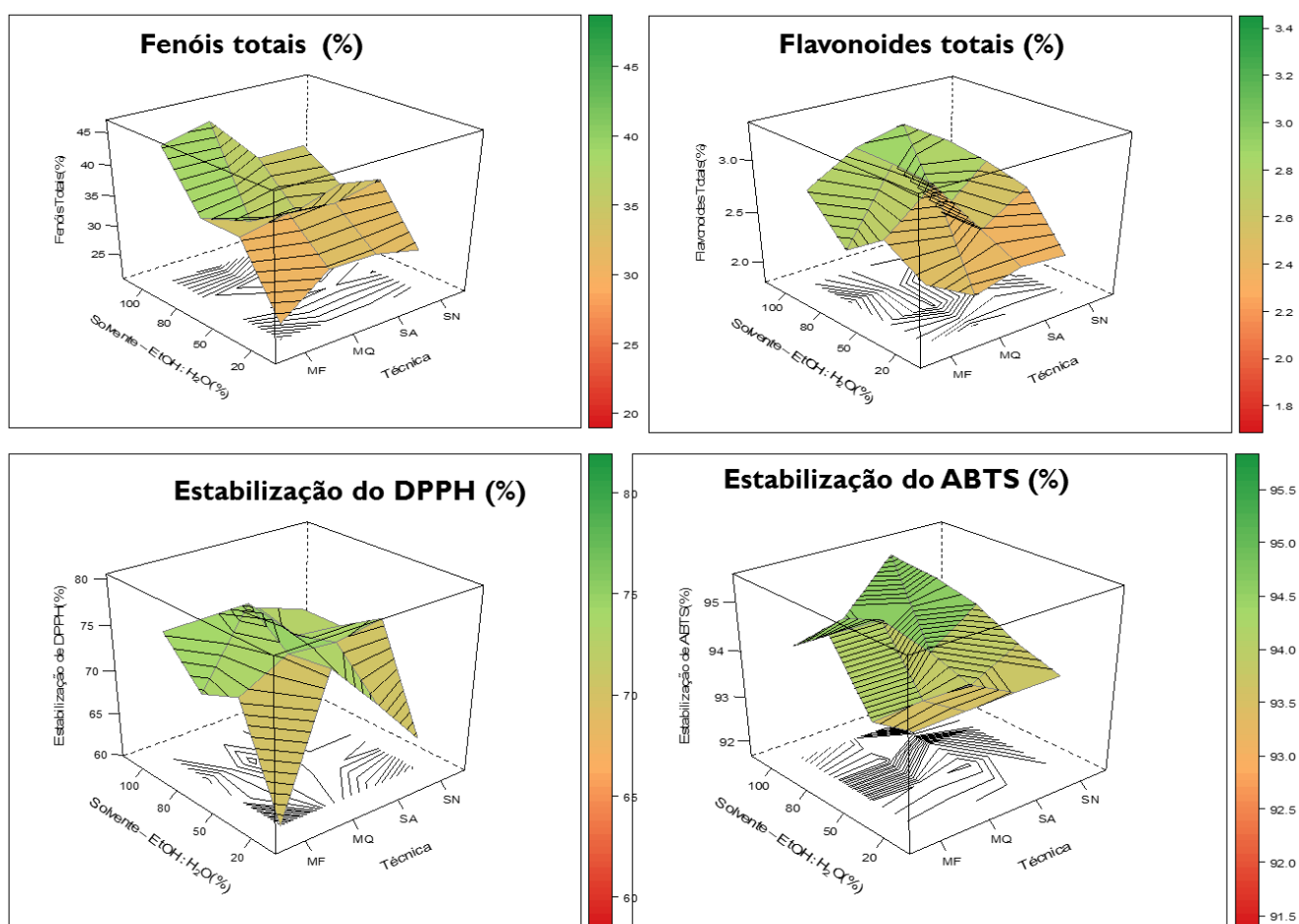


Gráfico 14: Gráfico de superfície de resposta para A) Rendimentos, B) fenólicos totais, C) DPPH e ABTS de *E. oleraceae*;

Nesse trabalho foi possível verificar as diferenças significativas entre os métodos de extração e parâmetros de temperatura, acidez e tempo. O método de maceração apresentou os melhores valores em todas os resultados e os de sonicação os menores percentuais.

Segundo detectado pela ANOVA efeitos significativos foram observados para os dois diferentes métodos de extração, maceração e sonicação. No entanto o mesmo não foi verificado para a proporção de solvente. Os rendimentos variaram de 6,56 a 2,87%, sendo a MF a metodologia que apresentou os maiores e os menores valores. Nesse método de extração, o tipo de solvente afetou significativamente os resultados ( $p < 0.05$ ). Nos dois diferentes mecanismos de extração, as macerações apresentaram melhor poder extrator tanto no solvente etanol, quanto no hidroalcoólico em relação a sonicação. A MQ apresentou maiores rendimentos em todos os solventes hidroalcoólicos e a MF em solvente etanólico (gráfico 14). Esses valores também foram proporcionais a quantidade de substâncias fenólicas. Diversos métodos e sistemas de solventes têm sido usados para a extração de compostos fenólicos de produtos naturais visando determinar a melhor combinação de fatores que possam influenciar na atividade de interesse.

No trabalho de Pompeu, Silva e Rogez (2009) com a polpa de açaí, os resultados foram semelhantes. Esses autores determinaram os melhores parâmetros para a quantidade de fenólicos e antocianinas por meio de diferentes temperaturas e proporções de etanol e água como solvente extrator. Os melhores resultados foram detectados em proporção de etanol: água de 50% e em temperatura de 62°C. No entanto esses autores não analisaram somente com solvente etanol, proporção que apresentou os melhores resultados nesse trabalho.

Outro parâmetro analisado por esses autores foi a diferença no pH, por meio da adição de pequena proporção de ácido. Foi encontrada diferenças na obtenção de antocianinas, e moderada alteração na proporção de fenólicos totais. Nesse trabalho, no entanto, não houve variação na quantidade de fenólicos totais extraídos ao ser adicionado ácido no meio reacional.

O método de sonicação em ultrasson, não apresentou variações significativas em relação ao pH do meio. No caso das substâncias glicosiladas, pode facilitar a quebra do açúcar e extração em solventes menos polares. Essa técnica é muito utilizada pela indústria de alimentos e pode ser verificada em trabalhos na literatura como procedimento para extração de flavonoides e antocianinas. Na própria espécie de *Eutepe oleracea* alguns autores utilizam essa técnica para detecção dos componentes majoritários na polpa. Os resultados desse trabalho de baixo rendimento em solventes mais polares e o não aumento da percentagem de fenólicos com a adição de solução ácida corroboram com a possibilidade da baixa quantidade de substâncias glicosiladas nas sementes dessa espécie. Esses dados diferenciam consideravelmente a polpa das sementes, pois enquanto a polpa é conhecida por apresentar tais fenólicos glicosilados, na semente, os fenólicos simples e de baixo peso molecular parecem ser os majoritários.

Uma das atividades biológicas mais avaliadas nos estudos de açaí é a atividade antioxidante. A análise de variância para o percentual de capacidade de estabilização do radical ABTS demonstrou que nem o método de extração nem o solvente apresentaram interações significativas ( $p < 0,05$ ) entre solvente-método de extração (gráfico 14). A percentagem de atividade antioxidante para os radicais DPPH e ABTS foram muito próximos em todos os métodos de extração.

Considerando o efeito das interações solvente-método de extração, verificou-se que o melhor solvente para extração de substâncias fenólicas e para o rendimento foi etanol puro. Foram realizados diferentes parâmetros de cada metodologia para avaliar qual tempo de extração seria mais eficiente para obter o maior rendimento. Os resultados podem ser verificados na tabela 18. Como as interações significativas foram observadas pela ANOVA, utilizou-se o teste de Tukey para avaliar as



diferenças significativas entre todas as possíveis combinações entre os métodos e tempos utilizados.

A maceração a frio novamente apresentou os melhores resultados que as demais técnicas. Por meio da otimização verificou-se que com apenas 48 horas obteve-se o mesmo rendimento que o obtido em 72 horas dias. A exposição do material vegetal no solvente extrator para maceração a quente apresentou melhores resultados durante 2 horas. Após esse tempo o rendimento ficou constante, tendo a extração de 3 horas o mesmo rendimento que o anterior e na sonicação os resultados não apresentaram diferença significativa com o aumento de exposição.

método	Maceração (MF)				Maceração(MQ)			Sonicação (SN)				SA
tempo	1 hora	1 dia	2 dias	3 dias	1 hora	2 horas	3 horas	60 min	30 min	20 min	10 min	20 min
rendimento	4.26 ± 0.146 <sup>C</sup>	5.64 ± 0.33 <sup>B</sup>	6.74 ± 0.19 <sup>A</sup>	6.49 ± 0.31 <sup>A</sup>	4.78 ± 0.24 <sup>A</sup>	5.23 ± 0.21 <sup>A</sup>	5.36 ± 0.23 <sup>A</sup>	3.97 ± 0.24 <sup>B</sup>	3.93 ± 0.19 <sup>B</sup>	4.20 ± 0.26 <sup>AB</sup>	3.76 ± 0.24 <sup>B</sup>	4.87±0.34 <sup>A</sup>

Tabela 18: Rendimento dos diferentes parâmetros dos métodos de extração de *E. oleraceae*. Interações com letras iguais não diferem significativamente entre si.

Realizou-se a quantificação da capacidade de sequestro dos radicais livres para os melhores parâmetros (tabela 19). Para ambos radicais a IC<sub>50</sub> (concentração de inibição, quantidade de material necessária para estabilizar 50% dos radicais livres) foi melhor em MQ, com valores próximos ao detectado para o padrão. A extração por sonicação ácida apresentou o maior rendimento, porém, ao analisar a quantidade de fenólicos totais e a capacidade antioxidante observou-se que a maior extração não representava o aumento da quantidade de substâncias bioativas, tendo em vista que a quantidade de fenólicos e a atividade antioxidante produziu resultados semelhantes ao detectado pela sonicação com solvente neutro.

Método	ABTS	DPPH	Fenólicos totais
MF – 2 days	11.01±0.49 <sup>D</sup>	15.08±0.11 <sup>C</sup>	44.74±2.02 <sup>A</sup>
MQ – 3h	6.53±0.10 <sup>A</sup>	14.71±0.04 <sup>B</sup>	43.43±1.86 <sup>A</sup>
SN – 20 min	9.78±0.19 <sup>B</sup>	16.09±0.13 <sup>E</sup>	37.42±1.82 <sup>B</sup>
SA – 20 min	10.07±0.12 <sup>C</sup>	16.56±0.17 <sup>D</sup>	37.24±1.57 <sup>B</sup>
standard	10.61±0.09 <sup>C</sup>	7.24±0.21 <sup>A</sup>	100

Tabela 19: Resultados da quantificação da capacidade antioxidante dos melhores parâmetros dos métodos de extração. Interações com letras iguais não diferem significativamente entre si

Assim, segundo o teste de Tukey, a combinação de maceração a quente com etanol 100% é a mais indicada para as extrações de fenólicos e para a atividade antioxidante. Durante uma extração, a temperatura desempenha um papel importante, uma vez que o aumento da temperatura favorece a solubilidade de muitos compostos em solventes orgânicos por meio do fornecimento de energia na forma de calor, contribuindo para maiores interações solvente-amostra e proporcionando, desta maneira, extrações mais eficientes. Os resultados obtidos neste trabalho para o efeito do método estão de acordo com diversos autores (Pompeu e Rogez, 2009; Xu *et al.*, 2007) que descrevem a relação crescente entre temperatura de extração e rendimentos de substâncias fenólicas, correlacionando com a atividade antioxidante. Alternativamente, os métodos maceração a frio e sonicação, ambos em etanol 100% poderiam ser utilizados, visto que essas combinações não diferem significativamente entre si, confirmando a análise descritiva do gráfico de superfície.

### 5.9.2 AÇAÍ DO AM (*E. precatoria*)

Os resultados das análises de *E. precatoria* estão resumidos na tabela 20 e ilustradas nos gráficos a seguintes:

Tabela 20: Resumo dos resultados das análises de otimização de *E. precatoria*

sp	Método	Proporção EtOH:H <sub>2</sub> O	Rendimento (%)	Fenóis totais (%)	Flavonoides totais (%)	DPPH (%)	ABTS (%)
<i>E. precatoria</i>	Maceração (a frio)	100	0,98 ± 0,02	14,21 ± 0,53	4,09 ± 0,35	71,37 ± 2,35	71,74 ± 0,98
		80	2,30 ± 0,12	8,19 ± 0,67	2,33 ± 0,09	47,33 ± 2,45	42,14 ± 1,88
		50	3,44 ± 0,24	3,67 ± 0,28	2,23 ± 0,17	30,25 ± 1,37	26,98 ± 0,86
		20	4,68 ± 0,11	3,66 ± 0,28	1,30 ± 0,07	12,47 ± 0,85	13,74 ± 0,58
	Maceração (a quente)	100	1,24 ± 0,04	14,30 ± 0,34	4,58 ± 0,31	74,46 ± 0,21	73,04 ± 0,59
		80	2,10 ± 0,10	8,56 ± 0,46	2,54 ± 0,09	58,24 ± 1,66	42,60 ± 1,12
		50	3,22 ± 0,16	4,59 ± 0,19	2,49 ± 0,15	47,74 ± 3,36	28,26 ± 1,21
		20	3,36 ± 0,05	4,48 ± 0,32	1,85 ± 0,07	35,84 ± 2,12	14,05 ± 1,03
	Ultrassom (neutro)	100	0,49 ± 0,01	8,74 ± 0,53	5,30 ± 0,18	70,12 ± 3,51	70,40 ± 1,65
		80	0,84 ± 0,04	7,88 ± 0,06	2,78 ± 0,12	52,76 ± 3,18	45,28 ± 2,67
		50	1,07 ± 0,10	5,69 ± 0,40	2,41 ± 0,13	37,24 ± 2,22	35,05 ± 0,90
		20	1,08 ± 0,09	4,94 ± 0,24	1,94 ± 0,13	25,09 ± 1,85	16,83 ± 0,75
	Ultrassom (ácido)	100	0,60 ± 0,02	8,24 ± 0,59	5,90 ± 0,23	63,84 ± 3,20	69,06 ± 2,29
		80	0,98 ± 0,07	6,84 ± 0,34	2,62 ± 0,16	47,44 ± 2,96	44,33 ± 2,59
		50	1,22 ± 0,07	3,62 ± 0,13	2,28 ± 0,13	35,59 ± 2,22	32,27 ± 1,80
		20	1,68 ± 0,09	3,29 ± 0,15	1,58 ± 0,09	24,26 ± 1,87	16,53 ± 0,80

A proposta inicial consistiu em modelar os dados da seguinte forma:

$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\delta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ , onde  $\tau_i$  representou o fator técnica de extração,  $\beta_j$  representou o fator Solvente em diferentes proporções de etanol,  $(\delta)_{ij}$  representou a interação entre os fatores,  $\varepsilon_{ijk}$  teve distribuição  $p$ -variada com média zero e matriz de covariâncias sigma, e  $y$  um vetor com as variáveis de interesse. Os resultados obtidos estão descritos a seguir:

Tabela 21: Matriz de correlação dos erros referentes a *E. precatoria*.

	Flavonoides	Fenóis	Rendimento	DPPH	ABTS
Flavonoides	1.0000	-0.1484	-0.0368	0.5592	-0.1555
Fenóis	-0.1484	1.0000	-0.0908	-0.0332	0.1252
Rendimento	-0.0368	-0.0908	1.0000	0.1175	0.0349
DPPH	0.5592	-0.0332	0.1175	1.0000	-0.0283
ABTS	-0.1555	0.1252	0.0349	-0.0283	1.0000

A matriz mostrou baixa correlação entre os erros e indicou, assim como na amostra de *E. olareacea* a viabilização da análise univariada.

Os rendimentos dos extratos de sementes de *E. precatoria* apresentaram uma grande variação, de  $4,68 \pm 0,11\%$  na maceração com extrator hidroalcoólico (20%), até  $0,49 \pm 0,01\%$  na metodologia de sonicação com etanol.

No gráfico 15 verifica-se as interações existentes entre os fatores, ou seja, entre o método e o solvente utilizado proporcionando as melhores condições para as extrações. Verificou-se que entre as diferentes metodologias (maceração e sonicação) houve uma diferença considerável entre os rendimentos, exercendo influência significativa ( $p < 0.05$ ). O tipo de solvente foi um dos fatores que apresentou maior efeito. Entretanto, nas condições de cada metodologia, tanto em relação ao pH (solvente ácido e neutro) quanto à temperatura (quente ou em temperatura ambiente) as alterações foram menores, com exceção da proporção hidroalcoólica 20%, onde existiu uma diferença considerável em todas as metodologias.

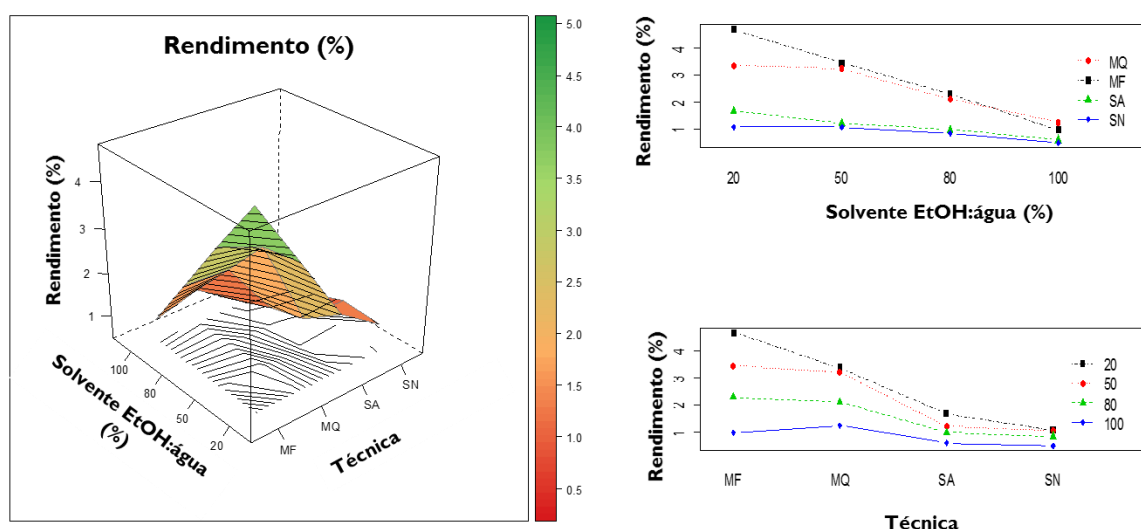


Gráfico 15: Interação solvente-método no percentual dos rendimentos dos extratos brutos das sementes de *E. precatoria*.

O perfil dos resultados para a extração das substâncias fenólicas e flavonoídicas foi semelhante. Ambas tiveram um decréscimo percentual ao ser acrescentado proporções de água como líquido extrator (gráfico 16).

Verifica-se que os efeitos individuais dos fatores (métodos e solventes) são importantes para a compreensão dos resultados, porém, quando há interação significativa (valor- $p < 0,05$ ) entre esses fatores, ambos são avaliados conjuntamente, uma vez que o objetivo é otimizar o processo de extração com o melhor método e solvente.

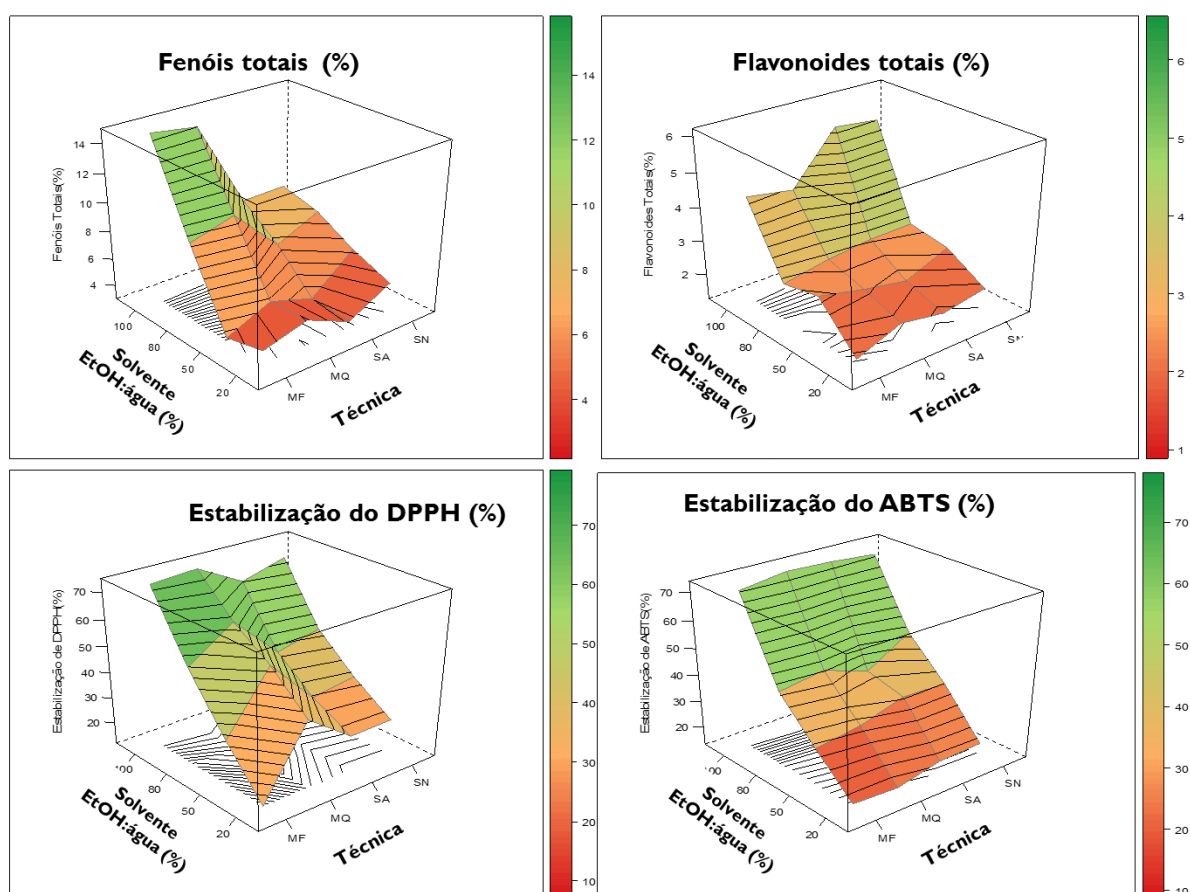


Gráfico 16: Gráfico de interação solvente-método dos extratos brutos das sementes de *E. precatoria*.

Por meio da análise de variância para o percentual de substâncias fenólicas (fenóis totais e flavonoides totais), observou-se que o método de extração isoladamente exerceu influência significativa nas proporções hidroalcólicas

( $p > 0.05$ ), assim como o tipo de solvente. Dessa forma, tanto o método de extração quanto a composição do solvente exercem efeitos sobre o percentual de substâncias fenólicas; e conjuntamente os efeitos observados são consideráveis.

O sequestro dos radicais DPPH e ABTS foi proporcional à quantidade de substâncias bioativas analisadas. A análise de variância para o percentual de capacidade de estabilização dos radicais DPPH e ABTS demonstrou que o método de extração isoladamente não exerceu influência significativa na atividade antioxidante frente ao ABTS<sup>•+</sup> ( $p > 0.05$ ) e moderada no DPPH<sup>•</sup>. Ao ser analisado o tipo de solvente, os resultados das metodologias do teste utilizando o ABTS<sup>•+</sup> foram os que apresentaram maiores alterações.

Ao passo que interações significativas foram observadas pela ANOVA, utilizou-se o teste de Tukey para avaliar as diferenças significativas entre todas as possíveis combinações entre os métodos e solventes utilizados. Conforme o teste de Tukey, obteve-se as seguintes conclusões:

1. **Flavonoides:** Conclusão: Obteve-se maior média % de Flavonoides utilizando a técnica de extração D (ultrasson ativa) e o solvente em nível de etanol 100. (5.90)
2. **Fenóis:** Conclusão: Obteve-se maior média % de Fenóis utilizando a técnica de extração A (Maceração a frio) ou B (Maceração a quente), o solvente em nível de etanol 100. (B: 14,30; A: 14,21)
3. **Rendimento:** Conclusão: Obteve-se maior média % de Rendimento utilizando a técnica de extração A (Maceração a frio) e o solvente em nível de etanol 20. (4,68)
4. **DPPH:** Conclusão: Obteve-se maior média % de DPPH utilizando a técnica de extração B (Maceração a quente) ao nível de etanol 100. (74.46)
5. **ABTS:** Conclusão: Obteve-se maior média % de ABTS utilizando as técnicas de extração A (Maceração a frio) e B (Maceração a quente), não diferiram significativamente, ao nível de etanol 100. (B: 73.04; A: 71.74).

Por meio destes resultados, conclui-se que para o efeito das interações solvente-método de extração, assim como o encontrado para a extração de substâncias fenólicas e flavonoídicas, a melhor combinação é o método maceração com solvente etanol.

### 5.9.3 Bacuri (*P. insignis*) - mesocarpo

A otimização da extração do mesocarpo de bacuri foi realizado e o resumo dos resultados encontrados pode ser verificado na tabela a seguir:

Tabela 22: Resumo dos resultados das análises de otimização de mesocarpo de *P. insignis*.

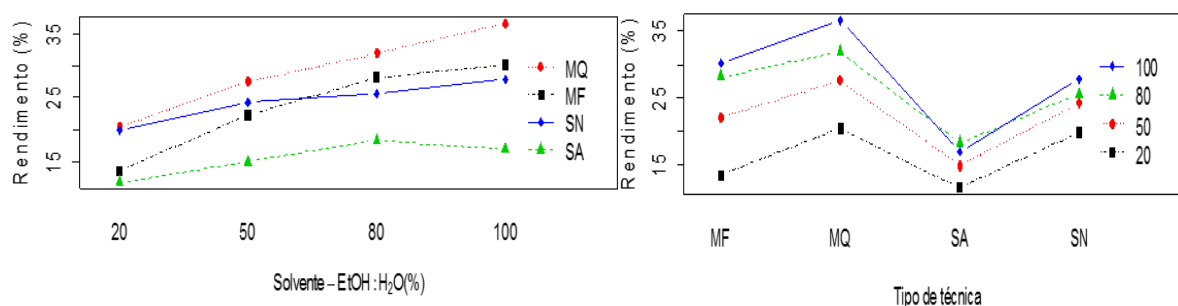
sp	método	Proporção EtOH:H <sub>2</sub> O	Rendimento (%)	Fenóis totais (%)	Flavonoides totais (%)	DPPH (%)	ABTS (%)
<i>P. insignis</i> (mesocarpo)	Maceração (a frio)	100	30,18 ± 1,45	14,60 ± 0,42	14,51 ± 0,24	77,34 ± 2,13	74,09 ± 1,48
		80	28,22 ± 1,28	9,59 ± 0,50	10,06 ± 0,36	58,16 ± 2,29	44,12 ± 3,21
		50	22,16 ± 1,52	5,23 ± 0,30	2,54 ± 0,19	33,91 ± 1,78	25,80 ± 1,47
		20	13,49 ± 0,61	2,64 ± 0,16	1,12 ± 0,08	15,14 ± 0,76	10,06 ± 0,42
	Maceração (a quente)	100	36,63 ± 0,55	15,80 ± 0,83	15,05 ± 0,80	74,81 ± 1,25	73,31 ± 1,21
		80	31,95 ± 2,03	12,34 ± 0,04	12,50 ± 0,42	61,10 ± 1,17	48,91 ± 3,37
		50	27,62 ± 0,26	6,86 ± 0,30	3,72 ± 0,19	33,75 ± 1,72	24,26 ± 1,18
		20	20,49 ± 0,85	3,64 ± 0,14	1,64 ± 0,10	16,72 ± 0,78	9,95 ± 0,31
	Ultrasson (neutro)	100	27,88 ± 1,36	14,12 ± 0,72	12,93 ± 0,42	72,78 ± 1,16	70,38 ± 1,55
		80	25,62 ± 0,62	11,50 ± 0,48	11,26 ± 0,99	54,30 ± 1,12	51,05 ± 2,50
		50	24,26 ± 0,25	6,42 ± 0,59	4,29 ± 0,15	34,26 ± 1,71	24,27 ± 1,23
		20	19,84 ± 0,73	2,86 ± 0,23	0,97 ± 0,04	10,18 ± 0,94	8,59 ± 0,66
	Ultrasson (ácido)	100	16,98 ± 0,69	14,31 ± 0,53	13,95 ± 0,62	74,14 ± 1,31	73,49 ± 2,82
		80	18,25 ± 1,34	10,22 ± 0,54	10,87 ± 0,48	54,61 ± 4,20	39,18 ± 1,80
		50	14,95 ± 0,61	6,38 ± 0,46	6,18 ± 0,41	35,02 ± 1,42	20,48 ± 1,10
		20	11,70 ± 0,49	3,58 ± 0,19	1,06 ± 0,03	14,96 ± 1,02	10,19 ± 0,41

De forma similar, a análise para o bacuri amarelo (mesocarpo) mostrou em termos de valor-p, que o tipo de solvente e o método de extração afetam de forma significativa os percentuais de rendimento, fenólicos e flavonoides obtidos, assim como é considerado significativo o efeito da interação entre o solvente e o método de extração. A matriz apresentada na Tabela 23 apresenta uma correlação negativa entre os erros das variáveis fenóis e rendimento, porém ainda considerada pequena. Desta forma, pode-se optar também por análises individuais.

Tabela 23: Matriz de correlação dos erros referentes ao Bacuri amarelo (mesocarpo).

	Flavonoides	Fenóis	Rendimento	DPPH	ABTS
Flavonoides	1.0000	-0.0104	0.1124	0.2391	-0.0035
Fenóis	-0.0104	1.0000	-0.3430	-0.0510	0.0334
Rendimento	0.1124	-0.3430	1.0000	-0.0862	0.0992
DPPH	0.2391	-0.0510	-0.0862	1.0000	-0.0684
ABTS	-0.0035	0.0334	0.0992	-0.0684	1.0000

Os rendimentos apresentaram variação alta, de  $36,63 \pm 0,55\%$  na MQ (100%) até  $11,70 \pm 0,49\%$  na SA (20%) (gráfico 17). Em relação ao pH, o solvente neutro foi mais extrativo que o solvente ativo. Nas macerações, a temperatura exerceu uma forte influência no poder extrator do solvente etanol, sendo a MQ a metodologia que mais conseguiu extrair substâncias.

Gráfico 17: Interação solvente-método no percentual do rendimento dos extratos brutos do mesocarpo de *P. insignis*.

À medida que a quantidade de etanol foi diminuindo em relação a de água, esse efeito ia sendo minimizado, ao ponto de que na proporção de 20% as duas macerações apresentaram resultados semelhantes. Concomitante com esse efeito, a capacidade de extração foi sendo minimizada e o rendimento diminuindo. De forma geral, houve uma diferença considerável entre os rendimentos na interação solvente e método de extração, exercendo influência significativa segundo a análise de variância ( $p < 0,05$ ).



Os resultados encontrados para esta matéria prima assemelham-se aos encontrados para as sementes de *E. precatoria*. A extração das substâncias fenólicas e flavonoídicas tiveram um decréscimo percentual ao ser acrescentado maiores proporções de água na mistura (gráfico 18).

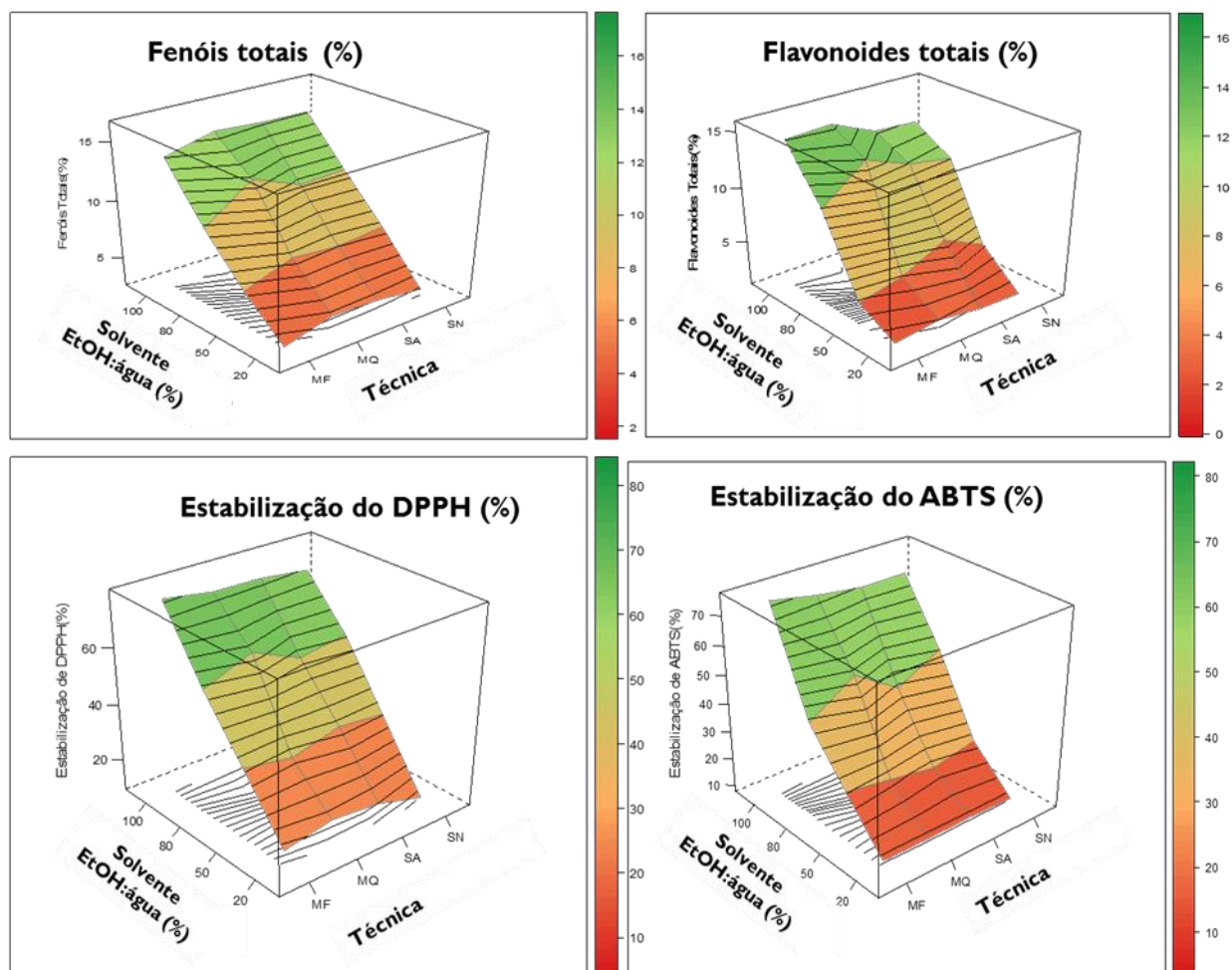


Gráfico 18: Gráfico de interação solvente-método no percentual de fenóis totais dos extratos brutos do mesocarpo de *P. insignis*.

Portanto, considerando o efeito das interações solvente-método de extração, verificou-se que a melhor combinação para extração de substâncias fenólicas e flavonoídicas é o método de maceração, tendo como solvente extrator o etanol.

A análise de variância para o percentual da capacidade de estabilização dos radicais DPPH e ABTS demonstrou que o método de extração não exerceu influência significativa na atividade antioxidante frente aos radicais testados. No entanto a polaridade do solvente exerceu forte influência, sendo minimizada com o aumento da polaridade. Dessa forma, segundo as ferramentas estatísticas, obteve-se resumidamente as seguintes conclusões:

1. **Rendimento:** Conclusão: Obteve-se maior média % de Rendimento utilizando a técnica de extração B (Maceração a quente) ao nível de etanol 100. (36.63)
2. **Flavonoides:** Conclusão: Obteve-se maior média % de Flavonoides utilizando a técnica de extração B (Maceração a quente) ao nível de etanol 100. (15.05)
3. **Fenóis:** Conclusão: Obteve-se maior média % de Fenóis utilizando a técnica de extração B (Maceração a quente) ao nível de etanol 100. (15.79)
4. **DPPH:** Conclusão: Obteve-se maior média % de DPPH utilizando a técnica de extração A (Maceração a frio) ao nível de etanol 100 (77,34). A média que mais se aproximou foi utilizando o tratamento B (Maceração a quente) e nível 100 (74,80); porém o teste indica diferença significativa)
5. **ABTS:** Conclusão: Obteve-se maior média % de ABTS utilizando as técnicas de extração A (Maceração a frio), B (Maceração a quente) e D (ultrassom ativado), que não diferiram significativamente, ao nível de etanol 100. (A: 74.09 , B: 73.31 e D: 73.49)

Por meio destes resultados, conclui-se que assim como na extração de substâncias fenólicas e flavonoidicas, o solvente etanol é o fator preponderante, tendo as diferentes metodologias pouca influência no resultado da capacidade de sequestro destes radicais.

#### 5.9.4 Bacuri (*P. insignis*) – epicarpo

Avaliando os resultados em termos de valor-p, concluímos que o tipo de solvente e o método de extração afetam de forma significativa os percentuais de rendimento, fenólicos e flavonoides obtidos do extrato do Bacuri amarelo (endocarpo). Também é considerado significativo o efeito da interação entre o

solvente e o método de extração. O resumo dos resultados encontrados na otimização de epicarpo de *P. insignis* podem ser verificados na tabela a seguir:

Tabela 24: Resumo dos resultados das análises de otimização do epicarpo de bacuri

sp	método	Proporção EtOH:H <sub>2</sub> O	Rendimento (%)	Fenóis totais (%)	Flavonoides totais (%)	DPPH (%)	ABTS (%)
<i>P. insignis</i> (epicarpo)	Maceração (a frio)	100	10,90 ± 0,26	6,51 ± 0,41	2,85 ± 0,15	52,14 ± 2,23	54,89 ± 1,92
		80	17,32 ± 0,56	5,47 ± 0,25	2,03 ± 0,11	34,56 ± 1,78	32,90 ± 1,08
		50	15,79 ± 0,76	3,56 ± 0,22	1,04 ± 0,09	15,47 ± 1,00	14,69 ± 0,96
		20	8,85 ± 0,29	3,57 ± 0,18	0,68 ± 0,04	5,07 ± 0,39	9,08 ± 0,59
	Maceração (a quente)	100	12,69 ± 0,53	7,02 ± 0,31	3,97 ± 0,23	53,36 ± 2,37	58,58 ± 2,62
		80	14,47 ± 0,83	5,15 ± 0,37	2,37 ± 0,16	38,84 ± 1,94	38,87 ± 0,42
		50	13,38 ± 0,58	4,70 ± 0,26	1,09 ± 0,09	25,05 ± 1,54	17,15 ± 1,06
		20	10,66 ± 0,59	4,40 ± 0,27	0,61 ± 0,04	13,08 ± 1,03	9,12 ± 0,44
	Ultrasson (neutro)	100	4,84 ± 0,23	7,14 ± 0,39	6,95 ± 0,30	53,77 ± 1,75	56,44 ± 0,36
		80	7,80 ± 0,38	6,24 ± 0,23	4,92 ± 0,20	46,00 ± 2,33	39,99 ± 1,59
		50	10,94 ± 0,69	5,35 ± 0,29	2,99 ± 0,16	30,06 ± 2,35	18,17 ± 0,68
		20	13,73 ± 0,74	3,27 ± 0,15	0,57 ± 0,04	12,23 ± 0,71	7,81 ± 0,54
	Ultrasson (ácido)	100	6,40 ± 0,39	7,22 ± 0,16	6,51 ± 0,39	55,91 ± 0,86	60,23 ± 2,52
		80	7,97 ± 0,07	6,62 ± 0,31	3,58 ± 0,25	42,63 ± 2,89	41,75 ± 2,48
		50	10,72 ± 0,32	6,58 ± 0,32	2,92 ± 0,25	30,52 ± 0,75	22,08 ± 1,23
		20	13,19 ± 0,87	4,02 ± 0,08	0,59 ± 0,03	14,65 ± 0,93	11,00 ± 0,84

A matriz de correlação parcial dos erros (resíduos) obtidos para o conjunto de variáveis respostas (rendimento, fenólicos, flavonoides) mostrou que as correlações eram fracas indicando que a vantagem da análise multivariada era pequena e que análises individuais para o % de rendimento, % de fenólicos e % de flavonoides deveriam ser realizadas usando um delineamento de experimento fatorial simples.

Tabela 25: Matriz de correlação dos erros referentes ao Bacuri amarelo (endocarpo).

	Flavonoides	Fenóis	Rendimento	DPPH	ABTS
Flavonoides	1.0000	-0.0021	0.1067	0.1312	0.2697
Fenóis	-0.0021	1.0000	0.1552	-0.1947	0.3763
Rendimento	0.1067	0.1552	1.0000	0.0352	0.1225
DPPH	0.1312	-0.1947	0.0352	1.0000	0.0299
ABTS	0.2697	0.3763	0.1225	0.0299	1.0000

Os rendimentos apresentaram uma grande variação, de  $14,47 \pm 0,83\%$  na proporção de 80% na MQ, até  $6,40 \pm 0,39\%$  na metodologia de sonicação com solvente etanol. O comportamento nas duas metodologias foi visivelmente diferente (gráfico 19). Nas extrações utilizando sonicação, observou-se uma linearidade (reta), enquanto que nas extrações em maceração formou-se uma curva com as diferentes proporções de solvente.

O poder extrator no solvente alcóolico estava maior nas macerações e a medida que este foi sendo minimizado, houve uma inversão ao ponto que na proporção de 20%, as extrações por sonicação apresentaram maiores rendimentos. Dessa forma, na análise estatística houve uma diferença considerável entre os rendimentos, tanto da metodologia quanto no fator solvente ( $p > 0,05$ ).

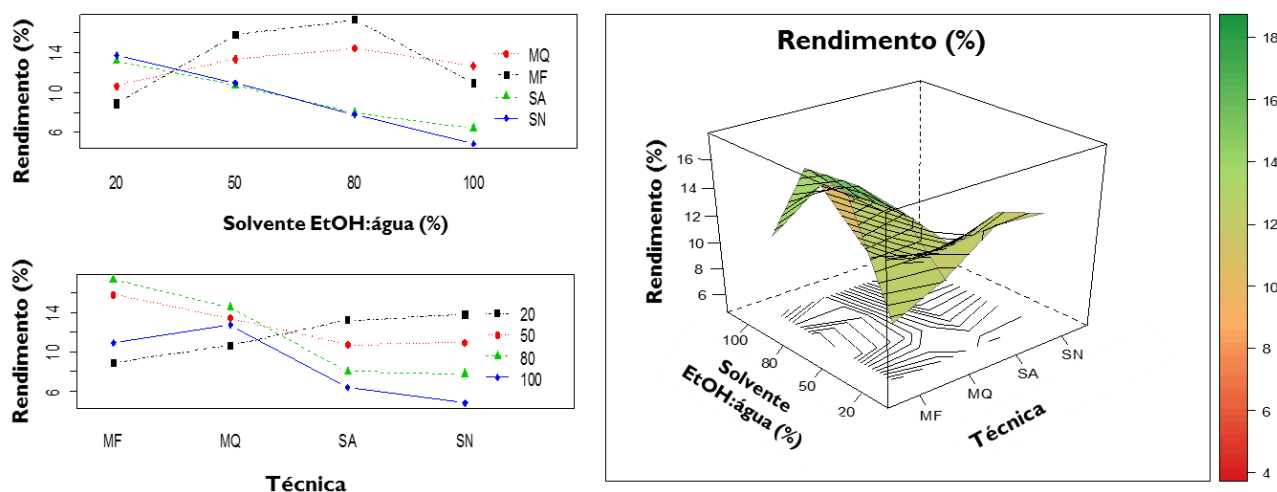


Gráfico 19: Gráfico de interação solvente-método no percentual de rendimento dos extratos brutos do epicarpo de *P. insignis*.

O perfil dos resultados para a extração das substâncias fenólicas e flavonoídicas foi muito diferente. Na extração de fenóis totais as metodologias (com exceção da proporção de 50%) apresentaram variação moderada. Porém na extração de substâncias flavonoídicas as diferentes metodologias de extração

apresentaram diferenças significativas ( $p > 0.05$ ). Enquanto MF extraiu  $2,85 \pm 0,15\%$ , SN extraiu mais que o dobro ( $6,51 \pm 0,39\%$ ). Essa variação foi sendo minimizada à medida que a proporção de água ia sendo maior que o etanol.

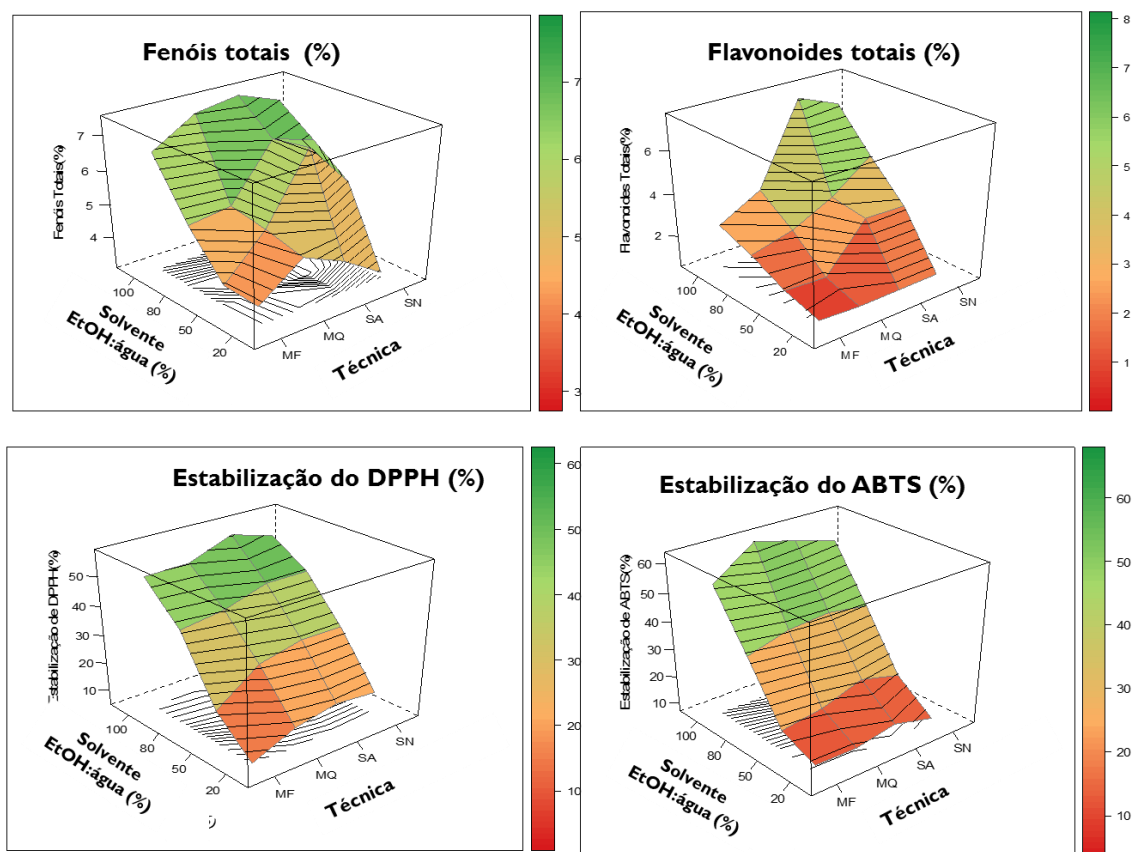


Gráfico 20: Gráfico de interação solvente-método no percentual de fenóis totais dos extratos brutos do epicarpo de *P. insignis*

Observou-se dessa forma que o método de extração isoladamente exerce influência significativa maior na extração de flavonoides que em fenólicos e que o tipo de solvente afeta moderadamente os resultados das extrações. Dessa forma, conclui-se que no epicarpo de bacuri as interações solvente-método afetam significativamente os resultados de extração das substâncias bioativas ( $p < 0.05$ ) e que a melhor combinação para extração de substâncias fenólicas e flavonoídicas é o método de sonicação em etanol.

A análise de variância para o percentual de capacidade de estabilização dos radicais DPPH e ABTS demonstrou que o método de extração isoladamente não exerceu alterações consideráveis na atividade antioxidante frente aos radicais ( $p > 0.05$ ), sendo decrescente com a diminuição do solvente etanol nas proporções. Por meio destes resultados, conclui-se que para o efeito das interações solvente-método de extração, o fator diferencial é o solvente etanol, não tendo as metodologias influência significativa. Dessa forma, segundo as ferramentas estatísticas, obteve-se resumidamente as seguintes conclusões:

1. **Rendimento.** Conclusão: Obteve-se maior média % de Rendimento utilizando a técnica de extração A (Maceração a frio) ao nível de etanol 80. (17.32)
2. **Flavonoides.** Conclusão: Obteve-se maior média % de Flavonoides utilizando a técnica de extração C (ultrasson neutro) ao nível de etanol 100. (6.95)
3. **Fenois.** Conclusão: Obteve-se maior média % de Fenóis utilizando a técnica de extração D (ultrasson ativado) ao nível de etanol 100. (7.22)
4. **DPPH.** Conclusão: Obteve-se maior média % de DPPH utilizando a técnica de extração D (ultrasson ativado) ao nível de etanol 100. (55.91)
5. **ABTS.** Conclusão: Obteve-se maior média % de ABTS utilizando a técnica de extração D (ultrasson ativado) ao nível de etanol 100. (60.23)

## 5.10 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma ferramenta eficiente para ser aplicada no monitoramento de processos de extração devido a sua alta sensibilidade e seletividade (Croati *et al.*, 2006). Neste trabalho utilizou-se dessa técnica para avaliar o perfil dos extratos brutos a fim de contribuir para a seleção do método de extração mais adequado para os compostos fenólicos.

Foram analisados os seguintes extratos: *E. precatoria*, *E. oleracea* e *P. insignis* (mesocarpo e epicarpo), originados das quatro metodologias de extração (MF, MQ, SN e SA). Foi selecionado apenas o melhor solvente extrator para a comparação do método de extração. Os critérios para a seleção foram os resultados de atividade antioxidante e obtenção de frações fenólicas. Dessa forma, selecionou-se os 16 extratos etanólicos.

Todos os extratos foram analisados no espectrômetro de massas nas mesmas condições de análises, com ionização electrospray no modo negativo e positivo, porém os espectros positivos apresentaram melhores resultados. A análise de estruturas de flavonoides é realizada mais frequentemente no modo positivo, devido ao fato do modo negativo ser considerado mais complexo e de difícil interpretação. Altas energias de colisão são necessárias para gerar uma fragmentação adequada no modo negativo, e algumas vezes, íons diagnósticos na determinação estrutural estão ausentes (Saldanha, 2013).

Essa técnica mostrou ser uma ferramenta rápida e eficiente para a caracterização qualitativa das misturas presentes nesses extratos. Os espectros de massas dos extratos brutos dos métodos utilizados e a intensidade dos principais picos serão apresentados conforme a matéria prima.

### 5.10.1 Perfil das extrações de BAE por espectrometria de massas

O perfil dos espectros apresentou similaridade entre os picos majoritários, destacando-se os íons 203, 360, 522 e 550 m/z nas quatro metodologias (figura 27).

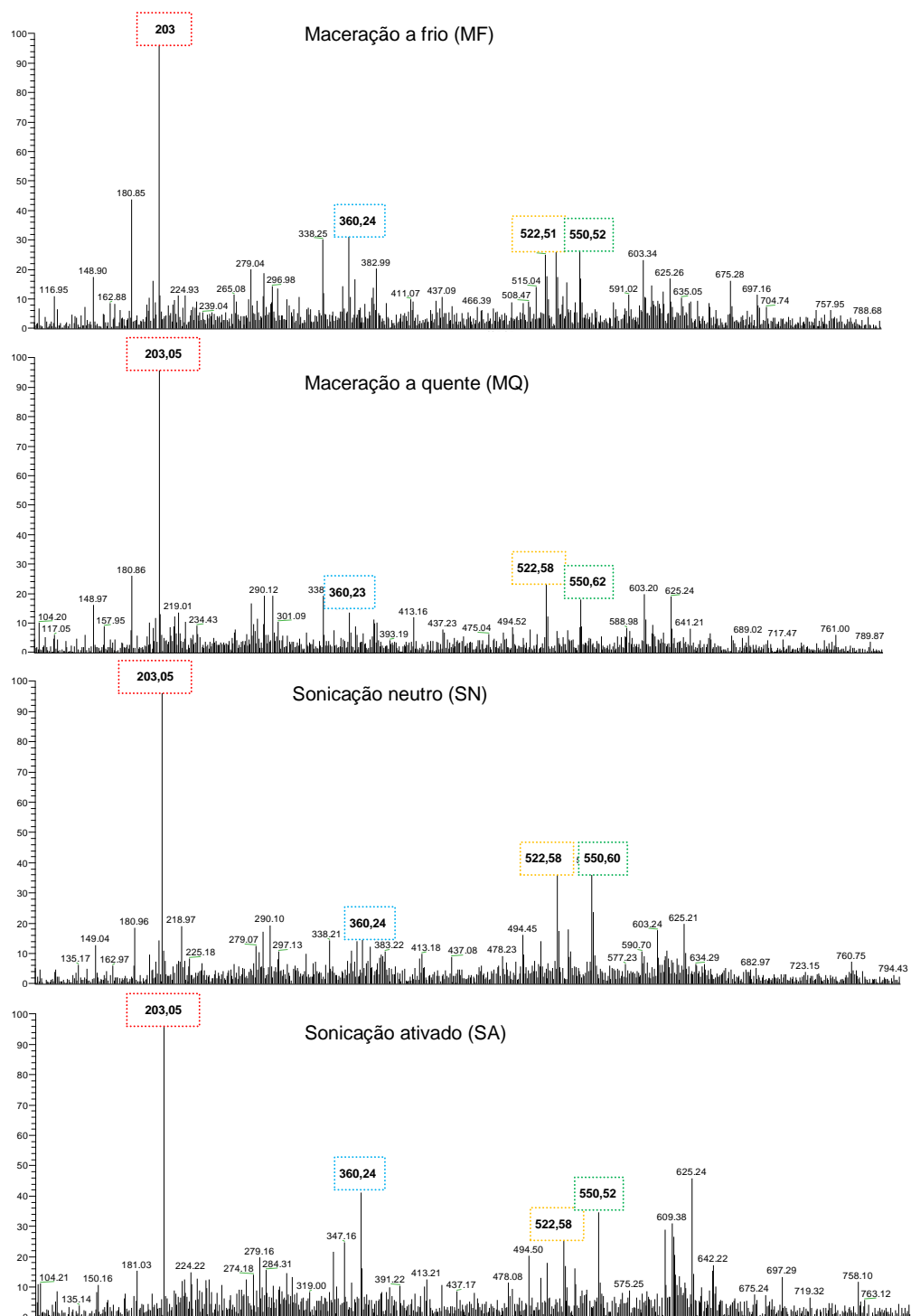


Figura 27: Espectro do perfil das extrações de BAE por espectrometria de massas.



As metodologias de extração não alteraram significativamente a extração dos compostos majoritários presentes no epicarpo de bacuri. Comparando-as, nas extrações em ultrasson, observou-se uma intensidade maior nos picos 522 e 550 m/z que os encontrados em maceração. A intensidade dos picos majoritários é apresentada na tabela 26.

Tabela 26: Intensidade dos picos majoritários (m/z) das extrações de BAE.

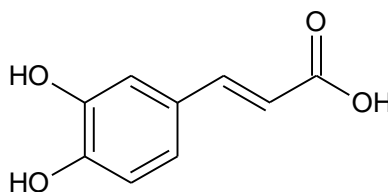
Métodos	Modo positivo de ionização (%)						Modo negativo de ionização (%)		
	181	203	338	360	522	550	215	295	325
MF	<b>44</b>	<b>100</b>	32	35	27	32	32	6	7
MQ	<b>28</b>	<b>100</b>	22	17	28	32	36	10	11
SO	20	<b>100</b>	16	16	45	<b>46</b>	22	6	9
SA	16	<b>100</b>	26	46	39	<b>53</b>	20	10	22

Entre as metodologias, a SA foi a que apresentou maiores particularidades, como o aumento da intensidade do pico 360 e dos picos nas áreas entre 600 e 650 m/z. Picos com massas moleculares altas, como os detectados nessas áreas podem significar a presença de substâncias glicosiladas ou polímeros.

Segundo Siqueira *et al.* (2003) os órgãos vegetais podem ser recobertos por ceras epidérmicas constituídas por misturas complexas de compostos de cadeias longas (> C18), tais como ácidos graxos, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos alifáticos polinucleares e compostos fenólicos, que podem apresentar massas moleculares altas como a cutina, suberina, celulose, lignina e outros biopolímeros. Segundo a literatura os picos 203 e 219 m/z são característicos de fragmentações de substâncias triterpênicas, como em olean-12-en-28-ato de metila e urs-12-en-28-ato de metila.

O extrato etanólico do epicarpo de bacuri apresentou coloração amarela, e consistência de graxa, assemelhando-se a característica de extratos ricos em substâncias apolares, confirmando a possibilidade da presença moléculas terpênicas.

Foi detectado em intensidade baixa a massa correspondente a xantona 1,3,5,6-tetraidróxi-2,2-(2-metilbuta-3-eno-2-il)-7-(3-metilbuta-2-enil)xantena-9-ona, descrita nas sementes. As outras substâncias descritas nas outras partes [sementes, polpa e casca (mesocarpo)] relatadas na literatura como TG1 não foram detectadas nesses extratos. O pico 181 m/z característico da presença de ácido caféico foi detectado na ionização (figura 28).



181 m/z

Figura 28: ácido caféico

Os picos com íons pares indicam a presença de substâncias com massa moleculares ímpares, como as substâncias contendo nitrogênio, como os picos 290, 360, 478 e 550. Devido a isso, testes cromatográficos são úteis e auxiliarão na identificação das classes presentes nos picos principais.

### 5.10.2 Perfil das extrações de BAM por espectrometria de massas

Os picos 243, 271, 603 e 625 m/z foram observados com abundância relativa em todas as extrações realizadas independente do método utilizado (figura 29).

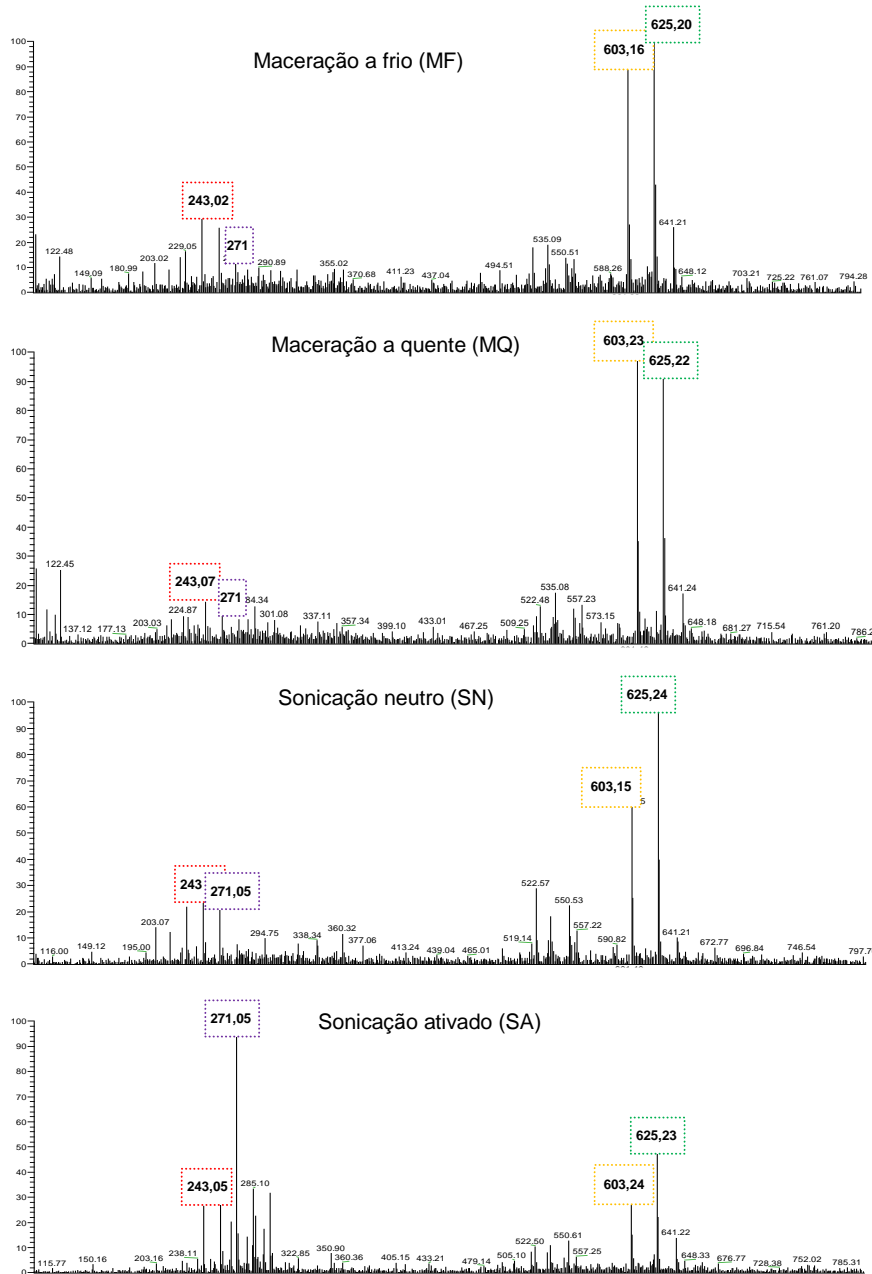


Figura 29: Espectro do perfil das extrações de BAM por espectrometria de massas

As metodologias de extração apresentaram semelhante perfil entre as extrações MF, MQ e SN. A extração com solvente ativo (acidificado), entretanto, apresentou ionização dos picos com intensidade diferente. Houve um aumento no

pico 271 m/z e diminuição de 603 e 625 m/z. A intensidade dos picos majoritários é apresentada na tabela 27.

Tabela 27: Percentual da intensidade dos picos majoritários das extrações de BAM por espectrometria de massas.

métodos	modo positivo de ionização						modo negativo de ionização		
	243	257	271	285	603	625	191	219	339
MF	32	26	14	10	<b>92</b>	<b>100</b>	20	16	7
MQ	18	10	8	14	<b>100</b>	<b>96</b>	10	7	10
SO	26	24	6	4	<b>64</b>	<b>100</b>	48	20	8
SA	30	32	<b>100</b>	36	40	<b>56</b>	45	43	36

Entre os parâmetros estudados (temperatura e pH), não existiu diferença considerável nos teores de flavonoides totais e na capacidade antioxidante analisadas nos métodos espectrofotométricos. Porém, o perfil cromatográfico por espectrometria de massas apresentou alterações conforme a acidez do meio.

Em flavonoides como as antocianinas, o pH é o fator que mais influência nas extrações, visto que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas (Lee *et al.*, 2005; Bordignon Jr *et al.*, 2009). Assim, a espectrometria de massas sendo uma técnica de alta sensibilidade possibilitou a detecção de íons e a comparação das diferenças originadas nas metodologias.

Uma das alterações comumente descritas na literatura é a quebra da ligação do açúcar ligado ao flavonoide devido à acidez do meio. Esse pode ser um dos motivos da diminuição na intensidade dos picos com valores maiores, como 603 e 625, e aumento de picos menores como 271 m/z (Sani *et al.*, 2012).

Na ionização no modo negativo, detectou-se os íons de 311 e 339 m/z, que segundo descrito por Chen *et al.* (2012) podem estar relacionados com as massas do ácido tartárico e do ácido cafeoil-D-glicose respectivamente. Outros picos

característicos de fenólicos foram 229 e 271 m/z correspondentes as estruturas de resveratrol e pelargonidina no modo positivo e 311 e 553 m/z correspondentes ao ácido caftárico e clorogênico respectivamente (figura 30).

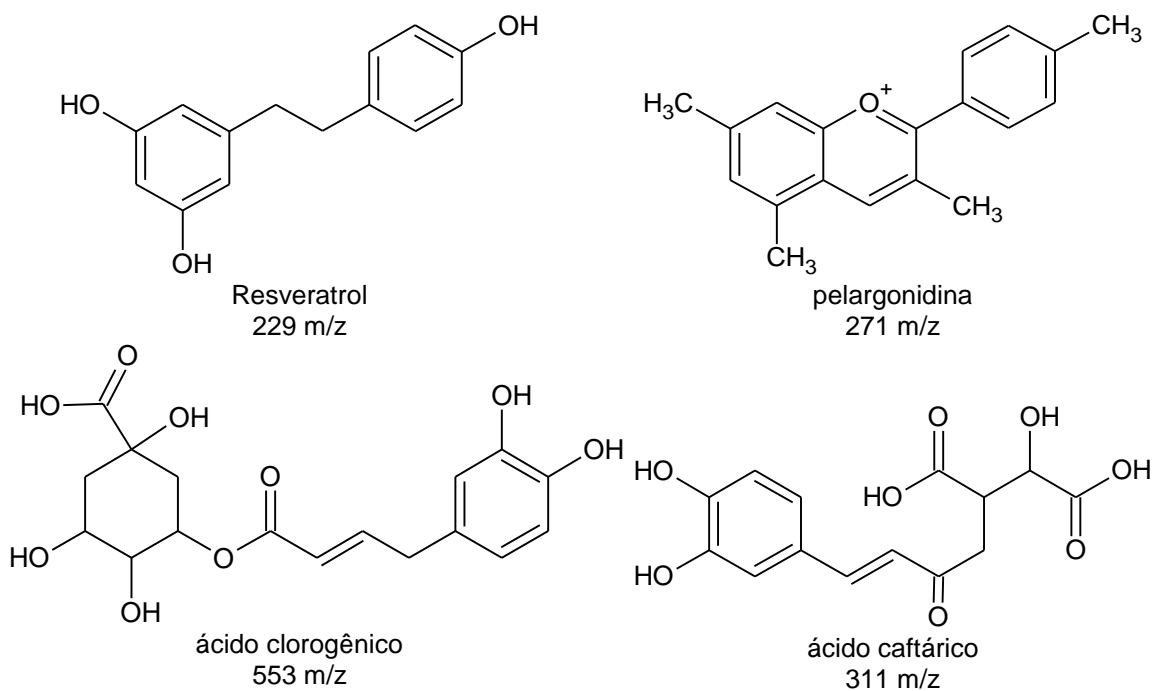


Figura 30: Estrutura das substâncias correspondentes aos íons moleculares detectados nos extratos de BAM

### 5.10.3 Perfil das extrações de *E. precatória* por espectrometria de massas

O perfil espectrométrico dos constituintes majoritários das extrações apresentou os picos 319, 337 e 386 m/z como os mais intensos nos métodos utilizados (figura 31).

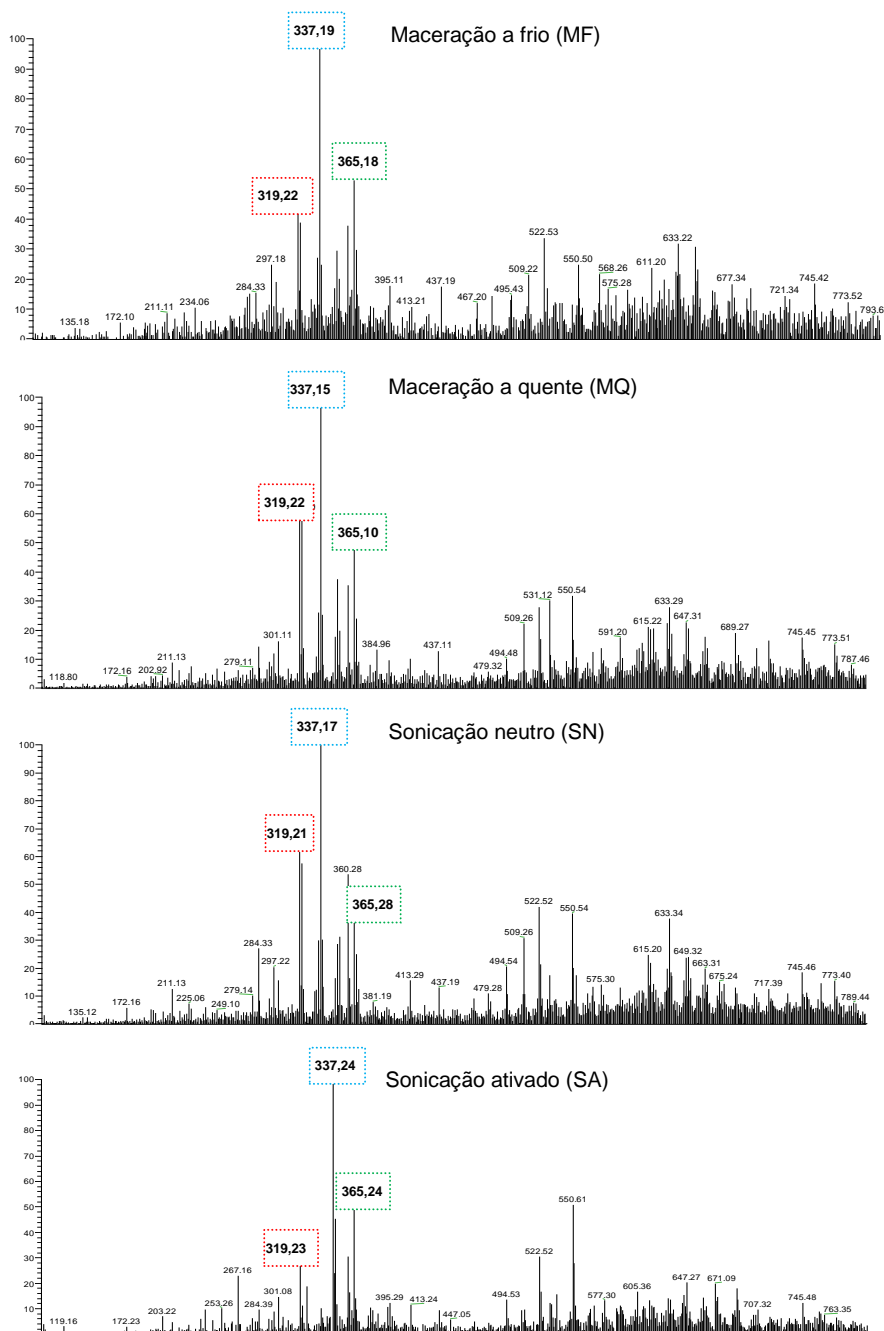


Figura 31: Espectro do perfil das extrações de *E. precatória* por espectrometria de massas.

Observou-se que o perfil das extrações foi semelhante, apresentando picos característicos de substâncias fenólicas, tais como m/z 284, 297, 301 e 319 (tabela 28).

Verificou-se a diminuição dos picos com maiores massas m/z 633, 615 e 509 na metodologia SA, acontecimento que foi encontrado constantemente nas metodologias ácidas descritas nesse trabalho. Em SN, houve uma intensidade maior no pico 360 m/z em comparação com as outras metodologias. As macerações (MF e MQ) apresentaram picos com intensidades equivalentes.

Tabela 28: Percentual da intensidade dos picos majoritários das extrações de *E. precatoria* por espectrometria de massas.

Métodos	Modo positivo de ionização						Modo negativo de ionização		
	284	301	319	337	360	365	255	313	325
MF	16	20	42	100	<b>38</b>	<b>50</b>	20	12	5
MQ	14	18	58	100	<b>38</b>	<b>50</b>	12	14	10
SO	30	20	65	100	<b>68</b>	<b>40</b>	20	10	6
SA	2	16	<b>30</b>	100	38	<b>50</b>	14	12	12

Detectou-se picos com m/z 319 no modo positivo correspondente ao ácido fenólico cauranóico no modo negativo, m/z 227, 255 e 311 análogo a massa de resveratrol, ácido piscídico e caftárico. Ácidos fenólicos são comumente descritos como substâncias detectadas na polpa de *E. precatoria*.

Os picos de m/z 567 correspondente a antocianina cianidina-3-rutinosídeo que caracteriza a polpa de açaí foi detectada, porém em uma intensidade mediana, enquanto o pico m/z 465, equivalente a cianidina-3-glicosídeo não foi visualizada. Os outros picos característicos de substâncias flavonoídicas foram m/z 301 e 311 (figura 32).

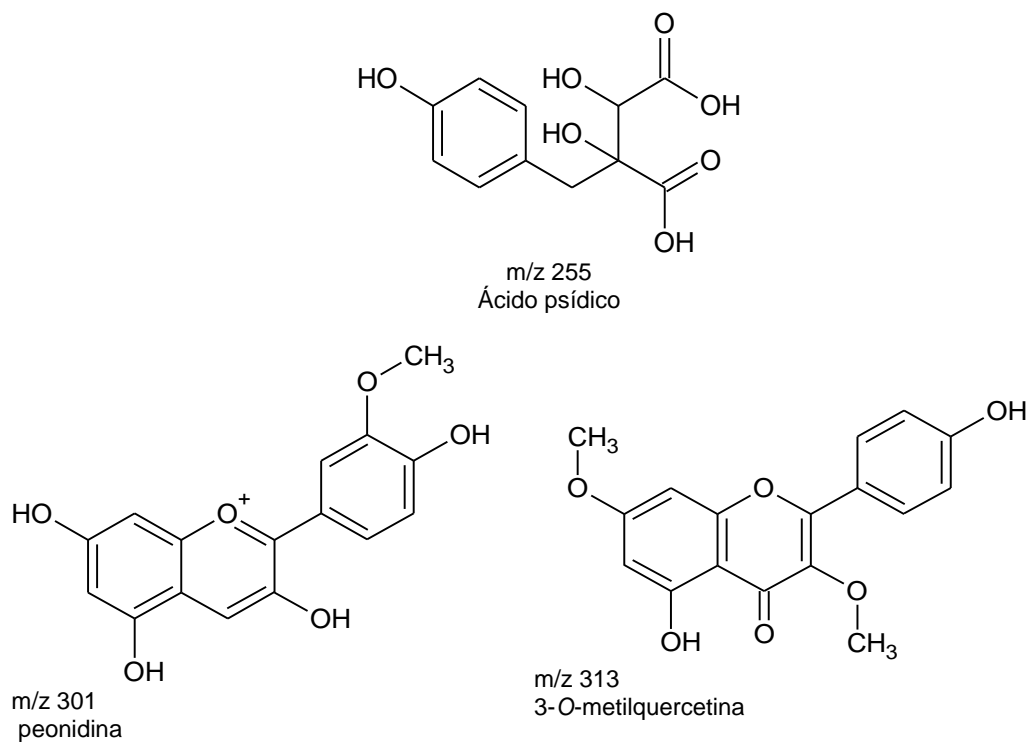


Figura 32: Estrutura das substâncias com massas características de picos detectados nas extrações de *E. precatória*



### 5.10.4 Perfil das extrações de *E. oleracea* por espectrometria de massas

As extrações em *E. oleracea* apresentaram como pico majoritário em todos os métodos ( $m/z$  360). Os outros picos observados com abundância relativa foram 213, 301 e 625  $m/z$  (figura 33).

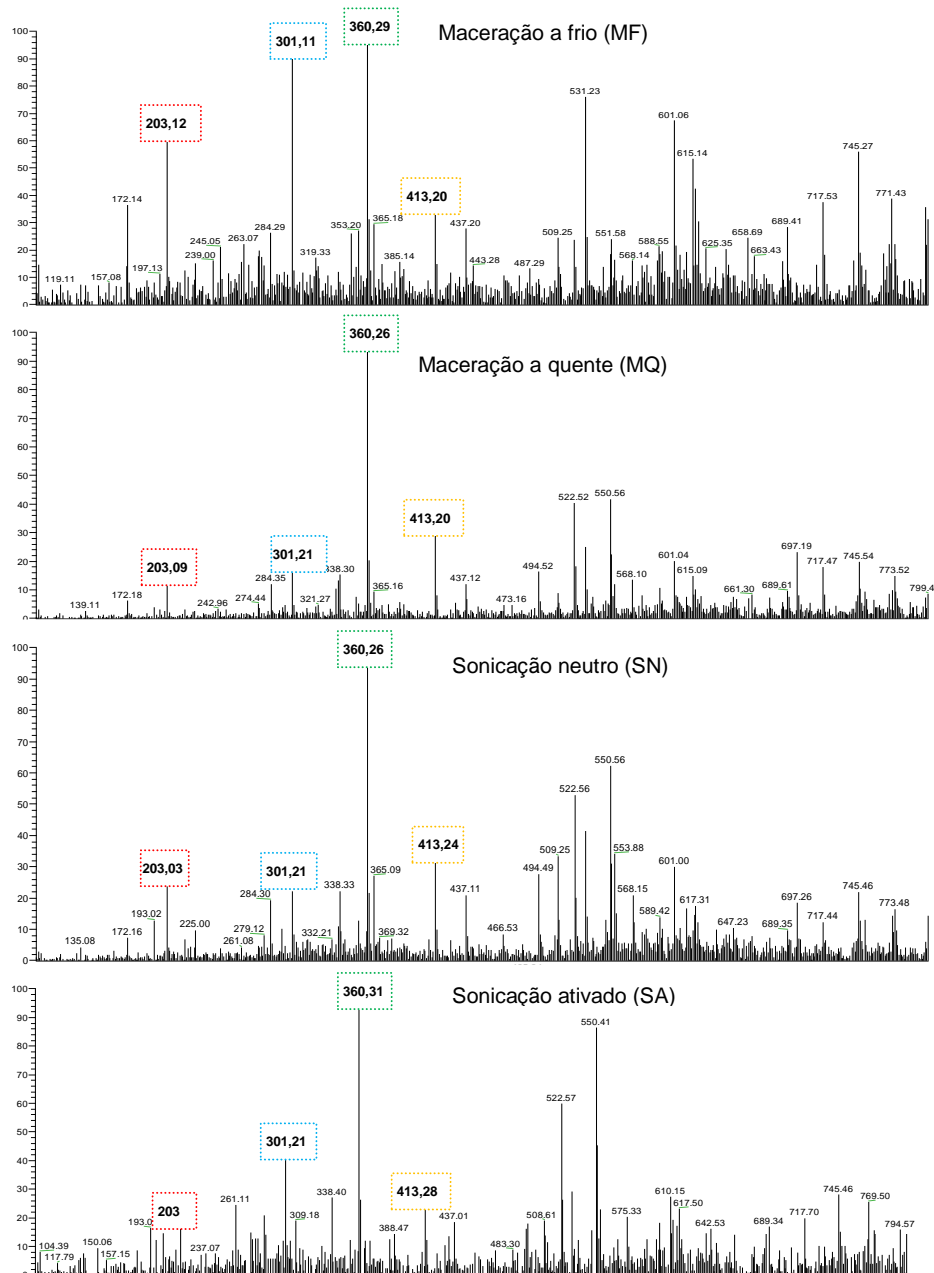


Figura 33: Espectros do perfil das extrações de *E. oleracea* por espectrometria de massas.

Embora o perfil das extrações seja semelhante, a maceração a frio apresentou maior intensidade nos picos m/z 203 e 301 e uma intensidade inferior no pico m/z 550 em relação aos outros três métodos. A intensidade dos picos majoritários é apresentada na tabela 29. Outros picos com maiores intensidades foram detectados na MF e tal fato pode explicar o fato dessa metodologia apresentar os maior rendimento entre os extratos etanólicos.

Tabela 29: Percentual dos picos majoritários das extrações de *E. oleracea* por espectrometria de massas.

métodos	modo positivo de ionização						modo negativo de ionização		
	203	301	360	413	531	550	311	325	339
MF	66	94	100	38	<b>80</b>	<b>28</b>	16	27	20
MQ	18	20	100	32	<b>24</b>	<b>48</b>	10	16	13
SO	25	24	100	32	<b>40</b>	<b>62</b>	10	8	6
SA	16	44	100	26	30	<b>89</b>	10	12	8

O perfil do extrato das sementes de *E. precatória* e *E. oleracea* também apresentaram similaridades, assim como descrito por Pacheco-Palencia *et al.* (2009) em que constituintes foram detectados em ambas as polpas. Nesse trabalho os picos similares foram m/z 203, 338, 360, 522 no modo positivo e 311 e 339 no modo negativo.

A polpa de *E. oleracea* é caracterizada quimicamente por apresentar flavonoides, porém nas sementes, esta classe não foi preponderante na quantificação espectrofotométrica. Os picos das substâncias comumente majoritárias na polpa não foram detectadas com elevada intensidade (m/z 567 e 654). Os flavonoides com massas correspondentes foram m/z 301 e 227, correspondentes a peonidina e resveratrol. No entanto, muitos picos com massas correspondentes aos ácidos fenólicos foram detectados com elevada intensidade, destacando m/z 338, 255, 311 e 353 equivalentes aos ácidos cumaroilquinico, ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico, caftárico e clorogênico, respectivamente.

### 5.11 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR DESI-EM EM HPTLC.

A caracterização química das sementes de açaí foi realizada por espectrometria de massas utilizando ionização por dessorção de spray de elétrons (DESI-EM) em cromatografia em camada delgada de alta eficiência eluída em duas dimensões. A imagem óptica UV após a primeira eluição e a segunda dimensão pode ser visto na figura 34. A segunda dimensão é utilizada para tentar melhorar a separação de compostos que após a primeira eluição não apresentou um bom resultado.

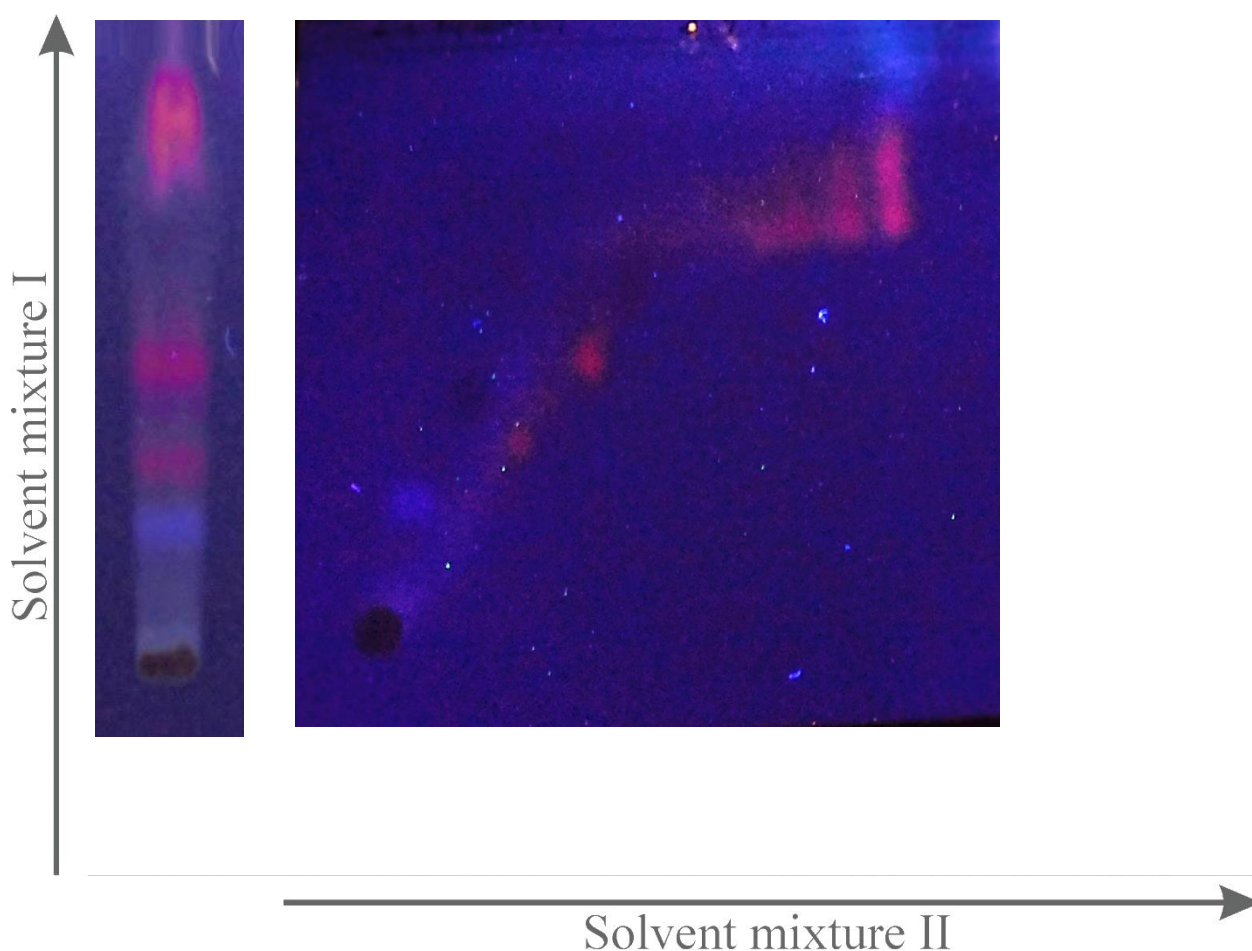


Figura 34. Imagem óptica em em HPTLC-UV de compostos de extrato de *E. precatoria* 100 mg/mL. (A) Imagem após a eluição com a mistura de solvente I para cima. (B) Imagem após a eluição utilizando a mistura de solventes I para cima seguido de eluição usando mistura de solventes II para a direita. Mistura solvente I foi benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (6: 3: 1) e o solvente II foi mistura de benzeno: clorofórmio: ácido fórmico (3: 6: 1).

A imagem óptica em HPTLC-2D permitiu verificar a existência manchas características de substâncias, onde na primeira eluição parecia ser apenas um composto. Após a imagem no UV (parte B na figura 34), na segunda dimensão foi confirmada a presença de mais do que um composto da região acima do HPTLC. Assim, a utilização da segunda dimensão aumentou a separação dos compostos.

Após a análise cromatográfica, foi realizado a análise espectrométrica com DESI-EM, afim de obter informações químicas sobre a razão massa/carga dos íons. A Figura 35 mostra a posição de cada massa/carga detectada com diferença suficiente para formar uma imagem após a separação 2D em HPTLC nos modos positivo (A) e negativo (B).

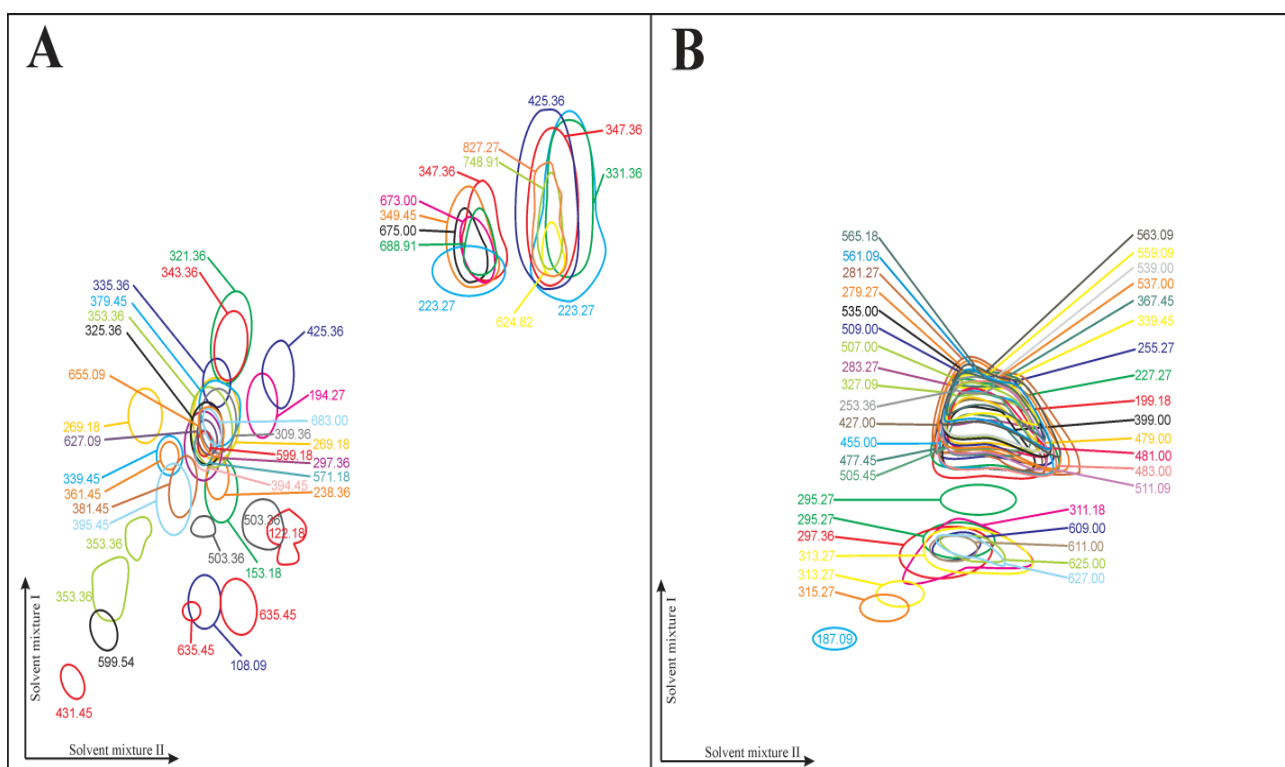


Figura 35. Ilustração da localização dos íons detectados por DESI-MS da placa de HPTLC 2D. (A) modo positivo. (B) Modo negativo. Mistura solvente I foi benzeno: acetato de etilo: ácido fórmico (6: 3: 1) e o solvente foi mixture II benzeno: clorofórmio: ácido fórmico (3: 6: 1).

Depois da eluição da segunda dimensão na HPTLC, foi adquirida dados espectros de varrimento total depois, o que permitiu a observação de vários íons com distribuição diferente ao longo da placa cromatográfica. Por meio das análises espectrométricas foi possível detectar 69 íons, ilustrados a figura 36.

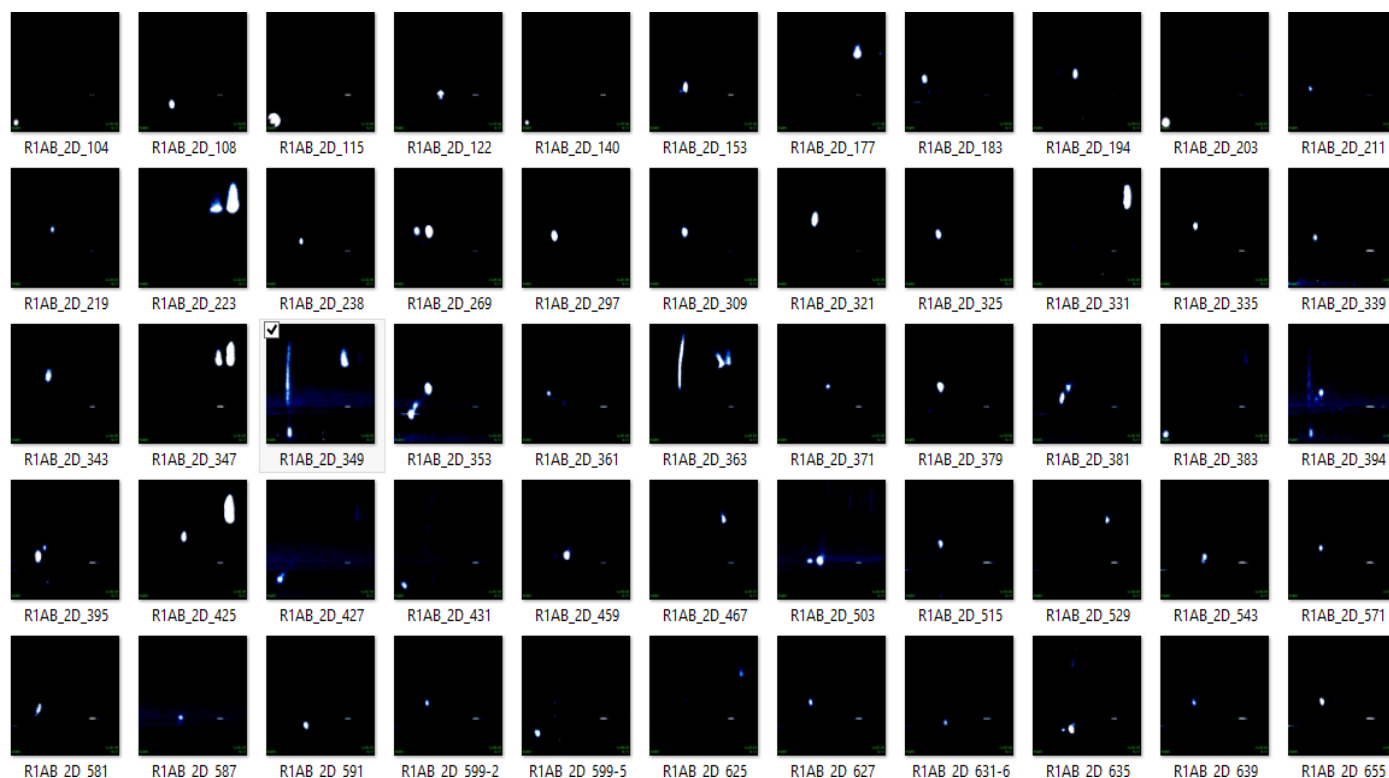


Figura 36. Íons detectados por DESI-EM de *E. precatória*.

A elucidação dos componentes está em andamento, mas algumas substâncias fenólicas comumente encontradas em frutos amazônicos e já descritas na polpa deste fruto puderam ser detectadas. Alguns íons característicos dessas substâncias estão inseridas na tabela a seguir:

Tabela 30: Sugestão das substâncias presentes em *Euterpe precatoria* por espectrometria de massas (DESI-EM).

íon	MS/MS	sugestões	Referência
179	161, 135	Ácido cafeico	
187	169, 125	Ácido 2-hidroxitерpenílico	Claeys <i>et al.</i> , 2009
191	173, 127, 93, 85	ácido quinico	Bastos <i>et al.</i> , 2007
193	134	ácido ferúlico	
199	171, 124, 155	Ácido graxo	Ryhage and Stenhagen, 1960
203	185, 157, 141	flavonoide aglicona	
227	199, 183, 155	flavonoide aglicona	Kang <i>et al.</i> , 2007
253	225, 209, 179, 165	Crisina	Fabre <i>et al.</i> , 2001
256	228, 224, 212, 171	isoflavona	Kang <i>et al.</i> , 2007
263	137, 119	Ácido cumarico	
271	253, 225, 209	Crisina	Fabre <i>et al.</i> , 2001
279	235, 243, 217, 205	Derivado de ácido cafeico	Wu <i>et al.</i> , 2009
281	263, 237, 219, 193	Ácido oleico	Rincón <i>et al.</i> , 2012
295	251, 183, 171, 155	isoflavona	Kang <i>et al.</i> , 2007
299	253, 281, 237	crisoeirol	
311	293, 275, 179, 197, 183, 171, 201	Ácido caftarico	
315	279, 171	isorhamnetina, petunidina	
329	311, 293, 201, 171	Ácido graxo	
339	321, 277, 183	Ácido graxo	
423	405, 379, 361, 295	Flavonoide glicosinado	
477	459, 433, 415, 295	Petunidina Hexose	
555	299, 255, 225, 165	Derivado de luteonina	Pereira <i>et al.</i> , 2012
509	281, 491, 465	Ácido graxo – dímero	
511	283, 493, 311	Ácido graxo – dímero	
535	491, 517, 445, 279, 255	antocianina	Schutz, 2006
609	391, 313, 311, 297	Dímero de catequina	
610	566, 592, 311, 297	Ácido graxo – dímero	



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aproveitamento de resíduos é uma necessidade antiga, principalmente nos grandes centros e em empresas com grande volume de produção. Na Amazônia esses materiais vegetais não recebem praticamente nenhum tratamento antes de serem jogados nos rios. As inovações desta tese buscaram abordagem para o aproveitamento dessas matérias primas. Os resíduos de extrativismo vegetal, seja ele realizado em pequenas comunidades ou em empresas que comercializam para o mercado internacional, provocam um problema ambiental sério, que vem causando mortandade de peixes e acúmulo de substâncias tóxicas no ambiente. Encontrar uma destinação adequada para estes resíduos que não seja agressivo ao meio ambiente é uma meta que pode ser alcançada através dos estudos químicos, biológicos e farmacológicos. Por meio dos resultados obtidos neste trabalho foi possível obter uma caracterização das cascas e sementes de frutas amazônicas consideradas resíduos das indústrias de fruticultura e a partir dos dados analisados neste trabalho, conclui-se que:

- As cascas e sementes de frutos amazônicos apresentaram elevada quantidade de fenólicos e flavonoides totais, substâncias que são consideradas bioativas, podendo tornar-se matéria prima na indústria.
- Os extratos de cascas de uxi e tucumã e as sementes de acerola, bacurizinho e carambola apresentaram a maior capacidade de inibição enzimática com boa correlação entre as enzimas  $\alpha$ -amilase, lipase e glicosidase;
- As espécies que apresentaram maiores percentuais de fenólicos totais foram: casca de piquiá, sementes de açaí, casca de bacuri, casca da semente de castanha do Brasil e casca de ingá, tanto nos extratos etanólicos, quanto hidroalcoólicos.



- Os extratos com maior potencial fotoprotetor foram piquiá (casca e polpa), com picos de absorção de 298nm (2,822) e 297nm (2,747), respectivamente e a semente de bacurizinho, com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 325 (1,250).
- Na otimização da extração de substâncias fenólicas, o tipo de solvente e o método de extração afetaram de forma significativa os percentuais de rendimento, fenólicos e flavonoides obtidos nas extrações;
- As condições de extração mais adequadas para bacuri (mesocarpo) e açai (Pará e Amazonas), com melhores percentuais de substâncias fenólicas e atividade antioxidante, foram utilizando o método maceração combinado com o solvente etanol 100%.
- O perfil dos extratos brutos obtido por espectrometria de massas das espécies de *E. precatória* e *E. oleracea* apresentaram picos similares. Os íons de m/z 203, 338, 360, 522 e outros picos característicos de ácidos fenólicos foram observados em todas as extrações. O perfil dos extratos de bacuri apresentaram picos característicos de substâncias flavonoidicas, confirmando os resultados espectrofotométricos, com picos m/z 603 e 625.
- Os extratos de cascas de bacuri foram estudados pela primeira vez quanto à composição química e ao potencial fotoprotetor e antioxidante em células e apresentou resultados promissores que estimulam a continuação de estudos mais aprofundados.
- Pela primeira vez é relatado a composição química das sementes de *E. precatória* e a caracterização apresentou fenólicos destacando a presença de procianidinas, flavonoides e fenólicos como crisoeirol, ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido cumárico.

- Nos extratos de piquiá foram detectados os ácidos elágico e gálico como os constituintes majoritários e os extratos apresentaram uma elevada capacidade antioxidante, tanto em testes *in vitro* quanto em células, potencial antiinflamatório e baixa citotoxicidade em células normais.
- Este estudo abre perspectivas para que novas investigações envolvendo frutos amazônicos sejam realizados, notadamente em relação à composição química proveniente de diferentes partes do fruto e no estabelecimento das suas propriedades biológicas.



## 7. REFERENCIAS

Adhikari, A.; Devotka, H.P.; Takano, K.; Nakane, T.; Basnet, P.; Skalko-Basnet, N.; Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation: in vitro tyrosinase inhibition. *International Journal of Cosmetic Science*, Vol.30, Pp.353-360, 2008.

Almeida S.; Amaral, D.D.; Silva, A. S. L.; Análise florística e estrutura de florestas de várzea no estuário amazônico. *Acta amazônica*, Vol. 34, Pp.513-24, 2004.

Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M.; Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, Vol.33, No. 10, Pp. 2202-2210, 2010.

Alves, S.M.; Jennings, W.G.; Volatiles composition of certain Amazonian fruits. *Food Chemistry*, Vol.4, pp.149-159, 1979.

Andrade-Cetto, A.; Martínez-Zurita, E.; Soto-Constantino, A.; Revilla-Monsalve, M. C.; Wiedenfeld, H.; Chronic hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on n5-streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.116, Pp.358, 2008.

Anselmo, A. A. S.; Resíduos de frutos amazônicos como ingredientes alternativos em rações extrusadas para juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

ANVISA, RESOLUÇÃO - RDC Nº 29, DE 1º DE JUNHO DE 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> em 15 de julho de 2013.

Anwar, F.; Kalsoom, U.; Sultana, B.; Mushtaq, M.; Mehmood, T.; Arshad, H.A.; Effect of drying method and extraction solvent on the total phenolics and antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) extracts. *International Food Research Journal*, vol. 20, No.2, Pp.653-659, 2013.

Ascari, J.; Takahashi, J. A.; Boaventura, M.A.A.; The Phytochemistry and Biological Aspects of Caryocaraceae Family. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Vol. 15, No. 2, Pp. 293-308, 2013.

Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Cipak, A.; Duburs, G.; Horáková, L.; Luczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A. D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; Stefek, M.; Strosová, M.; Tirzitis, G.; Venskutonis, P.R.; Viskupicova, J.; Vranka, P. S.; Zarkovic, N.; Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radical Research*, v. 44, p.1216-1262, 2010.

Balogh, T. S.; Pedriali, C. A.; Baby, A. R.; Velasco, M. V. R.; Kaneko, T. M.; Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. Vol. 84, No. 4, Pp. 732-742, 2011.

Barbosa, H. R.; Torres, B. B.; *Microbiologia básica*. 3 edição, São Paulo, Atheneu, 2005.

Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, Vol. 29, No.1, Pp. 113-123, 2006.

Barreto, G. P. M.; Benassi, M. T.; Mercadante, A. Z., Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal Brazilian Chemical Society*, vol.20, pp. 1856-1861, 2009.

Barros, L. Calhelha, R. C.; Queiroz, M. J. R. P.; Santos-Buelga, C.; Santos, E. A; Regis, W. C. B.; Ferreira, I. C. R. F.; The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*. Vol. 76, Pp. 318-322, 2015.

Batista, J.S.; Silva, A.E.; Rodrigues, C.M.F.; Costa, K.M.F.M.; Oliveira, A.F.; Paiva, E.S.; Nunes, F.V.A.; Olinda, R.G.; Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arquivos do Instituto Biológico* , Vol.77, No.3, pp.441-447, 2010.

Baublis, A., Decker, E.A. and Clydesdale, F.M., "Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals," *Food Chemistry*, Vol.68, No.1, Pp.1-6, 2000.

Belo, S. D.; Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Gingko biloba*. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

Berto, A.; Ribeiro, A. B; Souza, N. E.; Fernandes, E.; Chiste, R. C.; Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. *Food Research International*. Vol.77, Pp.236-243, 2015.

Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G.; Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, Vol. 12. No. 02, Pp. 123-130, 1999

Bittencourt, L. S.; Efeito de Paullinia cupana (Mart.) no estresse oxidativo induzido pelo nitroprussiato de sódio em células de fibroblastos embrionários NIH-3T3. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.

Bobbio, F.O., Druzian, J.I., Abrão, P.A., Bobbio, P.A., Fadelli, S.; Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açázeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Ciências e Tecnologia de Alimentos, Vol.20, Pp.388–390, 2000.

Bobin, M. F.; Raymond, M.; Martini, M. C.; Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais. Cosmetics and toiletries. Vol. 7, pp. 44-50, 1995.

Boissy, R.E.; Manga, P.; On the etiology of contact/occupational vitiligo. Pigment Cell Research. Vol. 17, Pp. 208–214, 2004.

Bordignon Jr, C. L.; Francescato, V.; Nienow, A. A.; Calvete, E.; Reginatto, F. H.; Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Vol. 29, No.1, Pp. 183-188, 2009.

Bruice, P. Y.; Química Orgânica, Vol. 01, 4ª edição, Pearson Prentice Hall, 2006.

Buratto, A. P.; Carpes, S. T.; Vecchia, P. D.; Loss, E. M. S.; Appelt, P.; Determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana em castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*). Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Vol. 2, No.1, Pp 60-65, 2011.

Calixto, J.B.; Medicamentos fitoterápicos. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, Pp. 297-315, 2001.

Campos, J. S.; Frasson, A. P. Z.; Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de Lafoensia pacari A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. Vol. 32, No.3, Pp. 363-368, 2011

Canuto, G. A. B.; Xavier, A. A. O.; Neves, L. C.; Benassi, M. T.; Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. Revista Brasileira de Fruticultura. Vol. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

Cavalcante, P.B. Edible fruits of Amazonia. 6.ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi: CEJUP: CNPq. 279 pp., 1996.

Cerqueira, F. M.; Medeiros, M. H. G.; Augusto, O.; Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Química Nova, Vol. 30, No.2, Pp. 441-449, 2007.

Cerqueira, T. S.; Recobrimentos comestíveis em goiabas cv. "Kumagai". Piracicaba, 2007. 70 p. Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), 70p., 2007.

Champe, P. C.; Ferrier, D. R.; Harvey, R. A.; Bioquímica Ilustrada. 3a. edição, ArtMed, 533p., 2005.

Chan, E. W. C.; Lim, Y. Y.; Wong, L. F.; Lianto, F. S.; Wong, S. K.; Lim, K. K.; Joe, C. E.; Lim, T. Y.; Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. Food Chemistry, Vol.109, Pp. 477-483, 2008.

Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern, J.C.; Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 10, No. 3, Pp. 178-182, 2002.

Chang, Te-Sheng.; An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 10, Pp. 2440-2475, 2009.

Chen, H. J.; Inbaraj, B. S.; Chen, B. H.; Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 13, Pp. 260-285, 2012.

Chin, Y.; Chai, H. B.; Keller, W. J.; Kinghorn, A. D.; Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (açai) with antioxidant and cytoprotective activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, p.7759-64, 2008.

Chisté R. C.; Freitas, M.; Mercadante, A. Z.; Fernandes, E.; The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. Food Chemistry, Vol.135, pp. 1740-1749, 2012.

Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z.; Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 60, pp.5884-5892, 2012.

Chitarra, A.; Chitarra, M.I.F.; Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras:ESAL/FAEPE, 2005

Cole, R. B. Em Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications; Cole, R.B., ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997, p. 12.

Cooks, R. G.; Ouyang Z.; Takáts, Z.; Wiseman, J. M., Ambient mass spectrometry. *Science*, vol. 311, Pp. 1566-1570, 2006.

Correia, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. Tese-Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2004.

Costa Júnior, J.S.; Feitosa, C. M.; Citó, A.M.G.L.; Freitas, R.M.; Henriques, J.A.P.; Saffi, J.; Evaluation of effects of ethanolic extract (EE) from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. *Journal of biological science*, Vol. 10, pp.747-753, 2010.

Costa, A. G. V.; Garcia-Diaz, D. F.; Jimenez, P.; Silva, P. I.; Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *Journal of Functional Foods*, Vol.5, Pp. 539-549, 2013.

Couto, M. A. L. & Canniatti-Brazaca, S. G.; Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 30 (Supl.1), p. 15-19, 2010.

Cunha, A. P.; Salgueiro, L.; Roque, O. R.; *Farmacognosia e fitoquímica*, Capítulo 22, 1º edição, Fundação Calouste Gulenkian, 2005.

Dadkhah, A.; Fatemi, F.; Kazemnejad, S.; Rasmi, Y.; Ashrafi-Helan, J.; Allameh, A. Differential effects of acetaminophen on enzymatic and non-enzymatic antioxidant factors and plasma total antioxidant capacity in developing and adult rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 281, nº 1-2, p. 145–152, 2006.

Dal`Belo SE. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de Chá Verde e Ginkgo Biloba. Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2008.

Deachathai, S.; Mahabusarakam, W.; Phongpaichit, S.; Taylor, W.C. Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry*, Vol. 66, Pp. 2368–2375, 2005.

Del Pozo-Isfran, D., S. Percival and S. Talcott.. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, No.4, Pp.1222-1229, 2006.



Del Pozo-Isfran, D.; Brenes, C. H.; Talcott, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, Pp. 1539-1545, 2004.

Demajorivic, J.; Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. *Revista de Administração de empresas*, São Paulo, Vol. 35, No.3, pp.88-93, 1995.

Deus, R.J.A.; Alves, C.N.; Arruda, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Vol.13, Pp.1-7, 2011.

Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 2nd ed. England: John Wiley & Sons Ltd., 2002.

Dornas, W.C.; Oliveira, T.T.; Rodrigues-das-Dores, R.G.; Santos, A.F.; Nagem, T.J.; Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. Vol.. 28, No.3, Pp. 241- 249, 2007.

El-Safory, N. S.; Fazary, A. E.; Lee-Kang, L.; Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 81, No.2, 2010.

Ewing, J.F.; Janero, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*, v. 232, nº 2, p. 243–248, 1995.

Favacho, H. A. S.; Oliveira, B. R.; Santos, K. C.; Medeiros, B. J. L.; Sousa, P. J. C.; Perazzo, J. C. T.; Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. Vol. 21, No.1, Pp. 105-114, 2011.

Ferrari, M.; Oliveira, M. S. C.; Nakano, A. K.; Rocha-Filho, P. A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 17, Pp. 626 – 630, 2007.

Fietz, V. R.; Salgado, J. M.; Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol.19, No. 3, Pp. 318-321, 1999.

Flor, J.; Davolos, M. R.; Correa, M. A.; Protetores solares. *Química Nova*, Vol. 30, No. 1, Pp.153-158, 2007.

Fragoso, M. F.; Romualdo, G. R.; Ribeiro, D. A.; Barbisan, L. F.; Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 58, Pp.68–76, 2013.

Gabites, J. R.; Abrahamson, J.; Winchester, J. A.; Air flow patterns in an industrial milk powder spray dryer, *Chemical Engineering Research and Design*, Vol. 88, Pp. 899-910, 2010.

Galotta, A. L. Q. A. ; Boaventura, A. M. D. . Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., *Arecaceae*). *Química Nova*, Vol. 28, No.04, p. 610-613, 2005.

Galotta, A. L. Q. A. ; Boaventura, A. M. D. ; Lima, L. A. R. S. . Antioxidant and cytotoxic activities of 'açaí'(*Euterpe precatoria* Mart.). *Química Nova*, Vol. 31, p. 00-01, 2008.

Garcia-sales, P.; Morales-Soto, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, Vol. 15, Pp. 8813-8826, 2010.

Geissman, T. A.; Crout, D. H. G.; Organic chemistry of secondary plant metabolism. San Francisco: Freeman, Cooper, Pp 92-181, 1969.

Gillam, A. E., Stern, E. S. An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy, 2nd ed., Edward Arnold: London, 1957.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. L; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, Vol. 30, No. 2, Pp. 374-381, 2007.

Gonçalves, A. E. S. S.; Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. Mestrado em Ciências dos Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

González S.; Fernández-lorente, M.; Gilaberte-Calzada, Y.; The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*, Vol. 26, Pp. 614-626, 2008.

Grimes, P. E.; The safety and efficacy of salicylic acid chemical peels in darker racial ethnic groups. *Dermatologic Surgery*, New York, Vol. 25, Pp. 18-22, 1999.

Guaratini, T.; Callejon, D. R.; Pires, D. C.; Lopes, J. N. C.; Lima, I. M.; Giannella Neto, D.; Sustovich, C.; Lopes, N. P.; Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. *Química Nova*, Vol. 32, No. 3, 717-721, 2009.

Guaratini, T.; Medeiros, M. H. G.; Colepicolo, P.; antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, Vol. 30, No. 01, Pp. 206-213, 2007

Halliwel, B.; *Antioxidants in Human Health and Disease. Annual Review of Nutrition* Vol. 16, Pp. 33-50, 1996.

Halliwel, B.; Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, Vol.52, No.8, Pp.253-265, 1994.

Halliwel, B.; The antioxidant paradox, *The Lancet*, Vol.355, No. 01, Pp. 1179 - 1180, 2000.

Ham, B. M. *Even Electron Mass Spectrometry with Biomolecule Applications*. New Jersey – USA. John Wiley & Sons, 2008. 421p.

Hassimotto, N.M.A.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M.; Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.53, No.8, Pp.2928-35, 2005.

Heinrich, U.; Carolyn, E.; Silke, H.; Hagen, T.; Wilhelm, S.; Green tea polyphenols provide photoprotection, increase microcirculation and modulate skin properties of women. *The Journal of Nutrition*, Vol.141, Pp. 1202–1208, 2011.

Hirata, L. L.; Sato, M. E. O.; Santos, C. A. M.; Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farm. Bonaerense*. Vol. 23, No. 3, Pp. 418-24, 2004.

Hogan, S.; Chung, H.; Zhang, L.; Li, J.; Lee, Y.; Dai, Y.; Zhou, K.; Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, Vol. 118, Pp.208-14, 2010.

Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Screening of some plants used in the 60 Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

Huang, D.; Ou B.; Prior, R. I. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, p.1981-1856, 2005.

Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L.; *Inorganic Chemistry: principles of structure and reactivity*, 5th ed., Harper Collins College: New York, 1993.

Hynes, W. L.; Walton, S. L.; "Hyaluronidase of Gram-positive Bacteria"; *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 183, Pp. 201-207, 2000.

Iha, S. M.; Migliato, K. F.; Velloso, J. C. R.; Sacramento, L. V. S.; Pietro, R. C. L. R.; Isaac, V. L. B.; Brunetti, I. L.; Corrêa, M. A.; Salgado, H. R. N.; Estudo

fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista brasileira de farmacognosia*, Vol.18, No.3, Pp. 387-393, 2008.

Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Veiga-Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V.; Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 55, pp. 2994-3001, 2012.

Jimenez, P. C.; Fortier, S. C.; Lotufo, T. M. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O. Costa-Lotufo, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol..287, Pp.93-101. 2003.

Jobim, M. L.; Santos, R. C. V.; Alves, C. F. S. *et al.*; Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiological Research*, 2013.

Kabara, J. J.; Orth, D. S.; *Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: principles and practices*, 1ª edição, Marcel Dekker, 274p, 1997.

Kang, J., Thakali, K. M., Xie, C., Kondo, M., Tong, Y., Ou, B., Jensen, G., Medina, M. B., Schauss, A. G., & Wu, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*, Vol.133, Pp.671–677, 2012.

Kang, J.; Xie, C.; Li, Z.; Shanmugam, N.; Schauss, A. G.; Wu, T.; Wu, X.; Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, Vol.128, Pp. 152-157, 2011.

Kede MPV, Sabatovich O. *Dermatologia estética*. São Paulo: Atheneu; 771p. 2004.

Khonkarn, R.; Okonogi, S.; Ampasavate, C.; Anuchapreeda, S.; Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 48, Pp.2122–2129, 2010.

Kligman, A. The future of cosmeceuticals: an interview with Albert Kligman, MD, PhD. Interview by Zoe Diana Draelos, *Dermatology Surgery*, Vol. 31, Pp. 890–891, 2005.

Koolen, H. F.; Silva, F. M. A.; Gozzo, F. C.; Souza, A. Q. L.; Souza, A. D. L.; Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from

buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS, Food Research International, Vol. 51, No. 2, Pp. 467-473, 2013.

Kuskoski, E.M., Asuero, A. G.; Morales, M. T.; Fett, R.; Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, Vol.36, No.4, Pp.1283-1287, 2006.

Kwon, Y. I.; Apostolidis, E.; Shetty, K.; In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*. Vol. 99, No.8, Pp. 2981–2988, 2008.

Kwon, Y.I.; Vatter, D. A.; Shetty, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 15, Pp. 107-118, 2006.

Langrish, T. A. G.; Premarajah, R.; Antioxidant capacity of spray-dried plant extracts: Experiments and simulations, *Advanced Powder Technology*, Vol. 24, Pp.771–779, 2013.

Leandro, L. M.; Vargas, F. S.; Barbosa, P. C. S.; Neves, J. K. O.; Silva, J. A.; Veiga-Junior, V. F.; Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*, Vol. 17, No. 4, Pp. 3866-3889, 2012.

Leandro, L. M.; Vargas, F. S.; Barbosa, P. C. S.; Neves, J. K. O.; Silva, J. A.; Veiga-Junior, V. F.; Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules*, Vol. 17, Pp. 3866-3889, 2012.

Lee Y. P.; Chung, G. H.; Rhee, J. S.; Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK WI lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1169, Pp. 156–164, 1993.

Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E.; Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal AOAC International*. Vol. 88, No. 5, Pp. 1269-1278, 2005.

Lichtenthäler, R.; Belandrino, R.; Maia, J.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F.; Total antioxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 56, Pp.53-64, 2005.

Lima, M. C.; Bacuri: (*Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae): Agrobiodiversidade. São Luis: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 210p., 2007

Liu, Y.; He, M.; Sun, X.; Peng, K.; Zhao, L.; Alteration of nuclear protein profiling for NIH-3T3 cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Cell Biochemistry & Functional*. Vol.28, No. 7, Pp. 578-584, 2010.

Lobo, A. M.; Lourenço, A. M.; *Biossíntese de produtos naturais*. Lisboa: IST Press., 2007.

Lundov, M. D.; Moesby, L.; Zachariae, C.; Johansen. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*. Vol. 60, No. 2, Pp. 70-78. 2009.

Luzia, D. M. M.; Jorge, N.; Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Vol. 30, No. 2, Pp. 489-493, 2010.

Majhenic, L.; Skerget, M.; Knez, Z.; Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, Vol. 104, Pp.1258–1268. 2007.

Mansur, J. S.; Breder, M. V. R.; Mansur, M. C. A.; Azulay, R. D.; Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Vol.61, pp.167-172, 1986.

Mansur, M. C. P. P. R.; Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia*, 2011.

Marchesan, E. D.; Ferronato, R.; Bednarski, F.; Alencar, S. M.; Onofre, S. B.; Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* d.c. e *Baccharis uncinella* d.c. (asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, Vol.10, No.2, Pp.63-66 , 2006.

Marco, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 45, Pp. 594-598, 1968.

Marinho, B. G.; Herdy, S. A.; Sá, A. C.; Santos, G. B.; Matheus, M. E.; Menezes, F. S.; Fernandes, P. D.; Atividade antinoceptiva de extratos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 12, No. Supl, Pp. 52-53, 2002.

Markhan, K.R.; Ryan, K.G.; Bloor, S.J.; Mitchell, K.A.; An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*. Vol. 48, Pp.791-794, 1998.

Martins, A. M.; Mattoso, L. H. C.; Pessoa, J. D.C.; Comportamento térmico e caracterização morfológica das fibras de mesocarpo e caroço do açaí (*Euterpe oleracea* Mart). Revista Brasileira de Fruticultura, Vol.31, No. 4, pp. 1150-1157, 2009.

Martins, C. R.; Farias, R. M.; Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola – Revisão. Revista da FZVA, Vol.9, No.1, pp. 20-32, 2002.

Masuda, M.; Tejima, T.; Suzuki, T.; Skin Lighteners. Cosmetics & Toiletries, Carol Steam, Vol. 111, Pp. 65-77, 1996

Matheus, M. E.; Mantovani, I. S. B.; Santos, G. B.; Fernandes, S. B. O.; Menezes, F. S.; Fernandes, P. D.; Ação de extratos do açaí sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 13, Pp. 03-05, 2003.

Matousek, J.; Pousková, P.; Hlousková, D.; Zadinová, M.; Sou sek, J.; Kvor, J.; Effect of Hyaluronidase and PEG Chain Conjugation on the Biologic and Antitumor Activity of RNase A; Journal of Controlled Release, Vol. 94, No. 2, Pp. 401-410, 2004.

Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Nascimento, R. J.; Capacidade antioxidante de frutas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol. 44, n.2, p.193-201, 2008

Melo, E.A.; Guerra, N.B.; Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Bol. SBCTA. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002

Mendonça Filho, A. L.; Pereira, M. R.; Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Bioscience Journal. Vol. 28, No. 4, Pp. 598-603, 2012.

Menezes, E.; Deliza, R.; Chan, H. L.; Guinard, J.; Preferences and attitudes towards açaí-based products among North American consumers. Food Research International. Vol.44, Pp. 197-2008, 2011.

Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitão, S. G.; Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH\* free radical method. Phytotherapy Research, Vol. 15, No. 02, Pp. 127-130, 2001.

Menzel, E. J.; Farr, C.; Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Letters*, Vol. 131, No.1, Pp. 3-11, 1998.

Mertens-Talcott, S.U.; Rios, J.; Jilma-Stohlawetz, P.; Pacheco-Palencia, L. A.; Meibohm, B.; Talcott, S.T.; Derendorf, H.; Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.56,Pp.7796-7802, 2008.

Miller, H.E.; A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol.48, Pp.91, 1971.

Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, Vol. 26, No 2, Pp. 211-219, 2004.

Monteiro, E. O.; Baumann, L. S. A ciência do cosmeceutico: cosmético ou droga? *Revista Brasileira de Medicina*. Vol. 65, Pp. 22-25, 2008.

Moraes, M. C.; Lago, CL L., Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Quimica Nova*, Vol. 26, No. 4, Pp. 556-563, 2003.

Morley, N.; Clifford, T.; Salter, L.; Campbel, S.; Gould, D.; Curnow, A.; The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, Vol. 21, Pp. 15-22, 2005.

Morton, L.W.; Abu-Amsha, C. R.; Puddey, I. B.; Croft, K. D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Vol. 27, Pp. 152–159, 2000.

Mourão, K. S.M.; Beltrati, C.M.; Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart (Clusiaceae). II. Morfo-anatomia dos frutos e sementes maduros. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 35, No. ½, pp. 33-46, 1996.

Muñiz-Miret, N.; Vamos, R.; Hiraoka, M.; Montagnini, F.; Medelsohn, R. O. The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the flood plains of the Amazon estuary, Para, Brazil. *Forest Ecology Manage*, Vol. 87, Pp. 163-173, 1996.



Naczki, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 41, Pp. 1523-1542, 2006.

Naczki, M.; Shahidi, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1054, Pp. 95-11, 2004.

Nakayama, G.R.; Caton, M.C.; Nova, M.P.; Parandoosh, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Methods* 1997, 204, 205–208.

Nascimento, W. M. O.; Carvalho, J. E. U.; Muler, C. H.; Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. *Revista Brasileira de fruticultura*, vol. 29, No.3, pp. 657-660, 2007.

Negri, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Vol.41, Pp.121-42, 2005.

Noratto, G. D.; Angel-Morales, G.; Talcott, S. T.; Mertens-Talcott, S. U.; Polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, Pp.7999–8012, 2011.

Nordberg, J.; Arnér, S.J.; Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 31, Pp.1287-1312, 2001.

Okombi S.; Rival D.; Bonnet S.; Mariotte A. M. ; Perrierb E.; BoumendjeL A.; Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol.16, No. 8, Pp. 2252-2255, 2006.

Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, Vol. 32, No. 3, Pp. 689-702, 2009.

Oliveira, A.C.; Valentim, I.B.; Silva, C.A., Henriques Bechara, E.J.; De Barros, M.P.; Mano, C.M.; Fonseca Goulart, I.O.; Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues, *Food Chemistry*. Vol. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.

Oliveira, F. M. N.; Figueiredo, R. M. F.; Queiroz, A. J. M.; Análise comparativa de polpas de pitanga integral, formulada e em pó. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Vol.8, No.1, Pp.25-33, 2006.

Oliveira, O. W.; Petrovick, P. R.; Secagem por aspensão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 20, No.4, Pp. 641-650, 2010.

Osório, E.; Londono, J.; Bastida, J. Low-Density Lipoprotein (LDL)-Antioxidant Biflavonoids from *Garcinia madruno*. *Molecules*, Vol. 18, Pp. 6092-6100, 2013.

Ostrosky, E. A. ; Mizumoto, M. K. ; Lima, M. E. L. ; Kaneko, T. M. ; Nishikawa, S. O. ; Freitas, B. R.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 18, Pp. 301-307, 2008.

Othman, A.; Ismail, A.; Ghani, N. A.; Adenan, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, Vol. 100, No.4, Pp. 1523-1530, 2007.

Ozturk, M.; Aydogmus-Ozturk, F.; Duru, M.E.; Topçu, G.; Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, Vol. 103, No. 2, Pp. 623–630, 2007.

Pacheco-Palencia, L. A.; Duncan, C. E.; Talcott, S. T.; Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food chemistry*, Vol.115, Pp.1199-1205,2009.

Pacheco-Palencia, L. A.; Hawken, P.; Talcott, S. T.; Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. *Food Research Internatinal*, Vol. 40, Pp.620-628, 2007.

Pacheco-Palencia, L.A.; Mertens-Talcott, S.; Talcott, S.T.; Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.56, No.12, Pp.4631-6, 2008.

Packer, J. F.; Luz, M. M.S.; Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol.17, No.1, Pp. 102-107, 2007.

Palm, M.D.; O`Donoghue, M. N.; Update on photoprotection. *Dermatology and Therapy*. Vol. 20, Pp. 360-376, 2007.

Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Abreu, J. A. S.; Alcici, N. M. F.; Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Food Science and Technology*, Vol. 18, No.3, 1998.

Parker, J. F.; Luz, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 17, No. 1, Pp. 102-107, 2007.

Paula, R. D.G.; Estudo químico do mesocarpo do bacuri. *Anais da Associação Química do Brasil*. Rio de Janeiro, Vol.4, No.3, pp.173-176, 1945.

Paz, M.; Gullon, P.; Barroso, M. F.; Carvalho, A.P.; Domingues, V. F.; Gomes, A. M.; Becker, H.; Longhinotti, E.; Delerue-Matos, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, Vol 172, Pp. 462-468, 2015.

Perez, E.; Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas Curitiba: UFPR. 113p, 2004.

Pieri, F.A.; Silva, V. O.; Souza, C. F.; Costa, J. C. M.; Santos, L. F.; Moreira, M. A. S.; Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Vol.64, No.1, Pp. 241-244, 2012.

Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Pinto, A. F.; Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3ª edição, Ed. Atheneu, São Paulo, 780p, 2010.

Pompeu, D. R.; Silva, E. M.; Rogez, H.; Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology, Vol.100, No. 23, Pp. 6076-6082, 2009.

Rabelo, A.; Frutos nativos da Amazônia: comercialização nas feiras de Manaus-AM. INPA, 2012.

Radewicz, T. A.; Edwards, J. L.; Katula, K. S. Effects of Various Polyphenolics on Hydrogen Peroxide-Induced p53 Activity in NIH3T3 Cells. *Journal of Medicinal Food*., Vol. 13, No. 1, Pp. 123-130, 2010.

Randhir, R.; Shetty, K. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Science Emerging Technology*, Vol. 8, No. 2, Pp. 197-204, 2007.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK; Farmacologia; 5ª edição; Elsevier Ltda, 692p., 2004.

Rates, S, M, K.; Metilxantinas. In In: C. M. O. Simões *et al.* (Eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 34, Florianópolis, 2007.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggent, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; Antioxidant activity applying an improved ABTS+ radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Vol.26, No. 09/10, Pp. 1231–1237, 1998.

Ribeiro, C. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia, Dissertação em Ciências Farmaceuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 70p, 2008.

Ribeiro, C. R.; Antunes, L. M. G.; Aissa, A. F.; Darin, J. D. C.; De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; Bianchi, M. L. P.; Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research*, Vol. 695, Pp.22-28, 2010.

Rizzini, C. T.; Mors, W. R. Botânica econômica brasileira. 2.ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 248p.

Rocha Filho, P. A.; Preservantes. *Cosmetics & Toiletries*, Vol. 6, No. 5, Pp. 26-33, 1994.

Rocha, A. P. M.; Carvalho, L. C. R. M.; Sousa, M. A. V.; Madeira, S. V. F.; Sousa, P. J. C.; Tano, T.; Schini-Kerth, V. B.; Resende, A. C.; Moura, R. S. Endothelium-dependent vasodilatador effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascular Pharmacology*, Vol.46, Pp. 97-104, 2007.

Rockenbach, I.I.; Silva, G. L.; Rodrigues, E.; Kuskoski, E. M.; Fett, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol.28, Pp.238-244, 2008.

Rodrigues, R. B.; Lichtenthäler, R.; Zimmermann, B. F.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F.; Maia, J.G.; Almeida, O.; Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 54, No.12, Pp.4162-4167, 2006.

Rodrigues, S.; Caetano, D. G.; Caetano, C. M.; Espécies frutíferas do centro-sul do Estado de Rondônia, Amazônia brasileira. *Acta Agronomica*. Vol. 56, n.2, 2007.

Roesler, R ; Catharino, R ; Malta, L ; Eberlin, M ; Pastore, G . Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, Vol. 110, Pp. 711-717, 2008.

Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Holanda, R. B.; Souza, C. A. S.; Pastore, G. M.; Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

Rojano, B. A.; Vahos, I. C. Z.; Arbeláez, A. F. A.; Martínez, A. J. M.; Correa, F. B. C.; Carvajal, L. G.; Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de palma naid (Açaí colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* Vol.64, No.2, Pp. 6213-6220, 2011.

Rosso , V. V.; Hillebrand, S.; Montilla, E. C.; Bobbio , F. O.; Winterhalter , P.; Mercadante, A. Z; Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and acai (*Euterpe oleracea* Mar t.) by HPLC-PD A–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol.21, Pp. 291–299, 2008.

Roubach, R. Uso de frutos e sementes de florestas inundadas na alimentação do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier,1818). Dissertação de mestrado do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 79p, 1991.

Rover Júnior, L.; Höehr, N. F.; Vellasco, A. P.; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, Vol. 24, No. 01, Pp. 112-119, 2001.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, Kidlington, Vol. 121, pp. 996-1002, 2010.

Sabbe, S.; Verbeke, W.; Deliza, R.; Matta, V. M.; Van Damme, P.; Consumer liking of fruit juices with different açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) concentrations. *Journal of Food Science*, Vol. 74, Pp. 171–176, 2009.

Saldanha, L. L. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Botucatu, UNDESP, 2013.

Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Kadam, S.S. Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton: CRC Press, 1990. 200p.

Sanchez-Ferrer, A.; Rodriguez-Lopez, J. N.; Garcia-Canovas, F.; Garcia-Carmona, F.; Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1247, Pp. 1-11, 1995

Sánchez-moreno, C.; A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 76, No. 02, Pp. 270-276, 1998.

Sani, I. M.; Iqbal, S.; Chan, K. W.; Ismail, M.; Effect of acid and base catalyzed hydrolysis on the yield of phenolics and antioxidant activity of extracts from germinated brown rice (GBR). *Molecules*, Vol. 17, Pp. 7584-7594, 2012.

Sani, I. M.; Iqbal, S.; Chan, K. W.; Ismail, M.; Effect of acid and base catalyzed hydrolysis on the yield of phenolics and antioxidant activity of extracts from germinated brown rice (GBR). *Molecules*, Vol. 17, Pp. 7584-7594, 2012.

Santos, G.M.; Maia, G.A.; Souza, P. H. M.; Costa J. M. C.; Figueiredo, R.W.; Prado, G. M.; Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Archivos latinoamericanos de nutricion*, Vol.58, No.2, Pp.187-192, 2008.

Sato, M. E. O.; Gomara, F.; Pontarolo, R.; Andreazza, I. F.; Zaroni, M.; Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Vol. 43, No.2, 2007.

Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D., et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açaí). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, Pp. 8598–8603, 2006.

Schimpl, F. C.; Silva, J. F.; Gonçalves, J. F. C.; Mazzafera, P.; Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.150, Pp. 14–31, 2013.

Sena, R.F.; Nunes, M.L.; Utilizations of aro-industrial wastes in the processing of feeds for carniculture. *Revista Brasileira de Saúde e Produção animal*. Vol.7, No.2, pp. 94-102, 2006.

Silva, E. M. Ação inibitória de extratos de plantas do cerrado sobre alfa-amilases com ênfase em *Kielmeyera coriácea*. 2008. 141p. Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Silva, F. R.; Catão, R. M. R.; Antunes, R. M. P.; Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Annona muricata* L. (Annonaceae). Trabalho de Conclusão de Curso na forma de Artigo Científico da Universidade Estadual da Paraíba, 2011, 17f.

Silva, G. C.; Identificação de flavonoides, quantificação de isovitexina e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora in vitro dos extratos metanólico e glicólico de *Passiflora coccinea* 9Aubl.) Dissertação de mestrado da Universidade Estadual de Campinas. 75p. 2012.

Silva, J. A. M.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M. I.; Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) natural food. Revista Brasileira de Biologia. Vol. 60, n.4, p. 599-605, 2000.

Silverio, M.D.O.; Castro, C.F.S.; Miranda, A.R.; Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). Revista Brasileira de Plantas medicinais. Vol.15, No.1, Pp. 59-65, 2013.

Singleton, V. L.; Rossi, J.A. Jr.; Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, Vol.16, Pp. 144-158, 1965.

Siqueira, B. S.; Alves, L. D.; Vasconcelos, P. N.; Damiani, C.; Soares Júnior, M. S.; Pectina extraída de casca de pequi e aplicação em geléia *light* de manga. Revista Brasileira de Fruticultura. Vol.34, No.2, pp.560-567, 2012.

Siqueira, D. S.; Pereira, A. S.; Aquino Neto, F. R. *et al.* Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da amazônia. Química Nova, Vol. 26, No. 5, 633-640, 2003.

Soares Júnior, M. S.; Bassinello, P. Z.; Caliari, M.; Reis, R. C.; Lacerda, D. B. C. L. ; Koakuzu, S. N.; Development and chemical characterization of flour obtained from mesocarpo of "pequizeiro" fruit. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. Vol. 30, No. 4,pp. 949-954, 2010.

Soares Júnior, M. S.; Reis, R. C.; Bassinello, P. Z.; Lacerda, D. B. C.; Koakuzu, S. N.; Caliari, M.; Qualidade de biscoitos formulados com diferentes teores de farinha de casca de pequi. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, Vol. 39, No. 2, pp. 98-104, 2009.

Solomon, A.; Golubowicz, S.; Yablownicz, Z.; Grossman, S.; Bergman, M.; Gottlieb, H. E.; Altman, A.; Kerem, Z.; Flaishman, M. A.; Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 54, No.20. Pp. 7717-7723, 2006.

Sousa, M. S. B.; Vieira, L. M.; Lima, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal Food Technology*, Vol. 14, No. 3, Pp. 202-210, 2011.

Sousa, M. S. B.; Vieira, L. M.; Lima, A.; Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol. 14, No.3, Pp. 202-210, 2011.

Sousa, M. S. B.; Vieira, L. M.; Silva, M. J. M.; Lima, A.; Caracterização nutricional de compostos antioxidantes em resíduos de polpas tropicais. *Ciências e agrotecnologia*, v.35, n.3, pp.554-559, 2011.

Souza, F. P. S.; Campos, G. R.; Packer, J. F.; Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. Vol. 34, No.1, Pp. 69-77, 2013

Souza, I.F. Cadeia de produção de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) no estado de Mato Grosso. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 152 pp.,2006.

Souza, L. M. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. 2009. Tese do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 164p.

Souza, T. M.; Santos, L. E.; Moreira, R. R. D.; Rangel, V. L. B. I.; Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 15, No.1, Pp. 36-38, 2005.

Souza, V. A. B.; Araújo, E. C. E.; Vasconcelos, L. F. L.; Lima, P. S. C.; Variabilidade de características físicas e químicas de frutos de germoplasma de bacuri da região meio-norte do Brasil. *Revista Brasileira de fruticultura*, Vol. 23, No. 3, pp. 677-683, 2001.

Spada, P. D. S.; Dani, C.; Bortolini, G. V.; Funchal, C.; Henriques, J. A. P.; Salvador, M.; Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (acai) prevents hydrogen



peroxideinduced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *Journal of Medicine and Food*, Vol.12, Pp.1084-1088, 2009.

Su, E. G.; *Formulando com branqueadores da pele*, Cosmetics & Toiletries, São Paulo, Vol. 11, No. 2, Pp. 57-63, 1999.

Subramanian, R.; Asmawi, M. Z.; Sadikun, A.; *In vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide*. *Acta Biochimica Polonica*. Vol., 55, Pp. 391-398, 2008.

Tang, H.; Wang, A.; Salley, S. O.; Simon Ng, K. Y.; *The Effect of Natural and Synthetic Antioxidants on the Oxidative stability of biodiesel*. *J Am Oil Chem Soc*, 85:373–382, 2008.

Tinoco, A. C.; *Açaí, novas perspectivas de negócio*. Edição SEBRAE, 100p, 2005.

Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F.; Candeias, J. A. N.; *Microbiologia*, 3 edição, São Paulo, Atheneu, 1999.

Ueda, Y. e H. Ishimaru. *Hyaluronidase inhibitors containing plant extracts for cosmetic or pharmaceutical uses*. J. K. T. Koho. Japão. 2001.

Valença, R. S. F.; Santana, M. F. S.; Freitas, M. M.; *Aproveitamento da casca de bacuri para elaboração de biscoitos*. VI Seminário de Iniciação científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008.

Vieira, G. H. F.; Mourão, J. A.; Angelo, A. M.; Costa, R. A.; Vieira, R. H. S. F.; *Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleífera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bactéria*. *Revista Instituto Medicina Tropical*, Vol 53, No.3, Pp. 129-132, 2010.

Vieira, L. M.; Sousa, M. S. B.; Mancini-Filho, J.; Lima, A.; *Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n.3, p.888-897, 2011.

Villachica, H.; Carvalho, J. E. U.; Muller, C. H.; Diaz, C.S.; Almanza, M.; *Frutales y hortalizas promissórios de la Amazonia*. *Tratado de cooperacion Amazonica*.367p., 1996.

Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. *Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol.1, Pp. 452-457, 2009.

Wang, S. Q.; Balagula, Y.; Osterwalder, U.; *Photoprotection: a review of the current and future technologies*. *Dermatology and Therapy*. Vol. 23, Pp.31-47, 2010.

Wart, H. E. Van; Steinbrink, R.; A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Analytical Biochemistry*, Vol. 113, No.2, Pp.356-365, 1981.

Wolfe, K.L.; Liu, R.H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, Vol.55, Pp.8896–8907, 2007.

Xie, C.; Kang, J.; Li, Z.; Schauss, A. G.; Badger, T. M.; Nagarajan, S.; Wu, T.; Wu, X.; The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol.23, Pp. 1184-1191, 2012.

Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, No.2, pp.330–335, 2007.

Yamaguchi, K. K. L.; Lima, E. S.; PEREIRA, L. F. R.; Lamarão, C. V.; Veiga-Júnior, V. F. Amazon Acai: Chemistry and biological activities. A Review. *Food Chemistry*, Vol. 179, Pp. 137-151, 2015.

Yamashita M.; Fenn, J.B. Negative ion production with the electrospray ion source. *Journal of Physical Chemistry*, Vol. 88, No 20, Pp.4671, 1984.

Yu, J.; Ahmedna, M.; Goktepe, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*. Vol. 90, Pp.199-206, 2005.

Yuyama, L. K. O.; Aguiar, J. P. L.; Silva Filho, D. F.; Yuyama, K.; Varejão, m. J.; Fávaro, D. I. T.; Vasconcellos, M. B. A.; Pimentel, S. A.; Caruso, M. S. F.; Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* de diferentes ecossistemas amazônicos. *Acta Amazônica*, Vol. 41, No. 4, Pp. 545-552, 2011.

Zhai, H.; Maibach, H. I.; Skin – Whitening Agents. *Cosmetics & Toiletries*, Carol Stream, Vol. 116, No. 1, Pp. 21-25, 2001

Zhang, H.; Jones, R.; Martin-Deleon, P.A.; Expression and Secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the Epididymis: Role of Testicular Lumicrine Factors; *Matrix Biology: Journal Of The International Society*, Vol. 22, No 8, Pp. 653-661, 2004.

Zhang, L.; Hogan, S.; Li, J.; Sun, S., Canning, C.; Zheng, S.J.; Zhou, K., Grape skin extract inhibits mammalian intestinal  $\alpha$  – glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-treated mice. *Food Chemistry*, Vol. 126, Pp 466–471, 2011.



## 8. ANEXOS

*Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine Vol. 2 (2014)*

*Editor: V.K. Gupta*

*Published by: DAYA PUBLISHING HOUSE, NEW DELHI*

439

## 20

# Antioxidant Activity of Amazon Fruits

Klenicy K.L. Yamaguchi<sup>1</sup>, Carlos V. Lamarão<sup>1</sup>,  
Emerson S. Lima<sup>2</sup> and Valdir F. Veiga Junior<sup>1\*</sup>

### ABSTRACT

*Plant foods such as fruits play an important role in human consumption, due to their nutritional and sensory attributes. In this context the Amazon region has numerous fruit species with exotic flavors, combined with various chemical substances that are beneficial to human health. The chemical composition of these fruits has been linked to beneficial activities for the human body, being associated with a lower incidence of chronic and degenerative diseases. This chapter presents the available literature data concerning the antioxidant activity of Amazonian fruits and substances that are related to this activity. The protective effect of these foods has been attributed to the presence of antioxidant compounds such as vitamins A, C and E, carotenoids and phenolic compounds such as flavonoids, anthocyanins and phenolic acids. Amazonian açaí and other fruits, such as acerola, buriti, camu camu, caju and piquia, present the highest evidence of compounds antioxidants. The antioxidant activity related to the polyphenols is due to its reducing properties and chemical structure. This allows the scavenging of free radicals or chelation of transition metal. The resonance of the aromatic ring present in these compounds is primarily responsible for the formation of stable intermediate after the reduction process of free radicals*

**Keywords:** Amazonia, Polyphenols, Antioxidant.



## Review

## Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review



Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi<sup>a</sup>, Luiz Felipe Ravazi Pereira<sup>a</sup>, Carlos Victor Lamarão<sup>a</sup>  
Emerson Silva Lima<sup>b</sup>, Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Chemistry Department, Amazonas Federal University, Av. Rodrigo Octávio, 6.200, Japiim, Manaus, AM 69080-900, Brazil

<sup>b</sup>Pharmaceutical Sciences Faculty, Amazonas Federal University, Alexandre Amorin Street, 330, Aparecida, Manaus, AM 69010300, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 June 2014

Received in revised form 5 December 2014

Accepted 8 January 2015

Available online 4 February 2015

## Keywords:

Amazon

*Euterpe* genus

Polyphenols

Pharmacological activities

## ABSTRACT

Acai (acai or assai) is one of the Amazon's most popular functional foods and widely used in the world. There are many benefits to its alleged use in the growing market for nutraceuticals. The acai extracts have a range of polyphenolic components with antioxidant properties, some of those present in greater quantity are orientin, isorientin and vanillic acid, as well as anthocyanins cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside. The presence of these substances is linked mainly to the antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative and cardioprotective activities. Importantly, there are two main species of the *Euterpe* genus which produce acai. There are several differences between them but they are still quite unknown, from literature to producers and consumers. In this review are highlighted the chemical composition, botanical aspects, pharmacological, marketing and nutrition of these species based on studies published in the last five years in order to unify the current knowledge and dissimilarities between them.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.



*Scientia Amazonia*, v. 3, n.2, 39-46, 2014

Revista on-line <http://www.scientia.ufam.edu.br>

Mai-Ago ISSN:2238.1910

## QUÍMICA E FARMACOLOGIA DO BACURI (*Platonia insignis*)<sup>1</sup>

Klenicy K. L. Yamaguchi<sup>2</sup>, Carlos Victor Lamarão Pereira<sup>3</sup>, Emerson Silva Lima<sup>4</sup>, Valdir Florêncio da Veiga Junior<sup>5</sup>

*Submetido 09/02/2013 – Aceito 08/04/2014 – Publicado on-line 19/07/2014*

### Resumo

O bacuri é um fruto muito utilizado pela população Amazônica. O uso vem sendo difundido em outros estados devido ao sabor e o odor característico, sendo comestível na forma industrializada e *in natura*. A utilização etnofarmacológica está relacionada a utilização dos extratos de suas sementes como cicatrizante e anti-inflamatório e atualmente diversas atividades vêm sendo relatadas para todas as partes deste fruto (semente, casca e polpa). A sua composição química apresenta classes de terpenos, xantonas e fenólicos como constituintes majoritários. Dessa forma, o interesse pelo bacuri excede a indústria de alimentos devido ao potencial das atividades biológicas encontradas.

**Palavras-Chave:** Amazônia, bacuri, cicatrizante;

### Abstract

Bacuri is a fruit commonly consumed by Amazonian population. It has been used in other states due to the characteristic odor and taste that it presents. It has been consumed freshly or industrialized. The ethnopharmacological use of its seeds is mainly as anti-inflammatory and currently several activities have been reported for all parts of this fruit (seed, shell and pulp). Its chemical composition presents classes of terpenes, xanthonones and phenolic compounds as major constituents. Thus, interest in bacuri exceeds the food industry due to the potential biological activities found.

**Key-words:** Amazônia, bacuri and anti-inflammatory;



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)

## AMAZONIAN BIOREFINARIES: FROM FRUIT WASTE TO ANTIOXIDANT SUPPLEMENTS

Carlos Victor Lamarão<sup>a,b</sup>, Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi<sup>a</sup>,  
Rodrigo Otávio Silva de Souza<sup>c</sup>, Emerson Lima Silva<sup>c</sup>, Murilo  
Fazolin<sup>d</sup>, Valdir Florêncio da Veiga Júnior<sup>a\*</sup>.

### ABSTRACT

Brazil is the third largest producer of tropical fruits worldwide and the Amazon plays an important position in the world market, presenting fruits with both exotic flavor and taste with excellent biological properties according to a series of published scientific studies. The large amount of waste produced by the food industry raises serious management and environmental problems. Many of these residues, however, have the potential to be used as raw material for new byproducts by other production systems. Applying the biorefinery concepts, this study intend to evaluate the reuse of some pulp, but specially seeds and shells from Amazonian fruits, residues from food industry. Total phenolic (TP), total flavonoid (TF), DPPH and ABTS scavenging capacity, enzymatic activity and biological activities were obtained and analyzed to extracts from these fruits. TP and TF results varied from 2.27 to 466.59 mg GAE/g DW and from 0.98 to 357.71 mg CE/g DW, respectively. The higher values to TP contents and TF content were founded in seed extracts from *Euterpe oleracea* collected in Eastern Amazonia region and in pulp and shell extracts from *Caryocar villosum*. DPPH and ABTS results varied from 8.52 to 156.88  $\mu\text{m}/\text{mL}$  and from 4.43 to 192.49  $\mu\text{m}/\text{mL}$ , respectively. The higher activities on DPPH and ABTS assays were also found in pulp and shell extracts from *Caryocar villosum* and in seeds from *Euterpe oleracea* collected in Eastern Amazonia region. The fruit skins and seeds is presented as a good alternative for inhibiting digestive enzymes with promising results in some cases above 60%. The results enabled us to suggest that extracting and reusing the waste material from fruit industries in the Amazon region could be a very interesting approach to increase the value of these materials as a way to produce antioxidant supplements.

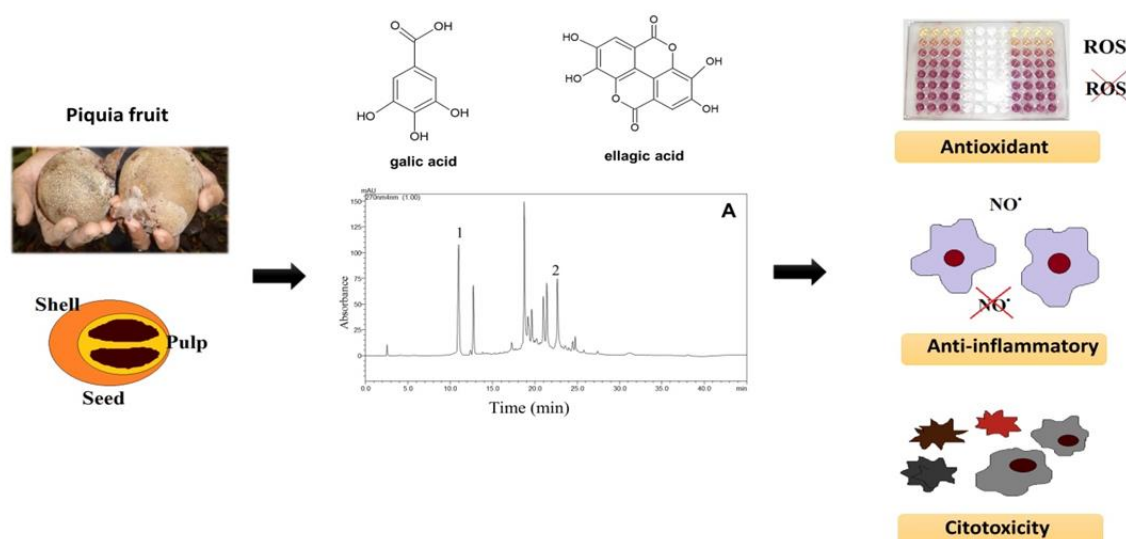
**Keywords:** Byproducts; Amazonia; Acai; Piquia; Antioxidant; Sustainability



# química nova

ISSN: 0100-4042 ISSN:1678-7064 on line

## HPLC-DAD profile of phenolic compounds, cytotoxicity, and antioxidant and anti-inflammatory potential of the amazon fruit piquia (*Caryocar villosum*)



Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi<sup>a</sup>, Carlos Vitor Lamarão Pereira<sup>a</sup>, Elenn Suzany Pereira Aranha<sup>b</sup>, Rodrigo Otávio Silva de Souza<sup>b</sup>, Patrícia Danielle Almeida Oliveira<sup>b</sup>, Marne Carvalho de Vasconcellos<sup>b</sup>, Emerson Silva Lima<sup>b</sup>, Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>a\*</sup>

### ABSTRACT

Piquia (*Caryocar villosum*) is a fruit native to the Amazon region rich in bioactive substances. Pulp, shell and seeds extracts were obtained and phenolic compounds, ellagic and gallic acids were quantified by HPLC. Cytotoxic potential, antioxidant and anti-inflammatory activities *in vitro* were also evaluated. Shell extracts showed free radicals scavenger capacity of ABTS ( $IC_{50}$ :  $3.93 \pm 0.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and DPPH ( $IC_{50}$ :  $7.81 \pm 0.34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), low cytotoxicity in human fibroblasts and also a high anti-inflammatory potential observed by the inhibition of nitric oxide production. At low concentrations ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) excellent antioxidant activity was verified in cellular assays, with percentages of  $70.69 \pm 2.77\%$ ,  $79.89 \pm 6.50\%$  and  $79.48 \pm 8.6\%$  for shell, pulp and seed extracts, respectively. This set of results including, antioxidant and anti-inflammatory capacity and low cytotoxicity, demonstrates that *C. villosum* fruit has a high potential to be used in the future by pharmaceutical and cosmetic industries.

**Keywords:** Amazon fruit; *Caryocar villosum*; Antioxidant; Nitric Oxide





*Scientia Amazonia*

Revista on-line <http://www.scientia.ufam.edu.br>

ISSN:2238.1910

## **Avaliação *in vitro* da Atividade Fotoprotetora de Resíduos de Frutas Amazônicas**

Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi<sup>2</sup>, Lorena dos Santos Santarém<sup>3</sup>, Carlos Victor Lamarão<sup>4</sup>, Emerson Silva Lima<sup>5</sup>, Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>6</sup>.

**Abstract.** The search for sun protection has been stepped up in recent decades and the demand for sunscreens, especially natural products that have sustainable use, has grown continuously. In parallel, the increase in fruit consumption increases the amount of waste and byproducts of the pulp industry, and scientific researches have proved the high amount of bioactive substances in seeds and fruit peels. This work aimed to evaluate the photoprotective capacity of 16 amazonian fruit parts (skins and seeds) not exploited by agribusiness. The absorbance of ethanol, and hydroalcoholic extracts (6:4 v / v) was measured at a wavelength between 200 and 500 nm, corresponding to regions of the ultraviolet UVA, UVB and UVC. The extracts showed high absorption capacity, highlighting the shells piquiá (*Caryocar villosum*), Bacurizinho (*Garcinia madruno*) and Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*), with absorption peaks in the UVA and UVB region; and seed piquiá, bacurizinho and açaí (*E. oleracea* and *E. precatoria*), with absorption in the UVB region. These results highlight the potential use of residues of these Amazonian fruits for presenting sunscreen capacity, stimulating studies for sustainable use of these raw materials.

**Keywords:** Amazon; Fruit waste; fotoprotection; sustentability

## Anexo 7

### APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS COM PUBLICAÇÃO DE RESUMOS

1. PEREIRA, L. F. R. ; **YAMAGUCHI, KLENICY K. DE LIMA** ; LAMARAO, C. V. ; SOUZA, R. O. S. ; Lima, Emerson Silva ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Amazon Assai Waste: A Potential source of bioactive substances. In: 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - GA2014, 2014, Guimarães. Anais do 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - GA2014, 2014. v. 1.
2. **YAMAGUCHI, KLENICY K. DE LIMA** ; LAMARAO, C. V. ; PEREIRA, L. F. R. ; Lima, Emerson Silva ; LIMA, M. S. ; DIAS, D. S. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Amazon Assai (Euterpe precatoria): the search for biorefinery process at the byproducts from pulp industry. In: 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - GA2014, 2014, Guimarães. Anais do 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - GA2014, 2014. v. 1.
3. SANTAREM, L. S. ; LIMA, A. S. ; SOUZA, R. O. S. ; **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; Veiga-Junior, V. F. ; Lima, E. S. . Determinação da Inibição da Tirosinae e Atividade Antioxidante e Fotoprotetora de Resíduos Obtidos de Frutos da Região Amazônica. In: Encontro Regional dos Estudantes de Farmácia, 2013, Natal. Anais do Encontro Regional dos Estudantes de Farmácia, 2013.
4. SANTAREM, L. S. ; LIMA, A. S. ; **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; Veiga-Junior, V. F. ; Lima, E. S. . Atividade antioxidante e Inibição da Tirosinae por Extratos Obtidos de Resíduos de Frutos Amazônicos. In: IV Workshop Sobre Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos Fitoterápicos, 2013, Manaus. Anais do IV Workshop Sobre Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos Fitoterápicos, 2012.
5. PIERI, F. A. ; Custódio, D. L. ; SANTOS, I. ; ORLANDI, P. P. ; Veiga-Junior, V. F. . Resíduos do extrativismo vegetal da Amazônia: Atividade inibitória de

- alcalóide obtido de *Aniba rosaeodora* sobre o patógeno *Bacillus subtilis*. In: 27o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. Anais do 27o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
6. **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; PEREIRA, L. F. R. ; Lima, E. S. ; SOUZA, R. O. S. ; LAMARAO, C. V. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Phenolic Characterization and Antioxidant Activity of Bacuri (*Platonia insignis*) Waste. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products ? XXX RESEM, 2013, Natal-RN. Anais do BCNP, 2013.
  7. **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; Mathias, C. S. ; CASTRO, D. R. G. ; LAMARAO, C. V. ; SOUZA, R. O. S. ; Lima, E. S. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Antioxidant Activity and Phenols and Flavonoids Quantificatio of Tucumã (*Astrocarium aculeatum*) Waste from Amazonas. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products ? XXX RESEM, 2013, Natal-RN. Anais do BCNP, 2013.
  8. SOUZA, R. O. S. ; Lima, E. S. ; **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; GOMES, F. T. A. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Antioxidant Activity of Hydroethanol Extract of Açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) Seeds. In: Antixodants and Redox Process in the Health, 2013, São Paulo-SP. Anais do Antixodants and Redox Process in the Health, 2013.
  9. ALMEIDA, P. D. O. ; **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; LIMA, L. ; Lima, E. S. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Amazon Fruit, Piquiá (*Cariocar villosim* Aubl). In: Antixodants and Redox Process in the Health, 2013, São Paulo-SP. Anais do Antixodants and Redox Process in the Health, 2013.
  10. SANTAREM, L. ; SOUZA, R. ; LIMA, A. ; **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; Lima, E. S. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Inhibition of Tyrosinase and antioxidante acitivity of extracts obtained by the peel, pulp and seed of *Caryocar villosum*. In: CIFARP 9th International Congress of Pharmaceutical Science Phytopharmatec, 2013, Ribeirão Preto-SP. Anais do CIFARP, 2013.

**CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS**

**YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; LAMARAO, C. V. ; HERCULANO, F. E. B. ; Lima, M. C. F. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Biotechnological Products of Amazonian Fruits. Utilisation and Management of Medicinal Plants. 1ed.New Delhi: Daya Publishing House, 2014, v. 2, p. 17-.

HERCULANO, F. E. B. ; **YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Waste from the Commercial Production of Edible Pulp Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, Meyer) in the Urban Area of Manaus/Amazonas-Brazil. Utilisation and Management of Medicinal Plants. 1ed.New Delhi: Daya Publishing House, 2014, v. 2, p. 19-.

**YAMAGUCHI, KLENICY K. DE LIMA** ; LAMARAO, C. V. ; Lima, E. S. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Antioxidant Activity of Amazon Fruits. Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine. 1ed.New Delhi: Daya Publishing House, 2014, v. 2, p. 22-.

LAMARAO, C. V. ; **YAMAGUCHI, KLENICY K. DE LIMA** ; Lima, E. S. ; VEIGA-JUNIOR, V. F. **UTILISATION AND MANAGEMENT OF MEDICINAL PLANTS – VOL.2 Biotechnological products of Amazonian fruits**, v.2, 2014.

**ARTIGOS PUBLICADOS**

**YAMAGUCHI, KLENICY KAZUMY DE LIMA** ; PEREIRA, L. F. R. ; LAMARAO, C. V. ; Lima, E. S. ; Veiga Junior, Valdir Florêncio da . Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. Food Chemistry , v. 179, p. 137-151, 2015.

**YAMAGUCHI, KLENICY K. DE LIMA** ; Lima, Emerson Silva ; LAMARAO, C. V. ; Veiga Junior, Valdir Florencio da . Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). Scientia Amazonia, v. 3, p. 39-46, 2014.

## Anexo 9

### ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

**YAMAGUCHI, KLENICY K. DE LIMA** ; LAMARAO, C. V. ; ARANHA, S. P., SOUZA, R. O S. OLIVEIRA, P. D. A. VASCONCELLOS, M. C., LIMA, E. S. VEIGA-JUNIOR, V. F. HPLC-DAD PROLIFE OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT, CITOTOXICITY AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF THE AMAZON FRUIT PIQUIA (*Caryocar villosum*). Química Nova, 2016.

### ARTIGOS EM ANDAMENTO / SUBMETIDOS

1. Optimization of phenolic extraction from bacuri shells (*Platonia insignis*) using response surface methodology. **Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi<sup>a</sup>**, David Dias <sup>b</sup>, Carlos Vitor Lamarão Pereira<sup>a</sup>, Max Lima, Emerson Silva Lima<sup>c</sup>, Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>a\*</sup>
2. Optimization of the extraction of phenolic antioxidant from waste of Acai (*Euterpe oleraceae*) fruit from Amazon region using Response Surface Methodology. **Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi<sup>a</sup>**, David Dias <sup>b</sup>, Luiz Felipe Ravazi Pereira<sup>a</sup>, Carlos Vitor Lamarão Pereira<sup>a</sup>, Emerson Silva Lima<sup>c</sup>, Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>a\*</sup>
3. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de resíduos de frutas amazônicas . **Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi**, Lorena dos Santos Santarém, Carlos Victor Lamarão, Emerson Silva Lima, Valdir Florêncio da Veiga-Junior.
4. Evaluation of photoprotection and antioxidant activity and chromatographic determination of phenol compounds by hptlc technique in seed and bark of the bacuri (*Platonia insignis*). **Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi**, Yasmin Cunha, Lorena dos Santos Santarém, Carlos Victor Lamarão, Rodrigo, Patrícia, Emerson Silva Lima, Valdir Florêncio da Veiga-Junior.
5. Characterization of the chemical composition of seed from assai (*euterpe precatoria*) by desorption electrospray ionization mass spectrometry analysis in two dimensional high-performance thin-layer chromatography partial separation. **Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi<sup>a</sup>**, Michel Campos <sup>c</sup>, Ifa Demian <sup>c</sup>, Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>b\*</sup>

6. Antioxidant properties of the seed from amazonian assai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*, and the analyses by thin-layer chromatography using desorption electrospray ionization mass spectrometry.  
**Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi**<sup>a</sup>, Michel Campos <sup>c</sup>, Ifa Demian <sup>c</sup> , Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>b\*</sup>
  
7. Utilization of mass spectrometry using desorption electrospray ionization with two dimensional high-performance thin-layer chromatography partial separation for phenolic characterization of shell bacuri fruit (*Platonia insignis*).  
**Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi**<sup>a</sup>, Michel Campos <sup>c</sup>, Carlos Vitor Lamarão Pereira<sup>a</sup>, Emerson Silva Lima<sup>b</sup>, Ifa Demian <sup>c</sup> , Valdir Florêncio da Veiga-Junior<sup>b\*</sup>