



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS PADRONIZADOS EM ANTIOXIDANTES NATURAIS:
APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DA UCUÚBA (*Virola surinamensis*)**

Kalene de Almeida Oliveira

Belém – Pará

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS PADRONIZADOS EM ANTIOXIDANTES NATURAIS:
APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DA UCUÚBA (*Virola surinamensis*)**

Autora: Kalene de Almeida Oliveira

Orientador: Profa. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa

Exame de Qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas.

Belém – Pará

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kalene de Almeida Oliveira

Obtenção de extratos padronizados em antioxidantes naturais: aproveitamento dos resíduos da ucuúba (*Virola surinamensis*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
Instituto de Tecnologia (ITEC)
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Taís Vanessa Gabbay Alves
Universidade da Amazônia (UNAMA)

Prof. Dra. Roseane Maria Ribeiro da Costa (Orientadora)
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Universidade Federal do Pará

Dedico esta dissertação aos meus pais, Lusenilson e Vera, e irmãos, Larissa e Junior e minha sobrinha Isabelli, que são os melhores presentes que Deus me deu. Por estarem sempre ao meu lado, por todo incentivo, cuidado, por sonharem essa conquista comigo e acima de tudo por todo amor que tenho recebido.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar sou grata a Deus por tudo que tem realizado em minha vida e por mais essa conquista.

Agradeço a minha família (pais, irmãos, sobrinha e cunhado), meu mais precioso tesouro. Ao meu namorado, Antonio Victor, por toda alegria e companheirismo. Vocês são o melhor de Deus para a minha vida.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Roseane Costa pela oportunidade concedida desde a iniciação científica e por todo esse caminho acadêmico trilhado que me permitiu chegar a concretização do mestrado. Obrigada professora, a senhora é parte dessa caminhada.

Meu muito obrigada a todos os meus amigos e colegas do Nanofarm e P&D. Em especial ao Taylon, Ana Carolina, Hellen, Rafael, Saulo e Rayanne, por me escutarem, pelas palavras de apoio e por toda ajuda. Não posso deixar de dizer muito obrigada para Taís por todo conhecimento e amizade compartilhada aos longos desses anos. Sou muito grata à Fernanda (Nandinha) por toda amizade e companheirismo. Vocês foram de grande importância nessa caminhada.

Aos meus amigos Leandro, Tainã, Jahda, Maria Luíza, Thaysa, Fádía e Junior, por todo incentivo, amizade e por sempre se importarem e me ouvirem.

Um agradecimento especial para Andressa por toda ajuda e ensinamentos.

Agradeço ao Prof^o Dr^o José Otávio e ao Laboratório P&D que auxiliaram na realização desse trabalho.

Agradeço aos professores Wagner Barbosa (Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LACREM), Prof^a Dr^a. Edilene Silva (Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular), Prof^a Dr^a. Marta Chagas (Laboratório de Microbiologia) pela receptividade e pela disponibilidade dos laboratórios para desenvolvimento desse projeto. Ao Prof^o Dr^o Edemilson Conceição por todos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Agradeço à Universidade Federal do Pará, aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia. A Capes pelo apoio financeiro para a realização desse mestrado.

Por fim, sou grata a todos que me apoiaram e continuaram me apoiar na minha caminhada. Vocês ajudaram a tornar essa conquista possível.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Árvore <i>Virola surinamensis</i>	16
Figura 2: Frutos <i>Virola surinamensis</i>	16
Figura 3:Cosméticos produzidos através do “sebo de ucuúba”.....	17
Figura 4: Fórmula molecular plana base para flavonoides.....	19
Figura 5: Fórmula molecular plana da epicatequina.....	19
Figura 6: Fórmula molecular plana do β -caroteno.....	20
Figura 7: Pó do resíduo de <i>Virola surinamensis</i> , após processo de secagem e pulverização.....	40
Figura 8: Distribuição granulométrica do pó do resíduo da <i>Virola surinamensis</i>	41
Figura 9: Extrato hidrofílico concentrado do pó obtido do resíduo da <i>Virola surinamensis</i>	46
Figura 10: Extrato lipofílico proveniente do pó de <i>Virola surinamensis</i>	48
Figura 11: Espectro de absorção do FTIR do pó e extrato liofilizado do resíduo de ucuúba.	49
Figura 12: Espectro de absorção do FTIR do extrato oleoso do resíduo de ucuúba e do óleo de soja.	49
Figura 13: Curva de TG do pó do resíduo de ucuúba em atmosfera de nitrogênio...51	
Figura 14: Curva de TG do extrato liofilizado do resíduo de ucuúba em atmosfera de nitrogênio.....	54
Figura 15: Curva de TG do extrato oleoso do resíduo de ucuúba em atmosfera de nitrogênio.....	55
Figura 16: Bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> , obtenção do CIM e CBM do extrato hidrofílico, idênticos no valor de 625 $\mu\text{g/mL}$	59
Figura 17: Bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> , obtenção do CIM e CBM do extrato lipofílico.	59
Figura 18: Bactéria <i>Escherichia coli</i> , obtenção do CIM e CBM do extrato hidrofílico, idênticos no valor de 1250 $\mu\text{g/mL}$	62
Figura 19: Bactéria <i>Escherichia coli</i> , obtenção do CIM e CBM do extrato lipofílico. .62	
Figura 20: Viabilidade celular através do método MTT em macrófagos peritoniais cultivados por 24 horas e tratados com diferentes concentrações do extrato liofilizado do resíduo de ucuúba.	64
Figura 21: Curva padrão correlacionando a área dos picos com a concentração.....	66
Figura 22(A) Cromatograma do padrão ácido cafeico (15,01 min). (B) Cromatograma do extrato de hidrofílico de ucuúba (14,13 min) na concentração de 5mg/ml. (C) co-injeção padrão+extrato (14,38 min). Os cromatogramas foram visualizados em 330 nm.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise centesimal das sementes da <i>Virola surinamenses</i>	17
Tabela 2: Condições do método - sistema gradiente da fase móvel aplicada para identificação e validação do marcador ácido caféico.	39
Tabela 3: Determinação da composição centesimal do pó de ucuúba.	43
Tabela 4: Caracterização físico-química do extrato concentrado obtido através do resíduo de ucuúba.....	47
Tabela 5: Caracterização físico-química do extrato lipofílico do resíduo de ucuúba.	48
Tabela 6: Bandas de FTIR do pó e extrato liofilizado do resíduo de ucuúba.	50
Tabela 7: Bandas de FTIR do extrato lipofílico do resíduo de ucuúba e do óleo de soja.....	492
Tabela 8: Etapas de perda de massa da curva de TG do pó e extrato liofilizado da <i>V. surinamensis</i> na atmosfera de nitrogênio.....	51
Tabela 9: Etapas de perda de massa da curva de TG do extrato lipofílico da <i>V. surinamensis</i> na atmosfera de nitrogênio.....	55
Tabela 10: Teores de polifenóis totais (PT) e flavonóis totais (FT) no extrato concentrado e liofilizado de ucuúba (<i>V. surinamensis</i>).	56
Tabela 11: Determinação da atividade antioxidante, pelos métodos colorimétricos ABTS e DPPH, do extrato hidrofílico concentrado e liofilizado do resíduo de ucuúba (<i>V. surinamensis</i>)	59
Tabela 12: Repetibilidade do padrão na concentração de 50 µg/mL.	64
Tabela 13: Exatidão do método, triplicata dos pontos baixo, médio e alto das concentrações do padrão.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)
TG	Termogravimetria
DTG	Derivada Termogravimétrica
FTIR	Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier
Trolox	(±)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetramethylcromano-2-ácido carboxílico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
Aw	Atividade de água
IV	Infravermelho
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
UV	Ultravioleta
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CI	Concentração inibitória
CC	Concentração citotóxica
MTT	Método Thiazolyl Blue

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Resíduos agroindustriais	13
2.2. Extração verde	14
2.3. <i>Virola surinamensis</i> (Warb.) ucúuba – resíduos da semente	15
2.4. Compostos bioativos	18
2.4.1. POLIFENÓIS E FLAVONÓIDES.....	18
2.4.2. CAROTENOIDES.....	20
2.5. Atividade antioxidante	20
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Materiais	24
4.1.1. SOLVENTES:.....	24
4.1.2. REAGENTES:.....	24
4.1.3. PADRÕES:.....	24
4.2. Métodos	24
4.2.1. OBTENÇÃO DO RESÍDUO DA UCUÚBA	24
4.2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DO RESÍDUO DA UCUÚBA	25
4.2.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO	27
4.2.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO LIPOFÍLICO	27
4.2.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO	28
4.2.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS DO EXTRATO HIDROFÍLICO...	29
4.2.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES DO EXTRATO HIDROFÍLICO	30
4.2.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAROTENOIDES DO EXTRATO LIPOFÍLICO	30
4.2.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO	31
4.2.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PARA OBTENÇÃO DE CIM E CBM DO EXTRATO HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO	32
4.2.11. ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO HIDROFÍLICO	34
4.2.12. VALIDAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS MAJORITÁRIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PRESENTES DO EXTRATO HIDROFÍLICO.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Processamento e caracterização do resíduo agroindustrial da ucuúba.....	40
5.1.1. PÓ OBTIDO DO PROCESSAMENTO DO RESÍDUO DE UCUÚBA.....	40
5.2 Caracterização físico-química do pó obtido do resíduo da ucuúba	41
5.2.1. DETERMINAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA.....	41
5.2.2. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INTUMESCIMENTO DO PÓ E TEOR DE SÓLIDOS	41

5.2.3. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE EM BALANÇA DE INFRAVERMELHO E ATIVIDADE DE ÁGUA (A_w) DO PÓ	42
5.2.4. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	42
5.3. Obtenção e caracterização do extrato hidrofílico e lipofílico	44
5.3.1. DENSIDADE RELATIVA, ACIDEZ, PH E TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO HIDROFÍLICO	44
5.3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO LIPOFÍLICO	45
5.3.4. ESPECTROSCOPIA DA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO PÓ E DO EXTRATO LIPOFÍLICO	49
5.3.5. OBTENÇÃO DO PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO (TG) DO PÓ E DO EXTRATO HIDROFÍLICO LIOFILIZADO.....	50
5.3.6. OBTENÇÃO DO PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO (TG) DO EXTRATO LIPOFÍLICO.....	52
5.4. Determinação de Metabólitos Secundários – Polifenóis e Flavonoides do extrato hidrofílico.....	54
5.5. Determinação de Metabólitos Secundários – Carotenóides do extrato lipofílico	55
5.6. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS do extrato hidrofílico.....	56
5.8. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS do do extrato lipofílico	58
5.9. Avaliação da atividade antibacteriana para obtenção de CIM e CBM do extrato hidrofílico e lipofílico.....	58
5.10. Atividade Citotóxica do extrato hidrofílico.....	61
5.11. Validação e quantificação dos metabolitos majoritários por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) presentes do extrato hidrofílico.....	63
6. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

O aumento da produção de alimentos a partir de frutas e vegetais gera uma grande quantidade de resíduos tornando a eliminação dos mesmos um desafio (JI et al, 2017; IGALAVITHANA et al, 2017). Esses passivos têm representado um problema ambiental e econômico (MELO et al, 2011). Observa-se uma crescente preocupação mundial em relação a criação de medidas para diminuir ou eliminar esses resíduos produzidos pelo processamento de alimentos (CASTRO e SATO, 2013; BARBOSA e CONCEIÇÃO, 2016).

As frutas e legumes são fontes de compostos bioativos como polifenóis, vitamina C, carotenoides e tocoferol que apresentam efeitos benéficos para a saúde por atuarem na prevenção de doenças (WIJNGAARD, ROBLE, BRUNTON, 2009; LANDIN, 2010). Tal como as frutas, os resíduos das mesmas apresentam esses compostos bioativos evidenciando potencial de aproveitamento pela indústria para o desenvolvimento de novos produtos e levar à redução dos custos financeiro para o manejo e descarte adequado desses resíduos (COELHO et al, 2001; FERNANDES et al, 2008).

Os resíduos obtidos do processamento de frutas podem ainda apresentar substâncias nutritivas, como óleo essencial, proteínas, enzimas, metabólitos secundários e lipídeos (ALVES et al, 2017). Um dos resíduos agroindustriais de fruta com potencial de aproveitamento é oriundo da ucuúba (*Virola surinamensis*), de origem amazônica que se destaca pelo seu uso no tratamento da malária, ação antiinflamatória e antifúngica, estando diretamente relacionado à presença de seus compostos bioativos como as lignanas, neolignanas, propilfenonas, arilpropanóides e flavonoides (HIRUMA-LIMA et al, 2009; WANG et al, 2017).

A gordura obtida da semente de ucuúba tem sido amplamente explorada pela indústria, o que tem levado ao aumento da geração de resíduos por parte desse fruto (GALLUPO, 2001). Acredita-se ser importante explorar o potencial apresentado por esses resíduos oriundos do processo extrativo da semente de ucuúba. Por meio de processos extrativos utilizando solventes verdes que apresentam maior segurança e qualidade do produto obtido e aplicação de tecnologias no resíduo é possível obter produtos rico em nutrientes e compostos bioativos, com alto valor agregado podendo

ser utilizado pela indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica valorizando ainda mais a cadeia produtiva desse fruto e contribuindo para sustentabilidade.

Tendo em vista o aproveitamento de resíduos agroindustriais, esse estudo tem por objetivo a obtenção e caracterização de extratos hidrofílicos e lipofílico, pois os mesmos permitem extração de maior diversidade de metabólitos secundários, contendo antioxidantes naturais como polifenóis e carotenoides, além de buscar identificar o composto majoritário pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência. Avaliar se os extratos apresentam potencial antimicrobiano e se os mesmos possuem citotoxicidade para o organismo, e assim explorar o potencial do resíduo de ucuúba oriundo do processo extrativo da gordura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Resíduos agroindustriais

A Revolução Industrial trouxe grandes alterações ao meio ambiente, pois a partir desse período houve um aumento na produção de bens de consumo e geração de resíduos. O aumento na geração desses resíduos tem contribuído para poluição do meio ambiente, pois a quantidade produzida é menor que a quantidade degradada, provocando impactos ambientais. Os resíduos podem contaminar o solo e o lençol freático, sofrer fermentação liberando odores, além de levar a proliferação de microrganismos como bactérias, fungos e vírus e macrovetores como mosca e ratos (RODRIGUES, 2010; KIM et al, 2014; JI et al, 2017).

Com o crescimento da agroindústria nos últimos anos e sua instalação em diversas regiões tem contribuído para produção de resíduos que são considerados fontes de contaminação ambiental (SAVATOVIC et al, 2012; BORGES et al, 2015; SLAVOV et al, 2017). Também tem crescido a preocupação com o meio ambiente, assim políticas públicas vêm sendo aplicadas no intuito de reduzir esses impactos ao meio ambiente (LOUSADA JÚNIOR, 2006; PELIZER, 2007).

Os resíduos após serem gerados precisam de um tratamento adequado de acordo com a legislação ambiental, isso requer um grande investimento por parte da indústria com manutenção, mão de obra e operação sem que a haja um retorno financeiro. Assim, tem se tornado cada vez maior a necessidade de reaproveitar esses resíduos no intuito de valorizar esses produtos e diminuir a poluição ambiental e os custos nesse segmento para a indústria (RODRIGUES, 2010; BARBOSA e CONCEIÇÃO, 2016).

Os resíduos agroindustriais de frutas são produzidos em grande quantidade e eliminados de forma inadequada. Estes resíduos podem ser fontes promissoras para o desenvolvimento de novos produtos por conter substâncias de interesse nutricional e compostos bioativos. A indústria de alimentos tem investido em projetos que garantam a sustentabilidade da produção industrial, pois a reciclagem desses resíduos apresenta interesse tecnológico, científico e econômico, uma vez que tem como objetivo recuperar a matéria e energia, preservando assim os recursos naturais, além de reduzir os danos ambientais como contaminação do solo causados pelo descarte desses resíduos, gerar mais renda para os processadores de alimentos e

agregar valor à cadeia produtiva do fruto. (UCHOA et al, 2008; GONZALES et al, 2014; SANCHÉZ et al, 2015; WENG et al, 2017)

A indústria vem buscando soluções para preservar o meio ambiente que sejam economicamente viáveis para tratar os resíduos agroindustriais (CEREDA, 2000). Alguns estudos têm destacado o potencial dos resíduos agroindústrias de frutas na produção de novos produtos ou mesmo como ingredientes de ração animal. Uma das formas de se aproveitar esses metabólitos e através da extração dos mesmos que pode ser feita por métodos que não causem impacto ambiental como percolação, maceração entre outros, bem como, uso de solventes que não causem nenhum dano ao meio ambiente como os solventes verdes como etanol e óleos vegetais.

2.2. Extração verde

Os processos extrativos existentes apresentam algumas limitações quanto aos solventes utilizados na extração de compostos de baixa polaridade como carotenoides e tocoferol. Os solventes orgânicos utilizados como acetona, hexano, éter de petróleo entre outros são tóxicos para o ser humano e animais. Logo, o uso desses solventes não é bem aceito pela indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (LI et al, 2012; GOULA et al, 2017).

Novas alternativas que substituam o uso desses solventes estão sendo empregadas para preservar a eficiência de extração e atendam às exigências da sociedade. O conceito de extração verde, que está baseado nos princípios da química verde ou engenharia verde, consiste em processos de extração que reduzam o consumo de energia e permita o uso de solventes alternativos e renováveis ou inovadores, obtido de fontes vegetais tais como os óleos vegetais (canola, soja, semente de girassol entre outros) a fim de eliminar os solventes mais tóxicos e garantir a segurança e a qualidade do produto extraído (PU, BECHTEL E SATHIVEL, 2010; PARJIKOLAEI et al, 2015)

Handayani e colaboradores (2008) realizaram a extração de astaxantina, um tipo de carotenoide presente nos resíduos de camarão, utilizando como solvente o óleo de palma e concluíram que o mesmo foi eficiente na retirada de astaxantina do resíduo. Goula e colaboradores (2017) realizaram a extração de β -caroteno dos resíduos da casca de romã, utilizando óleo de semente de girassol e óleo de soja

como solvente extrator, observando que esses solventes verdes foram eficientes no processo extrativo de metabólitos de baixa polaridade como os carotenoides.

O uso de óleos vegetais é uma alternativa promissora na extração de compostos bioativos como carotenoides e tocoferol, devido a baixa polaridade e solubilidade dessas substâncias permitindo que essas sejam atraídas pelo óleo vegetal durante o processo extrativo (PARJIKOLAEI et al, 2015; GOULA et al, 2017).

Além disso, este processo é ambientalmente seguro e saudável podendo ser realizado sem comprometer a qualidade dos metabólitos extraídos e do produto final que será obtido a partir desse processo extrativo. O uso desses solventes se torna mais rentável durante o processo extrativo, pois o consumo de solvente é reduzido, além de se tornar mais eficaz na extração dos compostos quando associados a técnicas de extração verde (LATIF et al, 2011; KUMAR et al, 2017).

O uso de óleo vegetal como solvente tem demonstrado seus benefícios, pois reduzem os riscos à saúde por não serem tóxicos, conservam as características organolépticas do produto extraído, não prejudicam o meio ambiente e assim podem ser vistos como uma alternativa benéfica em um mundo sustentável (BURIOL et al, 2009; LI et al, 2012). Sendo uma alternativa mais segura de solvente para extrair compostos bioativos de plantas, frutas e seus resíduos, como por exemplo o resíduo da ucuúba estudado nesse trabalho.

2.3. *Virola surinamensis* (ucuúba) – resíduos da semente

A *Virola surinamensis* é uma espécie de árvore encontrada nas margens dos rios da região Amazônica pertencente ao gênero *Myristicaceae*, popularmente conhecida como mucuíba, ucuúba-da-várzea, ucuúba-branca, ucuúba-verdadeira, ucuúba do igapó (HIRUMA- LIMA, et al 2008). No Brasil, essa espécie está distribuída pelos estados do Pará, e partes do Maranhão, Pernambuco, Roraima, Amazonas, Ceará e Goiás (ELEOTÉRIO, SILVA; 2014). É uma árvore lenhosa (Figura 1) de grande porte, podendo chegar até 40 metros de altura com até um metro de diâmetro, com sua casca sendo fina de cor pardo-acinzentada, sua madeira é leve de superfície áspera e de baixa resistência ao apodrecimento com seu cerne variando de bege-claro até castanho-escuro. A *Virola surinamensis* dá seus frutos (Figura 2) na estação chuvosa e suas sementes são totalmente cobertas por um arilo carnoso e de coloração vermelha (GALUPO et al, 2001; GURGEL et al, 2006).



Figura 1: Árvore *Virola surinamensis* (Adaptado de Gurgel et al., 2006)



Figura 2: Frutos *Virola surinamensis* (Adaptado de Gurgel et al., 2006)

O uso da ucuúba ocorre desde o período pré-colombiano, pois os índios faziam uso da semente e casca como alucinógenos em seus rituais e utilizavam o sebo das sementes para aplicação em ferimentos (LOPES et al, 1999; GALUPO et al, 2001)

Na medicina popular o chá das folhas de ucuúba é utilizado para tratar reumatismo, artrite, cólica, inflamações, gastrites, dispepsias, erisipelas. O seu extrato hexânico tem ação contra infecções de *Schistosoma mansoni*, e o sebo das sementes pode auxiliar na cura de aftas, hemorroidas e tem efeito cicatrizante (RODRIGUES, 1980; LORENZI e MATOS, 2002; HIRUMA-LIMA et al, 2009).

O destaque econômico iniciou-se devido o extrativismo madeireiro desse gênero, porém atualmente são as sementes de ucuúba que tem sido foco de interesse da indústria cosmética. Um estudo realizado por Carneiro (2015) mostra o valor nutricional (Tabela 1) da semente de ucuúba.

Tabela 1: Análise centesimal das sementes da *Virola surinamenses* (Carneiro, 2015).

Parâmetros	Peso Fresco	Peso Seco
Umidade	9,3%	-
Cinzas	3,62	2,1%
Gordura	40,5%	67,0%
Proteínas	16,4%	11,6%
Extrato sem N e fibras	17,4%	19,3%

As sementes possuem 60% de gordura, sendo rica em triacilgliceróis e ácidos graxos, dos quais cerca de 68,15% são ácido mirístico e 19,78% são ácido láurico. Durante o processo de prensagem das amêndoas de ucuúba são originados a gordura que tem substituído o sebo animal utilizado pela indústria na produção de diversos produtos como sabão, vela e principalmente cosméticos (Figura 3), o que tem gerado benefício para a região amazônica (GALUPO et al, 2001).



Figura 3:Cosméticos produzidos através do “gordura de ucuúba”. Fonte: rede natura

As folhas e as sementes da *Virola surinamensis* apresentam compostos bioativos como alcalóides, ácidos graxos, óleos essenciais como monoterpenos e sesquiterpenos, flavonóides como a epicatequina e flavona titionina, tocotrienols, tocoferol componente da família da vitamina E, neolignanas, fenilpropanóides, propiofenonas, arilpropanóides, γ -lactonas, policetídios e lignanas como fragansins A2 e D2, galbacina, galbelgin, 5-methoxigalbelgina, grandisina, verrucosina, aristolignanana, austrobailignanana, calopeptina, veraguensin, 5-methoxiveraguensina, nectandrina B, galbulina e galcatina (BLUMENTHAL et al, 1997; LOPES et al, 1999; LOPES et al, 1999; KATO et al, 2012).

Durante a etapa de extração da gordura, ocorre a prensagem das sementes resultando na obtenção de uma matriz sólida chamada de torta ou farelo como ocorre com a maioria dos processos agroindustriais das frutas tropicais, esses resíduos se descartados no solo, inadequadamente, podem atrair vetores causando contaminação. Gallupo e Carvalho (2001) em sua pesquisa relatam que a população utiliza esses resíduos como adubo ou ração para gado. Há interesse na avaliação desses resíduos, uma vez que os mesmos são obtidos da semente podendo ainda conter substâncias de alto valor nutricional como macronutrientes, micronutrientes e metabólitos como carotenoides, tocoferol, flavanóides que oferecem benefícios à saúde. Com a aplicação de tecnologias esses resíduos podem ser convertidos em produtos comerciais e assim auxiliar na redução da poluição gerada pelo seu descarte inapropriado no solo (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Logo, a obtenção de extratos vegetais e avaliação de seu potencial antioxidante pode ser de grande relevância no aproveitamento desses resíduos para o desenvolvimento de produtos.

2.4. Compostos bioativos

2.4.1. POLIFENÓIS E FLAVONÓIDES

A partir dos resíduos de ucuúba é possível obter extratos ricos em polifenóis, α -tocoferol e β -caroteno. San e Yildirim (2010) relataram que a forte interação entre o α -tocoferol e o β -caroteno apresentam efeito antioxidante. Esses compostos bioativos apresentam grande benefício para a saúde, por possuírem ação antioxidante (CHIRINOS et al, 2013), anti-inflamatória (CARVALHO et al, 2010), antimicrobiana (GRAÇA et al, 2017), antifúngica (GRAÇA et al, 2016), antitumoral (XIANG et al, 2017). Esses compostos bioativos podem estar presentes nos resíduos agroindustriais oriundos das sementes (LAUFENBERG et al, 2003).

Os polifenóis são substâncias bioativas e metabólitos secundários amplamente distribuídos entre as plantas, são originados a partir das vias bioquímicas do ácido chiniquico, pela via do ácido cinâmico e fenilpropanoídico. Esses compostos estão subdivididos em fenólicos diterpenicos, ácidos fenólicos, taninos e flavonoides. Esses metabólitos apresentam como característica biológica principal sua capacidade antioxidante por meio da inibição dos mecanismos oxidativos que podem levar ao aparecimento de doenças degenerativas, sendo assim fundamentais na dieta humana

e animal (HATAMNIA, ABBASPOUR, DARVISHZADEH, 2014; RODRIGUES et al, 2016).

Os flavonóides (Figura 4) são compostos com várias atividades biológicas, pois além da atividade antioxidante, possuem também ação antibacteriana, antiviral, anticancerígena, ação neuronal e hipotensiva (CARVALHO et al, 2010; YING e WAN, 2012; RÚBIO et al, 2013; HU et al, 2016). São divididos em 6 grupos como: Flavonas, flavonóis, flavan-3-óis, isoflavonoides, antocianinas e flavanonas e cada grupo possui respectivamente compostos principais: rutina e luteolina, quercetina e caempferol, catequina e epicatequina (Figura 5), genisteína, cianidina, naringenina, são mais de 4000 diferentes tipos de flavonoides já descobertos, de todos identificados já foram encontrados epicatequina e flavonas na espécie *Virola surinamensis* (SILVA et al, 2003; FU et al., 2013).

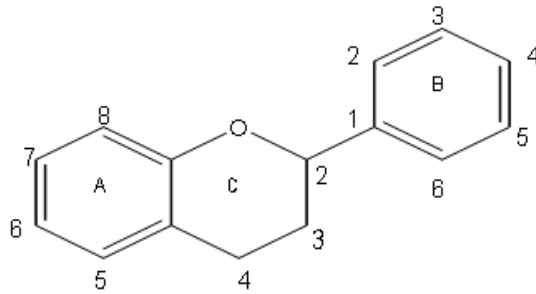


Figura 4: Fórmula molecular plana base para flavonoides

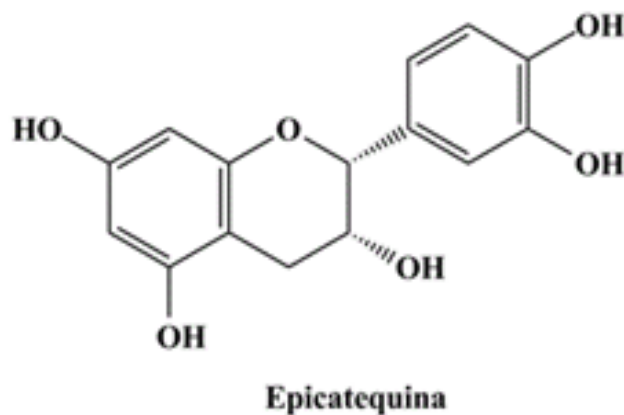


Figura 5: Fórmula molecular plana da epicatequina

2.4.2. CAROTENÓIDES

As plantas produzem um pigmento natural sendo um dos responsáveis pela cor das frutas e vegetais chamado carotenoides. O β -caroteno é um carotenoide precursor natural da vitamina A, ao ser metabolizado dá origem a mesma. Mais de 600 espécies de carotenóides já foram identificadas, estão organizadas em dois grupos de acordo com suas estruturas: 1) xantofilas, que são derivados oxigenados dos carotenos e 2) carotenos, que são hidrocarbonetos tetraterpênicos, como exemplo temos α -caroteno, β -caroteno (Figura 7), luteína, licopeno entre outros. O metabólito que é mais comumente encontrado é o β -caroteno, que possui elevada atividade antioxidante, possuindo ação contra doenças degenerativas, doenças oculares e cardíacas (SAN E YILDIRIM, 2010; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; KLJAK E GRBEŠA, 2015; FLAKELAR et al., 2017).

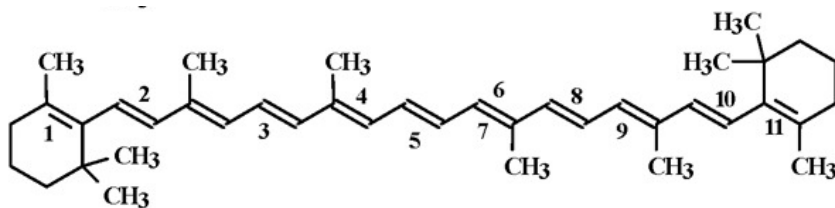


Figura 6: Fórmula molecular plana do β -caroteno

Na última década, cresceu o interesse pelos metabólitos presentes nas frutas tropicais e vegetais adquiridos na alimentação, tais como: vitamina E (α -tocoferol, tocotrienos), carotenoides (β - caroteno, licopeno), Flavonoides (epicatequina, rutina e flavona) que possuem elevada ação antioxidante, possuindo papel importância para a saúde, pois estudos científicos sugerem que esses antioxidantes ajudam a reduzir o risco de diversas patologias e ajudam a retardar o envelhecimento, logo, é essencial desenvolver e utilizar antioxidantes para proteger o corpo humano de radicais livres (HATAMNIA, ABBASPOUR, DARVISHZADEH, 2014; HO et al, 2014; WANG et al, 2017).

2.5. Atividade antioxidante

A oxidação é um processo fundamental do organismo para produzir energia, contudo durante o mesmo são originados os radicais livres oxigenados ou

nitrogenados, o excesso desses radicais no organismo gera o estresse oxidativo que é prejudicial às células, uma vez que pode causar danos ao DNA (WANG et al, 2017; SANTOS et al, 2008; SOARES et al, 2005). Os Antioxidantes são substâncias que atuam inibindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres no organismo, sendo fundamentais, pois inibem ou reduzem os processos oxidativos amenizando o desenvolvimento de diferentes tipos de patologia como Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, doenças cardiovascular, doenças hepáticas e diversos tipos de câncer (SANTOS et al, 2008; ABBAS et al, 2014; HATAMNIA, ABBASPOUR, DARVISHZADEH, 2014).

Existem alguns métodos que foram desenvolvidos utilizando substâncias biologicamente ativas para avaliar a atividade antioxidante de extratos, vegetais ou alimentos. Esses métodos são 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) devido à facilidade, velocidade e sensibilidade dos mesmos. Esses métodos usam compostos cromogênicos dos radicais naturais que por sua vez apresentam a capacidade de capturar os antioxidantes presentes na amostra, conseqüentemente ocorre o desaparecimento do cromofóro. Esse método pode ser utilizado para compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al, 2005; SRINIVASAN et al, 2007; SANTOS et al, 2008; ALI et al, 2008).

O ensaio de capacidade antioxidante por ABTS é um dos métodos mais utilizados para detecção da atividade antioxidante. Esse ensaio é baseado na captura do radical catiônico ABTS pelo antioxidante 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox), que é um análogo da vitamina E, por meio de uma reação química de redução do ABTS pelo trolox, fazendo com que o radical sofra uma descoloração levando a uma redução da absorvância no espectro de absorção do comprimento de onda de 734 (Ali et al, 2008; Miller et al, 1993).

A redução do radical ABTS mediante a presença do trolox é semelhante ao que é gerado pelo antioxidante analisado, como por exemplo de extratos vegetais contendo metabólitos como flavonóides, carotenoides e tocoferóis, analise por espectrofotometria e o resultado expresso em equivalente de trolox por unidades de concentração (CAMPOS e LISSI,1997). O ensaio foi realizado por Miller et al (1993) e Rice-Evans e Miller (1994) e depois modificado por Re et al. (1999). É um método vantajoso por ser simples e por seus constituintes possuírem uma boa solubilidade.

Outro método usado para determinar atividade antioxidante é o DPPH. Esse método foi realizado por Brand-Willians et al (1995) e posteriormente modificado por Sanchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Esse ensaio consiste na captura do radical livre DPPH pelo antioxidante trolox, fazendo com que o radical de coloração púrpura seja reduzido para difenil-picril-hidrazina, passando da coloração púrpura para amarelo causando a diminuição da absorbância a 515 nm.

O DPPH é um dos ensaios utilizados para verificar a atividade antioxidante em extratos vegetais ou compostos isolados como os flavonóides e carotenoides, essas substâncias, assim como o trolox possuem a capacidade de complexar o radical DPPH e levar a redução do mesmo (AJILA et al, 2007; ALI et al, 2008; SANTOS et al, 2008). O emprego desses ensaios permite identificar a capacidade antioxidante presente no resíduo de ucuúba. Esse estudo busca reaproveitar esses resíduos como alternativa econômica para valorizar a escala industrial desse fruto através do conhecimento de seus elementos e reduzir o impacto ambiental gerando sustentabilidade para o meio ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Obter extratos hidrofílico e lipofílico padronizados em antioxidantes naturais a partir do resíduo de ucuúba (*Virola surinamensis*).

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os resíduos de ucuúba (*Virola surinamensis*) provenientes da empresa Amazon Oil (Benevides-PA);
- Obter e caracterizar o extrato hidrofílico e lipofílico a partir dos resíduos de ucuúba;
- Identificar e quantificar no extrato hidrofílico os metabolitos majoritários por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antioxidante através dos métodos DPPH e ABTS dos extratos hidrofílico e lipofílico a partir dos resíduos de ucuúba;
- Avaliar a atividade antimicrobiana (CIM E CBM) e atividade citotóxica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para realização deste estudo foram utilizadas 1,360g de torta de ucuúba provenientes da secagem a frio das sementes, coletadas no mês de maio de 2016. A amostra foi cedida pela empresa Amazon Oil, situada em Benevides - Pará.

4.1.1. SOLVENTES:

Metanol (Synth), etanol (Start), hexano (Synth);

4.1.2. REAGENTES:

Hidróxido de sódio 0,1N (Vetec), hidróxido de potássio 0,1 N (Synth), Folin-Ciocalteau 2N (Sigma Aldrich), cloreto de Alumínio 2% (Synth), persulfato de potássio (Impex);

4.1.3. PADRÕES:

Rutina hidratada (CAS 153-18-4) \geq 95% (Sigma-Aldrich), 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico] (CAS 30931-67-0) - \geq 98%, (Sigma-Aldrich), (\pm) -6, 2, 2-difenil-1- picrilidrazilo (CAS 1898-66-4), ácido (\pm) -6 hidroxil-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (CAS 53188-07-1), (Sigma -Aldrich) e β -Caroteno Tipo II, sintético, \geq 95% (HPLC) (CAS 7235-40-7), (Sigma-Aldrich), ácido cafeico (Sigma-Aldrich), ácido vanílico (Sigma-Aldrich), ácido chiquimico (Sigma-Aldrich), catequina (Sigma-Aldrich), epicatequina (Sigma-Aldrich), quercetina (Sigma-Aldrich).

4.2. Métodos

4.2.1. OBTENÇÃO DO RESÍDUO DA UCUÚBA

As sementes foram selecionadas aleatoriamente, no mês de abril e prensadas a frio, após o processamento foram obtidos a gordura e uma matriz sólida denominada torta (usada como matéria prima deste estudo). 1, 300 g do resíduo foi coletado logo após o processo de extração da gordura e levado ao Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, o qual foi armazenado a -20°C para posterior avaliação. O resíduo foi submetido a secagem em

estufa de circulação de ar a temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A cada intervalo de uma hora pesava-se o material até se obter peso constante totalizando o tempo de 24 horas. Em sequência da etapa de secagem a amostra foi triturada em moinho de facas, reduzindo o tamanho de suas partículas. Após esse processo o resíduo passou a ser chamado de pó e foram acondicionados em freezer a temperatura de -20°C .

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ

4.2.2.1. Determinação de Distribuição Granulométrica

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). Foram pesados 25g do pó, para a tamização, a amostra foi inserida em um agitador de peneira eletromagnético com conjunto de tamises de malhas padronizadas 1700, 710, 355, 250, 180 e $125\mu\text{m}$, durante 15 minutos a 3000 rpm. A determinação foi realizada em triplicata e o resultado foi classificado de acordo com o percentual da massa retida em cada tamis.

4.2.2.2. Determinação do Índice de Intumescência

Pesou-se 1g do pó em triplicata transferiu-se para uma proveta de 25 mL com tampa. Posteriormente, foi adicionado água destilada até completar o volume da proveta, agitando a cada 10 minutos no período de uma hora. As amostras ficaram em repouso durante 3 horas em temperatura ambiente. Realizou-se a medida do volume (mL) do material acrescido subtraído do volume do material inicial do pó. O índice de intumescência foi calculado a partir das determinações realizadas e relacionada a 1g do pó (Farmacopéia Brasileira 5ª edição, 2010).

4.2.2.3. Determinação da Umidade

A umidade foi realizada em balança de infravermelho (IV 2000 GEHAKA). Foram pesados 2g do pó e aquecidos até 105°C , no período de 15 minutos. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram calculados pela média das três determinações expressos em porcentagem (%).

4.2.2.4. Composição Centesimal

A determinação da análise centesimal foi realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Belém-PA). Neste ensaio, investigou-se resíduo mineral fixo (cinzas), teor de lipídeos, proteínas, fibras e carboidratos a partir de 100 g do pó (AOAC, 1997).

4.2.2.5. Determinação da Atividade de Água

A atividade de água (A_w) foi realizada no equipamento *Aqualab Dew Point Water Activity meter 4TEV*. A amostra (7mg) foi colocada no equipamento para realização da análise (ROA e DAZA, 1991). O resultado foi determinado de acordo com a Equação1:

$$a_w = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

P= Pressão vapor da água no material

Po= Pressão vapor da água pura

4.2.2.6. Obtenção do Perfil Espectroscópico na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Uma pastilha foi preparada com 1 mg do pó e 99 mg de KBr. A mesma foi inserida no equipamento de infravermelho. Para obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (Shimadzu IRPrestige-21®). Os parâmetros utilizados na análise foram: faixa de absorção de número de ondas de 4000 – 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e número de varredura de 20 scans (SILVA JR. et al, 2006).

4.2.2.7. Determinação do Perfil Termogravimétrico

A obtenção da curva de termogravimétrica (TG) do pó do resíduo de ucuúba foi obtida em termo balança TGA-50, Shimadzu. No cadinho de alumínio pesou-se

aproximadamente 9 mg da amostra, a qual foi submetida à atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min e na faixa de temperatura de 25 a 600°C e razão de aquecimento de 10°C/min. Os resultados obtidos foram analisados no software TA-60W Shimadzu (COSTA et al; 2011).

4.2.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROFÍLICO

A tintura foi obtida em temperatura ambiente por meio do método de percolação (Zétola et al, 2002) com adaptações: proporção amostra solvente e proporção etanol/água do solvente extrator. Cerca de 200 g do pó foi colocado em contato com o líquido extrator etanol/água (70:30, v/v), na razão de 1:10, totalizando 2L de tintura. A percolação foi realizada pelo método de gotejamento constante do solvente (20 gotas por minuto) até o esgotamento da amostra.

O extrato concentrado foi obtido em rotaevaporador (Heidolf- modelo Laboreta 4000), com condições de temperatura e rotação monitoradas (40°C e 40 rpm) até a evaporação do solvente. Foram transferidas aliquotas de 5 mL do extrato concentrado para recipientes de vidro e submetidos a congelamento (- 20°C) e posteriormente foram liofilizadas usando o liofilizador (LIOTOP - modelo 101). O tempo de liofilização foi em torno de 72 horas.

4.2.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO LIPOFÍLICO

O extrato lipofílico foi obtido através do método de maceração dinâmica (Buriol et al, 2009) com o auxílio da placa magnética (Fisatom – Mod. 752A), no qual 5 g de pó do resíduo de ucuúba foi transferido para um béquer e colocado em contato com o solvente óleo de soja (SIOL[®]) em um béquer na razão 1:10 totalizando 50 mL. O bequer foi coberto com papel alumínio para evitar a exposição do extrato a luz ambiente. A mistura óleo e pó ficou em maceração durante 5 dias, após esse período foi obtido o extrato lipofílico sendo em seguida armazenado em geladeira.

4.2.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO

4.2.5.1. Determinação da Densidade Aparente

A densidade aparente foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira (5ª edição, 2010), utilizando o método do picnômetro. Pesou-se o picnômetro (5 mL) vazio e em seguida, ele foi preenchido com água recém destilada e pesado novamente. Por fim, transferiu-se o extrato hidrofílico de ucúba para o picnômetro e o pesou. O mesmo procedimento foi realizado para o extrato lipofílico. A densidade aparente foi calculada pela razão entre a massa do extrato e a massa da água. A análise foi feita em triplicata à temperatura de 25° C.

4.2.5.2. Determinação de pH

A medida do potencial hidrogeniônico do extrato hidrofílico e lipofílico foi realizado no potenciômetro (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 9321). O mesmo foi calibrado com soluções de tampão pH 4,0 e 7,0. O resultado foi realizado através da média das triplicatas (Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010).

4.2.5.3. Determinação do Índice de Acidez

Para a realização da determinação do índice de acidez foram pesadas 2g do extrato hidrofílico e transferidas para erlenmeyer, onde foram adicionados 50 mL de água destilada e três gotas do indicador fenolftaleína. Já para o extrato lipofílico foram adicionados 2g do mesmo em um Erlenmeyer e adicionado 25 mL da mistura éter etílico: álcool etílico (2:1), 3 gotas de do indicador fenolftaleína, sendo homogeneizado. A titulação dos dois extratos foi realizada com a solução de hidróxido de sódio a 0,1 M até as amostras apresentarem a coloração rósea e permanecer por 30 segundos. Os resultados foram obtidos seguindo a Equação 2 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$V \times f \times 100 / P \times c = \% \text{ de acidez em solução molar (v/m)} \quad (2)$$

No qual:

V = nº de mL da solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M gasto na titulação

f= fator da solução de KOH 0,1 M

P= N° de g da amostra usado na titulação

C= correção para solução KOH 1 M, 10 para solução KOH 0,1 M e 100 para solução KOH 0,01 M.

4.2.5.4. Determinação de Umidade

Foi determinado seguindo a metodologia do item 4.2.2.3.

4.2.5.5. Obtenção do Perfil Espectroscópico na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Colocou-se um 1 mg do extrato hidrofílico liofilizado no suporte ATR no espectroscópio para leitura. O mesmo procedimento foi realizado para o extrato lipofílico. O aparelho utilizado para obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Shimadzu IRPrestige-21®. Os parâmetros utilizados na análise foram faixa de absorção de número de ondas de 400 – 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e número de varredura de 20 scans.

4.2.5.6. Determinação do Perfil Termogravimétrico (TG)

Foi determinado seguindo a metodologia do item 4.2.2.6 para o extrato hidrofílico liofilizado e extrato lipofílico.

4.2.6. DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS DO EXTRATO HIDROFÍLICO

A determinação de polifenóis foi realizada utilizando o espectrofotômetro na faixa do UV-Vis (espectrofotômetro Shimadzu UV 1800) utilizando o reagente o Folin-Ciocalteu (Aliakbarian et al, 2012). Uma alíquota (100 μL) de extrato hidrofílico concentrado de ucúba foi diluída 50 vezes em água destilada. 1g do extrato

hidrofílico liofilizado foi dissolvido em 1 mL de água destilada e em seguida foi diluído 10 vezes (500 µL). Em seguida, os extratos hidrofílicos concentrado e liofilizado foram diluídos e misturados com hexano na proporção 1:2 respectivamente, para retirada da gordura presente no extrato. A mistura gerou duas fases, o precipitado e o sobrenadante. Este último foi transferido para o tubo de ensaio e adicionado 2,4 mL de água destilada. O meio reacional foi composto por 0,1 mL de amostra, 0,25 mL de Folin – Ciocalteu 2N, 0,5 mL de solução saturada de Na_2CO_3 e 1,75 mL de água destilada, totalizando o volume final de 5 mL, a reação teve a duração de 1 hora ao abrigo de luz. Após esse tempo o branco constituído apenas de água e as amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda 725 nm, e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama (EAG mg/g).

4.2.7 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES DO EXTRATO HIDROFÍLICO

A determinação de flavonoides totais foi realizada de acordo o método de Nunes et al (2001). A técnica consiste na capacidade dos flavonoides absorverem radiação eletromagnética na faixa do Ultra Violeta (UV), no comprimento de onda de 350 nm. As amostras de extrato concentrado e extrato liofilizado de ucuúba foram diluídas 70 vezes e 4 vezes respectivamente. A água foi utilizada como branco para calibrar o espectrofotômetro (Shimadzu UV 1800). A curva padrão foi preparada com padrão de rutina utilizado nas seguintes concentrações: 5; 10; 15; 20 e 25 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em equivalente de rutina (mg ERT/g).

4.2.8. DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES DO EXTRATO LIPOFÍLICO

A concentração de carotenoides totais foi avaliada pelo método espectrofotométrico UV/Vis (Shimadzu UV 1800), segundo Goula et al (2016). Um grama de extrato lipofílico foi pesado e dissolvido em hexano até um volume final de 4 mL. O conteúdo de carotenoides foi calculado a partir do valor de absorção (A), da solução de óleo em 470 nm e o coeficiente específico para o β -caroteno, $E_o = 2590$, d = diluição da amostra. Os resultados foram realizados em triplicata e expressos em µg carotenoides/ g, seguindo a equação (3) abaixo.

$$C = A \times 10^6 / 2590 \times 100 \times d \quad (3)$$

4.2.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO

Para a realização das análises antioxidantes a amostra passou por uma preparação, onde 1g de extrato oleoso foi pesado e posteriormente foi adicionado 5 mL de etanol e homogeneizado no vortex (Vixar) por 15 minutos. Foram obtidas duas fases o precipitado e o sobrenadante sendo este último armazenado em frasco âmbar na temperatura de 8° C. A fração obtida que foi utilizada para a realização das análises de DPPH e ABTS.

4.2.9.1. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método de captura do radical ABTS

A solução reagente foi obtida por meio da mistura de 25 mL de solução aquosa de ABTS (7mM) e 440µL da solução aquosa de persulfato de potássio (140mM). A solução reagente foi mantida no escuro por 16 horas, após transcorrido esse tempo a solução foi diluída com água destilada até obter a absorbância aproximada de 0,7 em 734 nm usando espectrômetro Shimadzu UV 1800.

A leitura do extrato hidrofílico concentrado, liofilizado e extrato lipofílico foram realizadas após as diluições de 50, 10 e 5 vezes respectivamente. O meio reacional foi obtido por meio da adição de 150µL da amostra em 3 mL da solução reagente de ABTS e mantido ao abrigo de luz. Após o tempo de 2 minutos de reação, foram realizadas as leituras das amostras. Água destilada foi utilizada como branco para a calibração do espectrofotômetro. Para construção da curva padrão foram preparadas concentrações de 75 a 175 µM/L do padrão Trolox. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em µM equivalente de Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) por grama de amostra (Re et al, 1999).

4.2.9.2. Determinação da atividade antioxidante in vitro pelo método de Redução do Radical DPPH

Na execução deste ensaio as amostras extrato hidrofílico concentrado, liofilizado e extrato lipofílico foram diluídas 50, 10 e 5 vezes respectivamente. O meio reacional foi constituído de 75 µL das amostras diluídas, transferidas para cubetas de vidro, e adicionado 2925 µL da solução radicalar de DPPH em metanol (solução de DPPH 25 mg/L) totalizando o volume de 3 mL. Durante os 30 minutos de reação as amostras ficaram protegidas da luz, a leitura das amostras após o tempo de reação foi realizada em 515 nm. O metanol foi utilizado como branco, para calibrar o espectrofotômetro Shimadzu® UV 1800. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em equivalente de µM Trolox por litro de amostra (Brand-Williams, 1995 adaptado por Tepe e Sokmen, 2007). Foi realizada a capacidade de sequestrar radical expressa como percentual de inibição dos radicais livres de acordo com a equação 5, apenas para o extrato hidrofílico.

$$\% \text{ inibição} = (\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle} \quad (4)$$

4.2.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PARA OBTENÇÃO DE CIM E CBM DO EXTRATO HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO

4.2.10.1. Microrganismos utilizados e manutenção das cepas

Para a realização da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de referência ATCC (American Type Culture Collection - ATCC) dos micro-organismos Gram-positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e Gram-negativo (*Escherichia coli* ATCC 8739), obtidas a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro). As mesmas foram mantidas em ágar nutriente, à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Para a realização dos ensaios, as bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo meio específico para cada bactéria. *S. aureus* foi semeado em meio ágar manitol e *E. coli* em ágar macconkey. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em estufa para verificação do crescimento, para posterior preparação dos inóculos.

4.2.10.2. Preparo dos inóculos bacterianos

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 6538) e *E. coli* ATCC (8739). A obtenção dos inóculos seguiu a norma M7-A8 vol. 29 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico”.

Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias foram selecionadas e transferidas para tubo estéril contendo 1 ml de meio caldo Mueller-Hinton. Quando necessário, foi realizado os ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, foi realizado a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo 1×10^8 UFC/ml por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inoculo 1×10^3 UFC/ml.

4.2.10.3. Teste de microdiluição

O método empregado foi microdiluição em placa de 96 poços (ALVES et al 2008). Os extratos foram diluídos com solvente DMSO para a realização dos testes. Após a diluição, 100µL de cada concentração foi adicionada em poços das microplacas juntamente com 100µL de inóculo bacteriano (1×10^3 UFC/mL), obtendo as diferentes concentrações por poço da placa. Cada ensaio foi realizado em duplicata para cada concentração de extrato acima descrita e cada bactéria testada. Como controle negativo foi utilizado o DMSO (solvente) e para controle positivo o cloranfenicol (antimicrobiano comercial) contra bactérias gram-positivas (250 µg/mL) e a penicilina-estreptolisina para bactérias gram-negativas (10000unit/10mg). Ao final deste processo a microplaca foi incubada a 35°C por 24 horas.

4.2.10.4. Obtenção da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a obtenção de CIM será utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina (MONTEIRO et al 2012). A resazurina é um corante que apresenta uma coloração azul, utilizado como referência em testes para verificar a viabilidade de células, na presença destas, sofre uma redução, sendo transformada em resofurina e mostrando uma coloração rosa (ALVES et al 2008; MONTEJANO et al 2005).

Após o termino do tempo de incubação na microplaca foram acrescentados 15µL de resazurina a 0,01% em cada poço, para identificação da CIM. Um período de 3 horas será necessário para a reação com a resazurina. A interpretação dos resultados foi observada visualmente.

4.2.10.5. Obtenção da concentração bactericida mínima (CBM)

A CFM será obtida a partir da técnica de contagem de unidade formadora de colônia (UFC). Esta metodologia será realizada após a técnica de microdiluição em microplacas, no qual se obteve o CIM, conforme descrito acima.

Para a obtenção do CBM, 10µL de cada poço contendo diferentes inóculos bacterianos e extratos com resultados efetivos de atividade antimicrobiana serão semeados em placas de petri contendo Ágar Miller Hinton (AMH), em seguida incubados por mais 24 horas a 37°C para posterior leitura das UFC e obtenção da concentração capaz de matar pelo menos 99 a 100% dos micro-organismos. Todos os ensaios foram realizados com o controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol foi utilizado em bactérias gram-positivas na concentração de 250 µg/ml, já para bactérias gram-negativas, penicilina-estreptolisina foi o antibiótico de escolha para controle de positivo, na concentração 10000unit/10mg.

4.2.11. ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO HIDROFÍLICO

4.2.11.1. Obtenção e cultivo das células

A linhagem de macrófagos peritoneais de camundongos J774.A1 foi cedida pelo Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, do Instituto de Ciências

Biológicas da Universidade Federal do Pará. Os macrófagos foram mantidos em garrafas de cultivo celular em meio DMEM suplementado com SFB 10%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

O repique é realizado quando se observa 80% de confluência celular utilizando tripsina/EDTA a 0,05%. Após adição da tripsina/EDTA, as garrafas com os macrófagos foram colocadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 5 minutos para tripsinização das células aderentes. Em seguida, foi adicionado soro para inativação da tripsina e os macrófagos foram transferidos para tubo de centrifugação (15 mL) e centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de meio. Foi realizado contagem em câmara de Neubauer e as células foram plaqueadas com a concentração adequada para o experimento.

4.2.11.2. Método Thiazolyl Blue (MTT)

Este estudo foi realizado no laboratório de Biologia Estrutural, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (SIGMA) é um sal tetrazolium, que após ser clivado por desidrogenases mitocondriais, é convertido em cristais azuis de formazan solúveis apenas em solventes orgânicos. Os cristais formados após clivagem são impermeáveis às membranas celulares e acumulam-se em células metabolicamente viáveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Ao adicionar dimetilsulfóxido (DMSO), estes cristais de formazan são solubilizados, sendo o produto final da reação lido por espectrofotometria.

Para realização deste teste, os macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.2.11.1. Em placas de 96 poços, 1×10^3 macrófagos foram plaqueados por poço e submetidos ao tratamento com os extratos liofilizado de ucúba nas concentrações de 0.5, 5, 10, 50 e 100µg/mL e com extrato concentrado de ucuúba nas diluições de 1:80, 1:40, 1:20, 1:10 e 1:1, por 24 horas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após esse período, foi retirado o sobrenadante, os poços foram lavados com PBS pH 7.2 para em seguida foi adicionado 0,5 mg/mL de MTT diluído em PBS pH 7.2 para incubação a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 3 horas.

Após incubação com MTT, o sobrenadante foi retirado e 200 µL de DMSO foi adicionado em cada poço para solubilização dos cristais de formazan com incubação

em placa agitadora por 10 minutos. Posteriormente, a solução final foi lida em espectrofotômetro (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) com comprimento de onda de 570 nm. O controle negativo utilizado foi células mortas com solução de formol a 10% em PBS. O CC_{50} para os macrófagos foi determinado utilizando o programa SigmaPlot (version 12).

4.2.12. VALIDAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS MAJORITÁRIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PRESENTES DO EXTRATO HIDROFÍLICO.

A validação do marcador do extrato hidrofílico do resíduo de ucuúba, seguiu a RE 899/23 (ANVISA, 2003), que trata da validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent 1260 infinity) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (UV/visível) (Agilent 1260 infinity), com célula eletroquímica (Agilent 1260 infinity). A coluna utilizada foi uma XDB C18, 4,6 x 250 mm, com 5 μ m de tamanho de partículas. A separação das amostras foi feita com fluxo constante de 0,8 mL/min, com um volume de injeção de 10 μ L do padrão e 20 μ L de amostra e a temperatura da coluna 40°C. O sistema eluente utilizado foi um gradiente (Tabela 2) com os seguintes solventes: água ácida (A) e metanol (B).

Para realização da análise de identificação do marcador por CLAE foi adaptado o método de Iacopini et al (2008). Os marcadores utilizados foram catequina, epicatequina, quercetina, rutina, ácido vanílico, ácido chiquimico e ácido caféico, porém apenas foi identificado o ácido caféico na amostra. Foi utilizado comprimento de onda na faixa de 210 a 600 nm.

Tabela 2: Condições do método - sistema gradiente da fase móvel aplicada para identificação e validação do marcador ácido caféico.

Tempo (min)	Solvente A (água ácida)	Solvente B (metanol)
0	90	10
5	90	10
7	75	25
9	50	50
24	50	50
27	90	10

Parâmetros de Validação:

a) Linearidade

Esse parâmetro foi realizado a partir da solução padrão de 1mg/ mL de ácido caféico solubilizada em metanol. Foram construídas três curvas analíticas a partir da solução padrão com concentrações de 2; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL, com a finalidade de avaliar a relação linear entre a concentração do analito e as absorvâncias obtidas. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico de concentração versus absorvância da amostra obtendo o r^2 e o coeficiente de correlação da curva analítica.

b) Seletividade

Se trata de um parâmetro qualitativo, onde é importante demonstrar a capacidade de seleção do método, a partir da identificação do analito no meio de outros compostos.

Para realização dessa análise foi injetado no cromatografo a amostra extrato hidrofílico, o padrão de ácido cafeico e a amostra contaminada com padrão para confirmar a presença do mesmo na amostra estudada.

c) Precisão

E o parâmetro que busca avaliar a proximidade entre os resultados de uma

série de medidas. Para avaliar a precisão do método foi utilizada a precisão por repetibilidade, sendo analisada a partir de 6 determinações de concentração teórica de 50 µg/mL. Os resultados foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV) (Equação 5).

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100 \quad (5)$$

d) *Exatidão*

É quando o método analítico apresenta proximidade de seus resultados com o valor real, utilizando o mesmo método de estudo. Foram avaliados 3 concentrações 2; 12,5 e 50 µg/mL em triplicata. Os resultados foram expressos seguindo a equação (6) abaixo.

$$R(\%) = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (6)$$

e) *Limites de Detecção e Quantificação*

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de um analito presente em uma amostra que pode ser detectado e o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão. Os resultados foram calculados a partir das equações abaixo (7 e 8).

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (7)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (8)$$

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração.

IC= coeficiente angular da curva analítica.

f) *Robustez*

Nesse parâmetro avalia a capacidade do método de resistir a variações dos parâmetros analíticos. A robustez foi avaliada através da leitura da concentração de 50 µg/mL em triplicata, alterando a temperatura do método desenvolvido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Processamento e caracterização do resíduo de ucuúba

5.1.1. PÓ OBTIDO DO PROCESSAMENTO DO RESÍDUO DE UCÚUBA

O resíduo foi coletado logo após a prensagem das amêndoas para evitar maiores contaminações. A realização do processo de secagem, após a obtenção do resíduo foi fundamental, pois pode favorecer o processo de conservação e estabilidade dos biocompostos uma vez que diminui a possibilidade de contaminação por microrganismo, degradação enzimática e oxidativa. O pó (Figura 7) obtido após o processo de moagem do resíduo de ucuúba.



Figura 7: Pó do resíduo de *Virola surinamensis*, após processo de secagem e pulverização.

O reaproveitamento dos resíduos oriundos de processos agroindústrias vem se destacando, principalmente os resíduos oriundos da indústria de alimentos, pois parte da polpa e sementes são desperdiçados. Pensa-se que o reaproveitamento dos mesmos evitaria a contaminação do meio ambiente, bem como agregaria valor ao produto. Logo as agroindústrias têm buscado alternativas para reduzir esse descarte inapropriado e a utilização dos mesmos como potencial matéria prima no desenvolvimento de novos produtos (UCHOA et al, 2008).

5.2 Caracterização físico-química do pó obtido do resíduo da ucuúba

5.2.1. DETERMINAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

Com base na Farmacopéia Brasileira 5^o edição (2010), a determinação de distribuição granulométrica (Figura 8) o pó foi classificado como muito grosso. A granulometria é uma determinação necessária para o controle de qualidade de produtos de origem vegetal. Pois esse parâmetro está atrelado a superfície de contato e espessura das partículas em contato com o solvente, sendo um dos fatores que pode influenciar no processo de extração, uma vez que, quanto mais grosso o pó, menor a capacidade do solvente de penetrar nas partículas do pó diminuindo a eficiência de extração, outros fatores como a porosidade do pó e a sua constituição também pode influenciar no processo extrativo (Nunes et al., 2005).

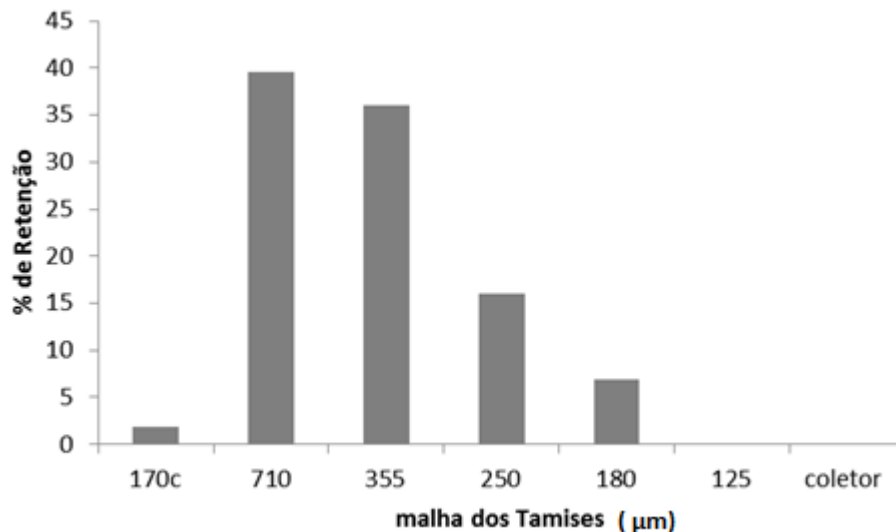


Figura 8: Distribuição granulométrica do pó do resíduo da *Virola surinamensis*.

5.2.2. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INTUMESCIMENTO DO PÓ E TEOR DE SÓLIDOS

O valor de intumescimento obtido nesse trabalho foi de $3 \pm 0,00$ mL este resultado sugere que as partículas do pó absorvem pouco líquido, o que era esperado uma vez que o pó foi classificado como muito grosso (SOUZA, 2014). Esse parâmetro

importante no processo de extração por percolação, uma vez que, fornece a informação a respeito da quantidade de solvente necessário para o processo extrativo por percolação.

5.2.3. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE DO PÓ

O teor de umidade encontrada para o pó de ucuúba foi de $6,73 \pm 0,05\%$ estando de acordo com o limite aceitável de água estabelecido pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), que varia de 6 -15%. Uchoa et al (2008) ao estudar os resíduos de frutas tropicais como o caju, obtiveram o valor de 6,62%, resultado muito semelhante ao obtido nesse estudo. A umidade elevada proporciona condições desfavoráveis para conservação de alimentos, pois afeta a segurança, qualidade e propriedades físicas dos produtos vegetais, já que a partir da quantidade de água encontrada na matéria prima vegetal pode-se prever as condições de armazenamento e secagem, matéria prima quando muito higroscópica pode absorver água através da umidade do ar, o que pode levar a perda do material por contaminação microbiana/fúngica ou mesmo, até a degradação (MICHELIN et al, 2008).

O valor de atividade de água obtido foi de 0,403 inferior a 0,610 – 0,700 que é a faixa onde ocorre deterioração através da presença de fungos. A *Food and Drug Administration* (FDA) define que alimentos e medicamentos que possuem atividade de água inferior a 0,850, tem risco reduzido de crescimento de microrganismos patogênicos e por consequência vão apresentar maior tempo de prateleira (FDA; DITCHFIELD, 2000).

5.2.4. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Ao avaliar os resultados de composição centesimal do pó do resíduo de ucuúba, foi possível observar que o mesmo apresenta quantidades significativas de macronutrientes (Tabela 3).

Tabela 3: Determinação da composição centesimal do pó de ucuúba.

Amostra	Ensaio	X (%) ± DPR
Pó do resíduo (Ucuúba)	Cinzas	9,33 ± 0,02
	Fibras	11,67 ± 0,73
	Lipídios	16,67 ± 0,36
	Proteínas	38,32 ± 0,19
	Carboidratos*	30,56

Dados expressos como média da triplicata ± desvio padrão relativo; X = média dos resultados independentes; DPR= desvio padrão relativo; (*) Calculado por diferença.

Um estudo de composição centesimal realizado para a semente de ucuúba por Carneiro e colaboradores (2015), apresentou resultados (Tabela 3) de cinzas (2,1%) e proteínas (38,32 ± 0,19) inferiores ao obtido para o pó do resíduo de ucuúba. O teor de fibra (11,67 ± 0,73%) obtido nesse estudo foi semelhante ao encontrado para o bagaço de caju (9,92±0,4%) por Uchoa e colaboradores (2008). Os alimentos ricos em fibra podem auxiliar na prevenção de doenças gastrointestinais, pois desempenha funções importantes no metabolismo de lipídios e carboidratos, promove absorção mais lenta dos nutrientes, fornece a sensação de saciedade ao organismo, dessa forma apresenta potencial para o desenvolvimento de produtos alimentícios.

O resíduo de ucuúba apresentou carboidrato (Tabela 3) superior ao obtido para semente de maracujá (8,30%) (UCHOA et al, 2008). O teor de lipídios obtido nesse estudo foi abaixo que o encontrado por Carneiro e colaboradores (2015) para a semente de ucuúba (40,5%), o que era esperado, uma vez que o resíduo é gerado após o processo extrativo da gordura. Os lipídios representam a porção calórica e energética dos frutos, as partes do fruto como casca, caroço e semente costumam concentrar elevado teor desse macronutriente, o resíduo de ucuúba é oriundo do processo extrativo da gordura, mostrando que mesmo após esse processo ainda possui quantidade expressiva de lipídios (FERNANDES et al, 2008; MARQUES et al, 2010). As frutas apresentam quantidade expressivas de carboidrato, mas no geral não são grandes fontes de proteínas, mas podem ainda estar presente na casca e semente dos frutos (SOUZA et al, 2011).

A quantidade significativa desses macronutrientes no resíduo de ucuúba revela que esta matéria prima, até então descartada, possui potencial para o desenvolvimento de ração animal, ou até mesmo podendo ser incorporado na dieta humana, além de seu aproveitamento contribuir para a redução do acúmulo de lixos agroindustrial.

5.3. Obtenção e caracterização do extrato hidrofílico e lipofílico

5.3.1. DENSIDADE RELATIVA, ACIDEZ, PH E TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO HIDROFÍLICO

Após o processo de percolação, o extrato foi concentrado (Figura 9) até a máxima evaporação do solvente. A cada 200g de pó, foi obtido 17,78g de extrato seco por liofilização, calculando rendimento de 8,89% (Figura do extrato hidrofílico concentrado).



Figura 9: Extrato hidrofílico concentrado do pó obtido do resíduo da *Virola surinamensis*.

A densidade obtida nesse trabalho para o extrato hidrofílico do resíduo de ucuúba foi de $0,994 \pm 0,01$ (Tabela 2), sendo próximo ao obtido por Souza (2014) para o extrato hidroetanólico das cascas de ceville que foi de 1,02. Esse parâmetro é fundamental para a estabilidade e qualidade do processo de preparação do extrato vegetal.

Na Tabela 4 encontramos o valor de pH ($5,17 \pm 0,01$) e acidez ($1,78 \pm 0,01$ mgKOH/g) são um dos fatores que contribuem para que o extrato estudado tenha menor possibilidade de contaminação microbiana. A presença da acidez em uma substância é favorável à conservação da mesma, uma vez que dificulta a proliferação de microrganismos. O pH também pode atuar como indicador de possíveis alterações químicas das substâncias extraídas, pois é um dos prováveis indicadores da estabilidade de várias substâncias presentes no extrato vegetal (LONGHINI et al, 2007; UCHOA et al, 2008; SOUZA, 2014).

Tabela 4: Caracterização físico-química do extrato concentrado obtido através do extrato de ucuúba.

Amostra	Ensaio	Índice (X (%) \pm DPR)
	Densidade relativa	$0,994 \pm 0,01$
Extrato concentrado	Acidez (mg KOH/g)	$1,7 \pm 0,1$
	pH	$5,17 \pm 0,01$

Dados expressos como média da triplicata \pm desvio padrão relativo; DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação; n=3.

5.3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO LIPOFÍLICO

Após o processo de extração do resíduo de ucuúba utilizando óleo de soja, o extrato obtido passou a ser denominado de extrato lipofílico (Figura 10). O extrato oleoso foi filtrado para realização dos ensaios de carotenóides e atividade antioxidante.



Figura 10: Extrato lipofílico proveniente do pó de *Virola surinamensis*

O uso de solventes a base de petróleo apresenta riscos para saúde. Assim, o uso de solventes verdes como os óleos vegetais vem atuando como alternativas viáveis para o processo extrativo, pois reduzem os riscos para a saúde e são seguros para o meio ambiente por se tratarem de fontes renováveis (LI et al, 2013).

O extrato lipofílico foi caracterizado em relação aos parâmetros físico-químicos para o controle de qualidade do extrato, como densidade relativa e acidez (Tabela 5).

Tabela 5: Caracterização físico-química do extrato oleoso do resíduo de ucuúba

Amostra	Análises	Resultado \pm DP
Extrato Lipofílico	Densidade (g/mL)	0,89 \pm 0,001
	Índice de acidez (mgKOH/g)	1,8 \pm 0,28
Óleo de soja	Densidade relativa (g/mL)	0,916*
	Índice de acidez (mgKOH/g)	0,3*

Dados expressos como média da triplicata \pm desvio padrão relativo. (*) Fonte: ANVISA - sobre o óleo de soja.

A densidade relativa encontrada para o resíduo de ucuúba foi de 0,89 \pm 0,001 (Tabela 5). Por se tratar de um extrato utilizando como solvente óleo vegetal não possui densidade descrita na literatura, foi observado que a densidade se manteve bem próxima a densidade do óleo de soja (0,916 g/mL) utilizado. Com bases nesses resultados, considera-se que o contato do coproduto de ucuúba com o óleo durante o processo extrativo não apresentou grandes alterações em relação a densidade, estando de acordo com o valor estabelecido pela ANVISA (ANVISA, 1999).

O índice de acidez (AI) foi de 1,8 \pm 0,28 mgKOH/g (Tabela 5). Apesar de não encontrar especificações na literatura para esse tipo de extrato, tem-se que o do

extrato oleoso de ucuúba foi bem mais elevado que o do óleo de soja. Este IA está próximo ao estabelecido pela ANVISA para o óleo de castanha do Brasil que pode ser no máximo 4 mgKOH/g (FERREIRA et al, 2006; ANVISA, 1999). Indicando que o extrato oleoso do subproduto de ucuúba atende as especificações de controle de qualidade e conservação com base nos parâmetros de densidade e acidez.

5.3.3. ESPECTROSCOPIA DA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO PÓ E DO EXTRATO HIDROFÍLICO LIOFILIZADO

Ao se analisar as principais bandas de absorção obtidas pela FTIR do pó e do extrato liofilizado do subproduto de ucuúba, foi possível identificar grupos funcionais (Tabela 6) característicos das bandas de absorção obtidas, e assim, conhecer um pouco sobre o perfil da amostra estudada. Os espectros do FTIR do pó e do extrato liofilizado de ucuúba encontram-se na Figura 11, que foi possível observar bandas das respectivas amostras, conforme apresentadas na Tabela 6.

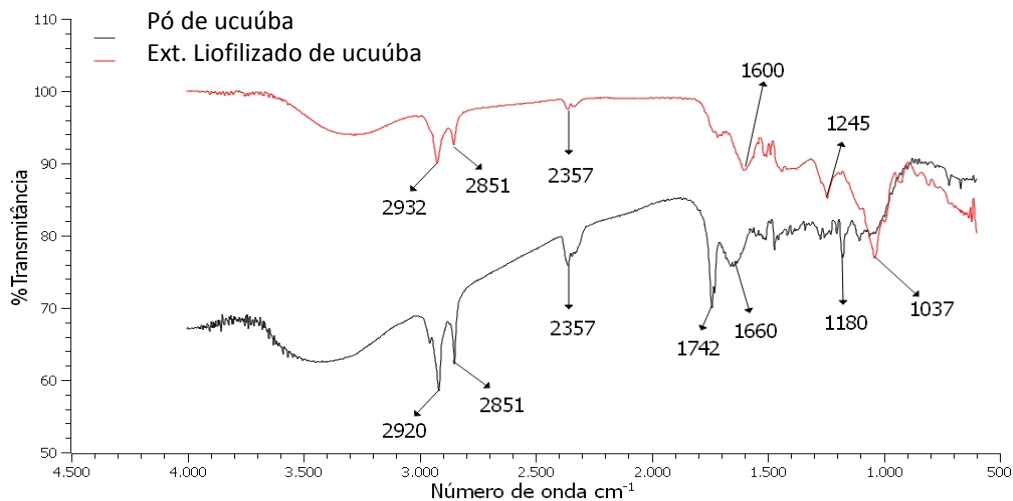


Figura 11: Espectro de absorção do FTIR do pó e extrato liofilizado do resíduo de ucuúba.

Tabela 6: Bandas de FTIR do pó e extrato liofilizado do resíduo de ucuúba.

Número de Onda cm^{-1}	Grupo Funcional
2920	-C-H vibração de deformação axial
2932	-C-H vibração de deformação axial
2851	-C-H vibração de deformação axial
2357	N-H vibração de deformação axial
1742	C=O deformação axial carbonila
1660	C=C deformação axial do anel
1600	C=C deformação axial do anel
1245	$\equiv\text{C}-\text{H}$ vibração harmônica de deformação angular
1180	-C-O vibração de deformação axial de álcoois e fenóis
1037	C(=O)-O deformação axial

A Figura 11 mostra as bandas de absorção 2920 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} do pó e 2932 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} do extrato liofilizado que são referentes a estiramentos dos hidrocarbonetos (-C-H). O pó e o extrato liofilizado apresentaram a banda de absorção 2357 cm^{-1} , sugestivo de grupamento amida. A banda de absorção 1742 cm^{-1} (Tabela 6) presente no pó é atribuída ao estiramento da carbonila, que está relacionada possivelmente ao grupo dos polifenóis e carboidratos (MELO, 2015). Houve estiramento nas bandas 1660 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} do pó e do extrato característico de deformação axial do anel (C=C). O extrato apresentou banda de absorção 1245 cm^{-1} , característica de vibração harmônica angular ($\equiv\text{C}-\text{H}$). O pó e o extrato apresentaram respectivamente bandas de intensidade 1180 cm^{-1} e 1037 cm^{-1} , características da deformação axial (-C-O) e (C(=O)-O) sugestivo de álcoois e fenóis (SILVA JUNIOR et al, 2006; SILVERSTEIN et al, 2007). Contudo, por se tratar de um extrato vegetal e apresentar grupamentos complexos em sua constituição, torna-se difícil obter

informações mais conclusivas sobre os grupamentos químicos das substâncias de interesse.

5.3.4. ESPECTROSCOPIA DA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO PÓ E DO EXTRATO LIPOFÍLICO

O espectro do FTIR do extrato lipofílico (Figura 12) é semelhante ao do óleo de soja (Figura 12), ambos possuem as mesmas bandas de absorção (Tabela 7). Ao realizar a comparação o FTIR do pó do coproduto de ucuúba (Figura 13) com o extrato oleoso pode-se supor que a presença do pó durante o processo extrativo não alterou o FTIR do óleo como ocorre na extração alcoólica (Figura 12). O resultado obtido corresponde ao do óleo de soja como o obtido no trabalho de Aliske (2010). O óleo de soja é uma alternativa de solvente que vem se destacando na extração de metabólitos secundários, neste trabalho ele não apresenta nenhum dado primário por meio da análise de espectroscopia da região de infravermelho.

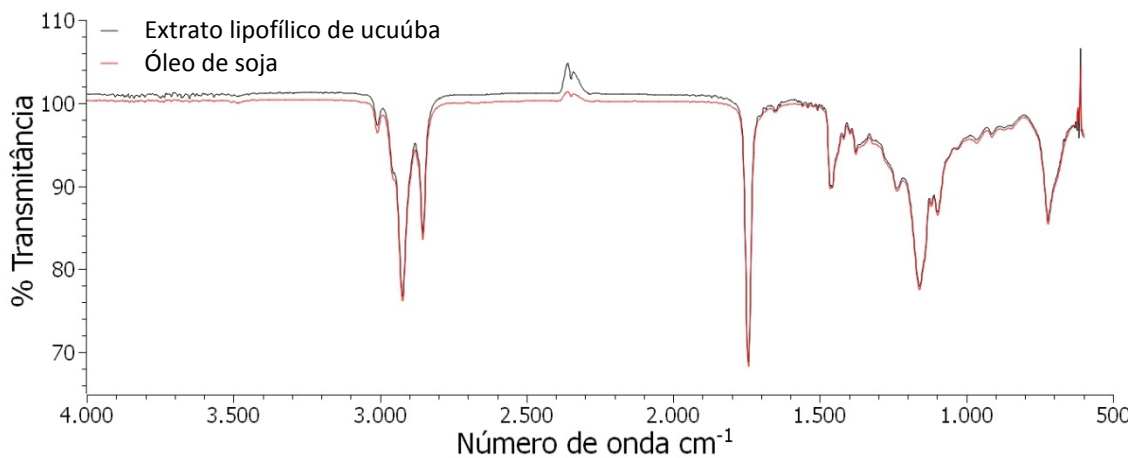


Figura 12: Espectro de absorção do FTIR do extrato oleoso do resíduo de ucuúba e do óleo de soja.

Tabela 7: Bandas de FTIR do extrato lipofílico do resíduo de ucuúba e do óleo de soja.

Número de Onda cm ⁻¹	Grupo Funcional
3009	-C-H vibração de deformação axial de ligação dupla
2923	-C-H vibração de deformação axial
2854	-C-H vibração de deformação axial
1745	C=O deformação axial carbonila (ésteres alifáticos)
1461	-C-H Deformação angular de
1160	C–O vibrações de deformação axial
718	-C-H deformação angular simétrica no plano

5.3.5. OBTENÇÃO DO PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO (TG) DO PÓ E DO EXTRATO HIDROFÍLICO LIOFILIZADO

A termogravimetria, fornece informação sobre a variação de massa da amostra em função do tempo e da temperatura sob determinadas condições atmosféricas, permitindo avaliar a estabilidade do pó e do extrato da *Virola surinamensis*. É uma das técnicas termoanalíticas mais utilizadas (IONASHIRO e GIOLITO, 1980).

A curva TG do pó (Figura 13) da *Virola Surinamensis* apresentou a ocorrência de dois eventos característicos de perda de massa. O primeiro evento apresentou a faixa de 40,14°C a 100,69°C com perda de massa de 4,60% (Tabela 8) quando se avalia junto ao método gravimétrico (6,73%) os resultados obtidos pode-se supor que a massa perdida na análise termogravimétrica é referente a perda de água residual e evaporação dos compostos voláteis presentes na amostra, podendo avaliar que a perda de água pelo método gravimétrico e pela análise térmica são compatíveis (COSTA et al, 2011; COSTA et al, 2013).

O Segundo evento (Tabela 8) ocorreu a partir da faixa de 307,20° C a 387,50°C com perda de massa de 62,34%, essa grande perda de massa pode estar relacionada a reações sucessivas de decomposição de carboidrato e outros componentes orgânicos presentes no pó (FREITAS, 2010; OWITI, 2011; COSTA et al, 2013).

Tabela 8: Etapas de perda de massa da curva de TG do pó e extrato liofilizado da *V. surinamensis* na atmosfera de ar sintético.

Amostra	T_{onset}	T_{endset}	% de perda de massa
Pó da <i>V. surinamensis</i>	40,14	100,69	4,60%
	307,20	387,50	62,34%
Extrato Liofilizado da <i>V. surinamensis</i>	85,62	104,23	6,62%
	206,51	294,96	37,44%
	449,78	475,95	3,73%

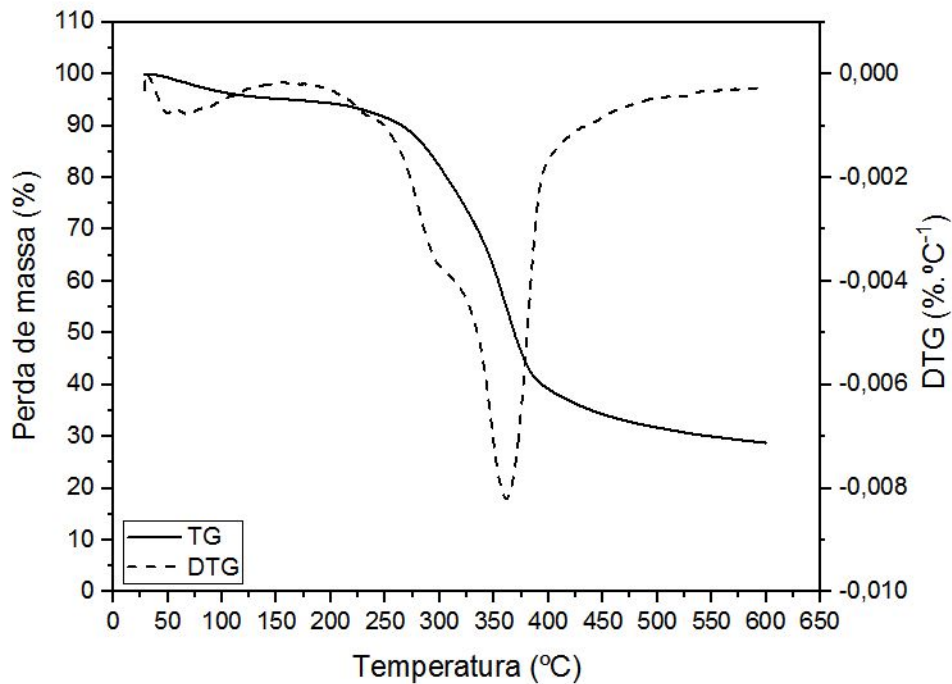


Figura 13: Curva de TG do pó do resíduo de ucuúba em atmosfera de nitrogênio.

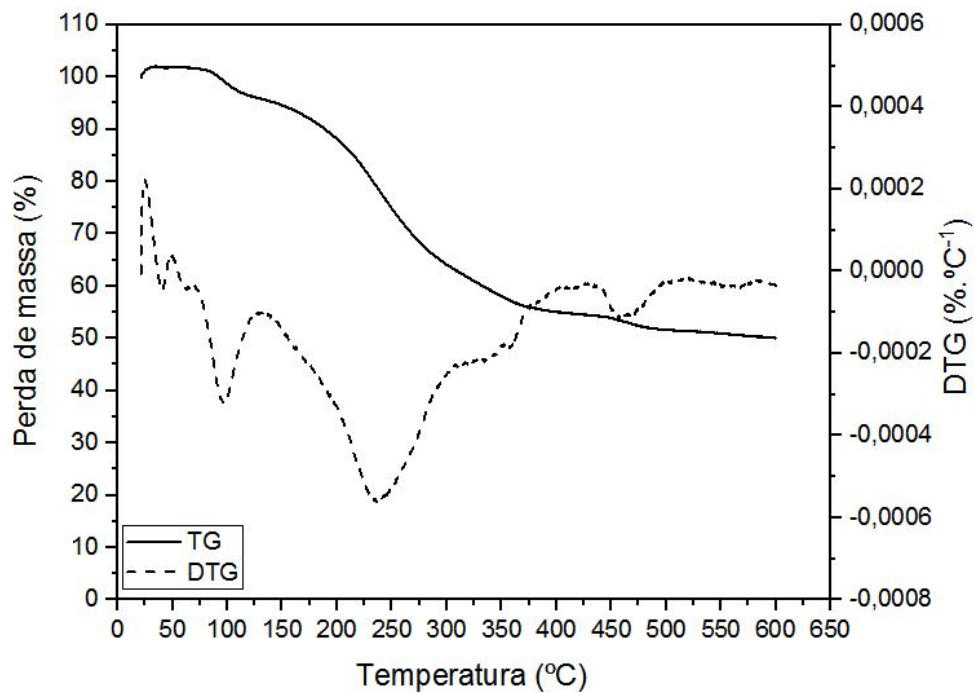


Figura14: Curva de TG do extrato liofilizado do resíduo de ucuúba em atmosfera de nitrogênio.

A curva de TG do extrato liofilizado (Figura 14), apresentou três eventos de perda de massa. O primeiro evento se deu na faixa de 85,62° C a 104,23 (Tabela 8) com perda de massa de 6,62%, característico de perda de água superficial e umidade. O segundo evento apresentou na faixa de 206,51° C a 294,96°C com perda de massa de 37,44%, esse estágio corresponde a decomposição térmica de carboidratos e lipídeos. O último evento apresentou a faixa de 449,78°C a 475,95°C com perda massa de 3,73% evidenciando ainda o processo de degradação de matéria orgânica (ZHANG et al, 2008, COSTA et al, 2009; COSTA et al, 2013).

5.3.6. OBTENÇÃO DO PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO (TG) DO EXTRATO LIPOFÍLICO

A curva termogravimétrica do extrato lipofílico (Figura 15) mostrou o comportamento térmico característico de amostra, onde a mesma apresentou estabilidade térmica até a temperatura de 327,42°C, a partir dessa temperatura ocorreram dois eventos de perda de massa. O primeiro evento se iniciou a partir da faixa de 327,42°C a 349,42°C com perda de massa de 47,70%, indicando o processo de decomposição térmica de ácidos graxos majoritários. O Segundo evento 412,26 a

430,56°C e com perda de massa de 38,65%, que pode ser atribuído a ácido graxos minoritários de maior massa molar e impurezas que possam estar presentes no extrato lipofílico. (Sousa et al., 2007; Oliveira et al., 2012; Arbi, et al, 2013; Mag, Antônio, Muniz, Nídia, & Emmerson, 2015).

Tabela 9: Etapas de perda de massa da curva de TG do extrato lipofílico da *V. surinamensis* na atmosfera de ar sintético.

Amostra	<i>Tonset</i>	<i>Tendset</i>	% de perda de massa
Extrato lipofílico da <i>V. surinamensis</i>	327,42	349,42	47,70%
	412,26	430,56	38,65%

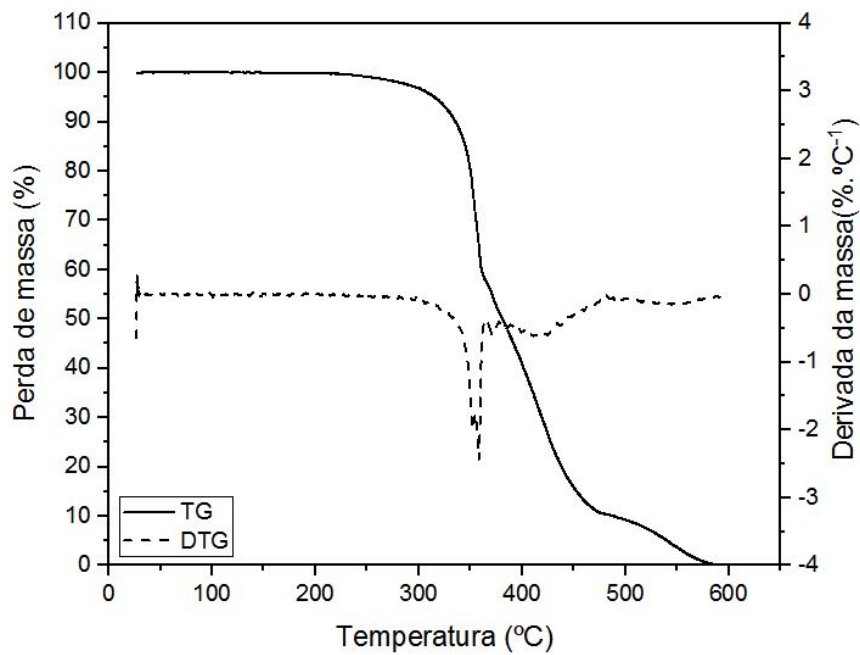


Figura 15: Curva de TG do extrato oleoso do resíduo de ucuúba em atmosfera de nitrogênio.

5.4. Determinação de Metabólitos Secundários – Polifenóis e Flavonoides do extrato hidrofílico

A determinação de metabólitos secundários é fundamental, pois esses vêm se destacando por apresentarem inúmeras atividades, tais como, ação antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena e antioxidante. Os compostos fenólicos são um dos grupos de metabólitos secundários que mais se destacam quanto ao potencial antioxidante.

A Tabela 10 mostra os teores de polifenóis e flavonóides do extrato concentrado e extrato liofilizado do resíduo de *V. surinamensis*. Os valores de polifenóis e flavonóides foram expressos em mg/100g de ácido gálico e rutina, respectivamente.

Tabela 10: Teores de polifenóis totais (PT) e flavonóis totais (F) no extrato concentrado e liofilizado de ucuúba (*Virola surinamensis*).

Amostras	PT (mg EAG/100g amostra seca)	F (mg ERT/100g amostra seca)
Extrato concentrado	114,04 ± 0,01	49 ± 4,6
Extrato liofilizado	806,45 ± 1,9	62 ± 1,27

Resultados estão expressos como média da triplicata ± desvio padrão relativo; mg EAG = miligramas de equivalente de ácido gálico; ERT = equivalente de rutina; as amostras estão relacionadas a quantidade de massa seca.

Os resultados de polifenóis obtidos neste trabalho para o extrato concentrado de ucuúba foi inferior ao encontrado no resíduo de umbuguela (casca, polpa e semente) e mobim amarelo (casca e polpa) obtiveram 210 e 260 mg EAG/100g de polifenóis totais, respectivamente (SATPATHY, TYAGI, E GUPTA, 2011; TIBURSKI et al, 2011). Ao avaliar somente a casca do marmelo Stojanovic´ e colaboradores (2017) encontraram valores de 140,1 – 202,9 mg EAG/100g de polifenóis totais, resultados esses semelhantes ao obtido para o extrato concentrado de ucuúba. Já os resultados deste trabalho foram inferiores aos achados nas frações (casca polpa e semente) das frutas do cerrado como pequi (ROESLER et al 2007). Os autores relataram que o extrato hidrofílico das sementes e casca quando comparados as amostras oriundas da polpa apresentava maior quantidade de polifenóis totais. É possível observar com base na comparação dos resultados obtidos nesse trabalho

com a literatura, que os demais subprodutos obtidos durante o processo extrativo ainda apresentam substâncias com potencial de uso pela indústria para o desenvolvimento de produtos.

Soares et al (2008), em seu estudo sobre os resíduos de maçã constituído de casca e semente, determinaram os teores de flavonoides $58,20 \pm 6,56$ (mg CE/100 g), semelhante ao obtido neste estudo para o resíduo de ucuúba extrato hidrofílico concentrado e liofilizado, respectivamente de $49 \pm 4,6$ e $62 \pm 1,27$ (mg ERT/100 g). Os frutos, vegetais, flores e folhas apresentam amplamente a presença de flavonoides, contudo os resultados evidenciados indicam, que assim como outras partes do fruto, os flavonoides ainda permanecem no coproduto. Provavelmente, está relacionado a classes de flavonoides que ainda se encontram fortemente ligados à parede celular das sementes (SU et al, 2007; HU et al, 2016). Mas, salienta-se outros fatores que podem estar relacionados ao processo extrativo estão temperatura, tempo de extração, relação solvente/ amostra e tratamento da amostra, podendo influenciar no aumento ou diminuição do teor dos flavonoides a partir de amostras oriundas de coproduto (BERGAMASCHI, 2010; FU et al, 2013).

5. 5. Determinação de Metabólitos Secundários – Carotenóides totais do extrato lipofílico

O teor carotenóides totais obtido do extrato lipofílico dos resíduos de ucuúba foi de 0,1759 mg de carotenóides/100g. Goula e colaboradores (2017) realizaram estudo semelhante ao desenvolvido nesse trabalho, onde avaliaram a capacidade de extração de carotenoides em casca de romã utilizando óleos vegetais (óleo de soja e girassol) como solventes extratores e obtiveram 0,6134 e 0,6715 mg respectivamente de carotenóides/100g de amostra para os dois óleos utilizados, resultados esses acima do obtido nesse estudo. No entanto, alguns fatores podem interferir na determinação de carotenóides como luz e temperatura, pois esse metabólito tende a degradar com muita velocidade. A viscosidade do solvente também é um fator determinante na obtenção de metabólito. Logo, quanto maior a viscosidade maior a dificuldade que o solvente tem de atravessar a matriz o que acaba diminuindo a eficiência de extração (RIBEIRO, 2010; GOULA et al, 2017).

Outro fator fundamental é o processo extrativo. Neste trabalho foi feita a maceração dinâmica que teve a duração de uma semana. Apesar de ter realizado o ensaio com todas as prevenções e medidas de controle supõem-se que possa ter ocorrido a perda dos metabólitos presentes na amostra. Como a amostra estudada se trata de um resíduo obtido da semente de ucuúba a quantidade de carotenoides presente no mesmo pode ser menor que no fruto. Pois, o processo mecânico sofrido por esses resíduos leva a liberação de enzimas que podem oxidar o alimento fazendo com que os carotenóides sejam reduzidos no material estudado (AMAYA-FARFAN, KIMURA, RODRIGUEZ- AMAYA; 2008).

5.6. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS do extrato hidrofílico

Os resultados de atividade antioxidante pelo método ABTS para o extrato concentrado e liofilizado foram obtidos os valores de 107,34 μM Trolox/g, 258,15 μM Trolox/g em base seca, respectivamente (Tabela 11). Ao observar os resultados verifica-se que o extrato liofilizado apresentou valor mais elevado que o extrato concentrado, o que se justifica, pois, a amostra passou por um processo de secagem por sublimação tornando- a desidratada e, conseqüentemente concentrando os metabólitos presentes na amostra (MARQUES, 2008) .

O presente estudo ao ser comparado com os dados da literatura apresentou resultados inferiores ao obtido por Rockenbach e colaboradores (2008) para bagaço de uva (378,81 μM Trolox/g). Esparza-Martínez e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antioxidante dos resíduos de mandarina (310,21 – 574,71 μM Trolox/g) e obtiveram valores superiores aos achados nesse trabalho. Embora o resíduo de ucuúba tenha apresentado valores abaixo do relatado na literatura para resíduos vegetais, ainda assim apresentou expressiva atividade antioxidante. Por se tratar de resíduos que já passaram por outros processos, pode-se obter um resultado que não seja elevado e sabido também que o tipo de processo extrativo escolhido pode influenciar diretamente na obtenção dos compostos que possuem atividade antioxidante (IMEH et al, 2002, ROESLER et al, 2007).

Em relação a capacidade antioxidante pelo método DPPH para o extrato concentrado e liofilizado de ucuúba os resultados obtidos foram 286,07 \pm 3,1 μM Trolox/g e 374,33 \pm 2,5 μM Trolox/g respectivamente. Ao se comparar os resultados

obtidos nesse estudo com os dados da literatura, tem-se que Esparza-Martínez e colaboradores (2016) avaliaram os resíduos de mandarina (71,27 a 161,04 μM Trolox/g) e Pugliese e colaboradores (2013) as sementes de cupuaçu (130-153 μM Trolox/g) que foram inferiores aos obtidos nesse trabalho

A literatura relata que a casca e a semente são partes da fruta que concentram majoritariamente a presença de compostos antioxidantes. O resíduo de ucuúba é obtido a partir do processo de prensagem das sementes, justificando a presença dessa atividade antioxidante no resíduo. Outro fator que influencia na eficiência da atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método DPPH é a posição do número de hidroxilas nas moléculas dos compostos fenólicos. Pois, esses compostos de acordo com o relatado na literatura possuem uma forte relação com a atividade antioxidante de frutas e legumes (ABIDILLE et al., 2005; ALENCAR, 2010).

Tabela 11: Determinação da atividade antioxidante, pelos métodos colorimétricos ABTS e DPPH, do extrato hidrofílico concentrado e liofilizado do resíduo de ucuúba (*V. surinamensis*)

Amostras	ABTS (μM Trolox/g)	DPPH (μM Trolox/g)
Extrato concentrado	107, 34 \pm 9,3	286,07 \pm 31
Extrato liofilizado	258, 15 \pm 1,8	374,33 \pm 25

Resultados estão expressos como média da triplicata \pm desvio padrão relativo.

Quando a capacidade de inibir 50% do radical DPPH, o extrato liofilizado de ucuúba apresentou IC_{50} de 89,67 \pm 0,13%, apresentando bom potencial de inibição. De acordo com Prasad e colaboradores (2010), que avaliaram extratos da polpa e da semente da azeitona preta extraídos com diferentes solventes, foi possível observar que todos os extratos apresentaram potencial antioxidante, a semente de azeitona preta apresentou inibição de 85,8 \pm 3,2%, com potencial de inibição de 88,07 \pm 0,7% (MELO, 2010). Esses estudos corroboram com os resultados obtidos para o extrato liofilizado de ucuúba, mostrando que o mesmo apresentou potencial de inibição semelhante a outros compostos relatados na literatura.

Com base nos resultados de ABTS e DPPH os extratos obtidos a partir do resíduo de ucuúba apresentaram atividade antioxidante promissora se comparada aos dados da literatura para resíduos, podendo esse potencial ser explorado pela indústria para o desenvolvimento de novos produtos.

5.8. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS do extrato lipofílico

O resultado de ABTS para o extrato lipofílico apresentou o valor de $434,36 \pm 3,7 \mu\text{M Trolox/g}$ ($755,26$ corresponde ao valor de ABTS do extrato lipofílico que foi subtraído do valor de ABTS do óleo de soja) e do óleo de soja $320,39 \pm 3,6 \mu\text{M Trolox/g}$. Os resultados obtidos sugerem que a extração com óleo de soja dos resíduos permitiu, extrair substâncias que apresentam capacidade antioxidante. No entanto, a amostra controle constituída apenas de óleo de soja também apresentou atividade, embora inferior ao do extrato.

O trabalho realizado por Luzia (2012), no qual foi avaliado a atividade antioxidante pelo método ABTS para os óleos vegetais extraído de sementes de frutas do cerrado como jenipapo, jatobá, buriti, pequi, sapoti, baru e araticum com destaque para última que apresentou maior atividade antioxidante ($65,92 \mu\text{M Trolox/100g}$). Comparando-se o resultado da extração verde do resíduo de ucuúba com os encontrados por Luzia (2012) o resíduo estudado apresentou uma expressiva atividade antioxidante. A atividade antioxidante pelo método ABTS realizada em óleo de palma, no entanto apresentou $555,62 \mu\text{M Trolox/g}$, superior ao obtido neste estudo (NEO et al, 2010).

Porém, pelo método DPPH não foi possível determinar a atividade antioxidante do extrato lipofílico, o que pode estar relacionado a polaridade dos solventes da reação e do extrato.

5.9. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana para obtenção de CIM e CBM do extrato hidrofílico e lipofílico

a) Bactéria gram positiva: Staphylococcus aureus ATCC 6538

Foi realizado o teste com a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, o CIM e CBM do extrato hidrofílico foi observado na concentração de $625 \mu\text{g/mL}$ (Figura 16).

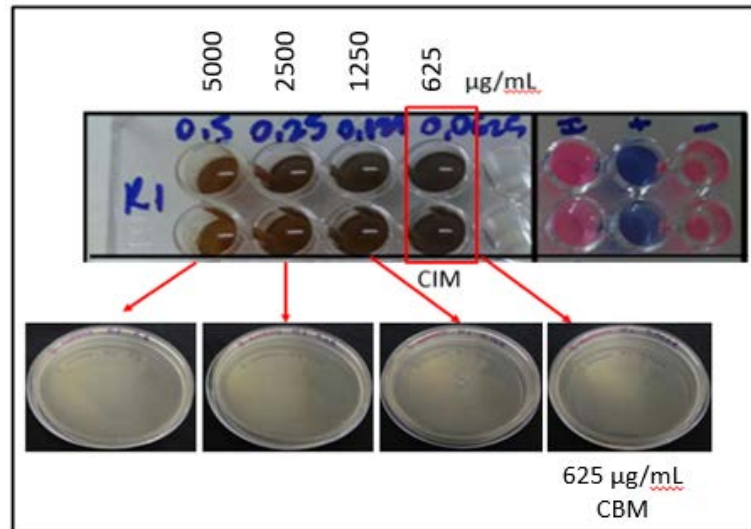


Figura 16: Bactéria *Staphylococcus aureus*, obtenção do CIM e CBM do extrato hidrofílico, idênticos no valor de 625 µg/mL.

Foi realizado o teste com a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, o CIM e CBM do extrato lipofílico, porém não foi observado CIM e CBM (Figura 17).

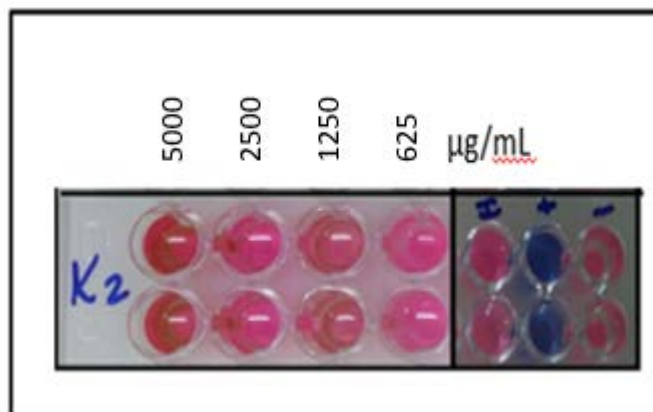


Figura 17: Bactéria *Staphylococcus aureus*, obtenção do CIM e CBM do extrato lipofílico.

b) Bactéria gram negativa: *Escherichia coli* ATCC 8739

Foi realizado o teste com a bactéria gram negativa *Escherichia coli* ATCC 8739, o CIM e CBM do extrato hidrofílico foi observado na concentração de 1250 µg/mL (Figura 18).

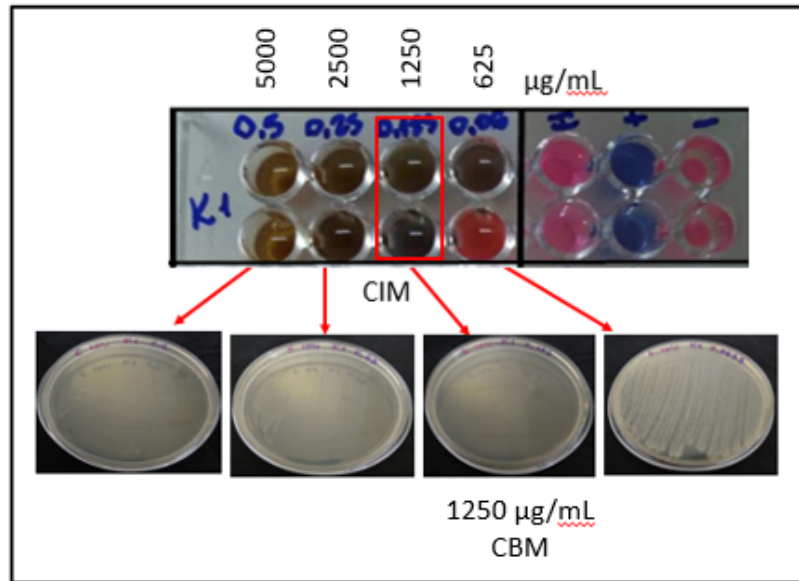


Figura18: Bactéria *Escherichia coli*, obtenção do CIM e CBM do extrato hidrofílico, idênticos no valor de 1250 µg/mL.

Foi realizado o teste com a bactéria gram negativa *Escherichia coli* ATCC 8739, o CIM e CBM do extrato lipofílico, porém não foi observado CIM e CBM (Figura 19).

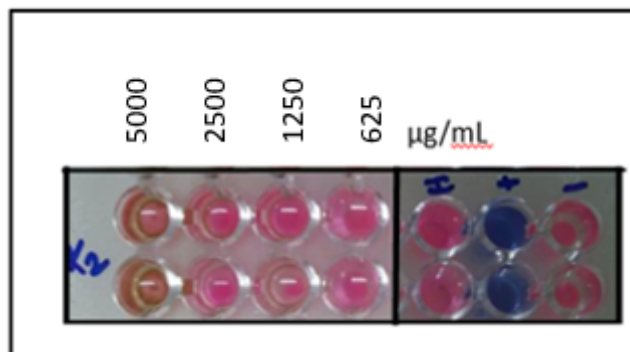


Figura 19: Bactéria *Escherichia coli*, obtenção do CIM e CBM do extrato lipofílico.

Não existe um padrão estabelecido sobre a concentração de extrato vegetal aceitável quando comparado a antibióticos. De acordo com Houghton e colaboradores (2007) a atividade antimicrobiana é classificada ativa ou inativa nos extratos vegetais, seguindo os seguintes critérios de concentrações: valores entre 50-500µg/ml são consideradas excelentes/ótima, valores de 600-1500µg/mL são avaliadas com atividade moderada, enquanto que > 1500µg/mL é um produto inativo. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que o extrato hidrofílico apresentou ação moderada

para bactéria gram positiva (625 µg/mL) e para bactéria gram negativa (1250 µg/mL). O extrato lipofílico mostrou-se inativo frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos nesse estudo foram inferiores ao obtido por Costa (2015).

De acordo com relatos da literatura, sabe-se que a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais está relacionada com o microrganismo testado, método extrativo e o tipo de solvente utilizado no processo extrativo, pois a polaridade do solvente tem total influência na extração dos metabólitos (GIRONDI et al, 2017). Isso ratifica a compreensão de que o solvente utilizado na obtenção do extrato lipofílico não extraiu do resíduo de ucuúba substâncias com ação antimicrobiana, que pode ter relação o método extrativo empregado não ter sido eficiente quanto o esperado e o solvente utilizado por ser apolar acaba não extraindo compostos que apresentem tal ação.

A atividade antimicrobiana destacada no extrato hidrofílico pode ser atribuída a presença de compostos fenólicos (COSTA, 2015; GIRONDI et al, 2017) e já foi relatado nesse estudo a presença desses compostos no resíduo de ucuúba. O etanol é capaz de romper a parede celular das plantas e obter os compostos fenólicos (BURIOL et al, 2009; TIWARI et al, 2011). Há relatos na literatura de compostos que apresentam ação antioxidante, anti-inflamatórios, antimicrobiana, antifúngica, anticancerígeno. Logo, acredita-se que quanto maior a concentração desses compostos mais potente é sua ação antimicrobiana (FUENTEALBA et al, 2016; HU et al, 2016; WANG et al, 2017).

A uma grande possibilidade do extrato hidrofílico ter agido na parede celular das bactérias, levando a desorganização e conseqüentemente à lise bacteriana, pois as mesmas possuem uma parede celular menos complexa e menor teor de lipídios, porém na bactéria gram-negativa esse processo de lise é mais trabalhoso, pois a membrana celular externa pode prejudicar a ligação e a permeabilidade dos extratos vegetais dificultando a morte dessas bactérias (LOGUERCIO, 2005; BENDAOU et al, 2009). O presente estudo mostrou que o extrato hidrofílico se apresentou mais eficaz contra as bactérias gram-positiva.

5.10. Atividade Citotóxica do extrato hidrofílico

O estudo de citotoxicidade foi realizado para avaliar a viabilidade de células tratadas, avaliando a atividade das desidrogenases mitocondriais. Neste estudo foi

observado que após o tratamento com diferentes concentrações do extrato hidrofílico do resíduo de ucuúba, não houve uma redução significativa da viabilidade celular dos macrófagos (Figura 20) em comparação com o controle. Bem como foi possível observar que mesmo o extrato na maior concentração (100 µg/mL) não houve redução significativa dos macrófagos. A concentração citotóxica capaz de matar 50% das células (CC50%), cujo valor foi de 128,47 µg/mL, confirma que o extrato hidrofílico do resíduo de ucuúba apresenta baixa citotoxicidade frente aos macrófagos.

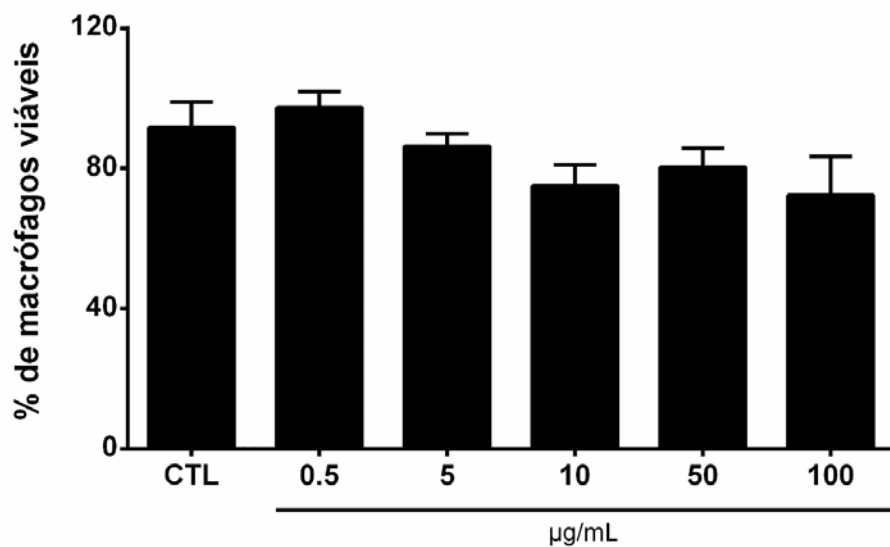


Figura 20: Viabilidade celular através do método MTT em macrófagos peritoniais cultivados por 24 horas e tratados com diferentes concentrações do extrato liofilizado do resíduo de ucuúba.

Os macrófagos são células da resposta imune que mediante a presença de bactérias, fungos e protozoários são ativados apresentando projeções citoplasmáticas, maior adesão, espreadimento celular, produção de citocinas e ativação da resposta contra os hospedeiros, produzindo óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (GORDON & MARTINEZ, 2010; RODRIGUEZ et al, 2011; GHONIME et al, 2015). Essas células atuam na primeira linha de defesa de todo o organismo, assim, é fundamental que os extrato não apresente qualquer dano a essas células, sendo seguro ao organismo quando ingerido através de alimentos ou quando incorporado em formulações tópicas ou orais. A medida que aumenta a concentração do extrato hidrofílico, diminui o número de macrófagos viáveis, embora essa diminuição seja pequena, mostrando que a citotoxicidade é diretamente proporcional à concentração da amostra (KUMAR et al. 2009; GALUCIO, 2015).

O resultado da atividade citotóxica do extrato hidrofílico mostrou concentração citotóxica (CC_{50}) de 128,47 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando que é necessária essa concentração de extrato para levar a lise de 50% dos macrófagos. Resultado semelhante ao obtido no estudo com *Agrimonia pilosa* (CC_{50} de 146 $\mu\text{g/mL}$), que avaliou a citotoxicidade do extrato dessa espécie frente a linhagem de macrófagos (KIM et al, 2010), e assim como o extrato do resíduo de ucuúba, também não apresentou citotoxicidade frente a essas células.

Embora o extrato não tenha sido citotóxico para a linhagem de macrófago estudada nas concentrações avaliadas, ele pode vir a ser tóxico contra agentes invasores do organismo humano, existindo um estreito limite de concentração segura ao hospedeiro e tóxica aos microrganismos (COSTA, 2015).

5.11. Validação e quantificação dos metabolitos majoritários por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) presentes do extrato hidrofílico

Na fase de desenvolvimento do método analítico é fundamental a otimização das condições de análise, para melhor identificação do metabólito de interesse. O padrão escolhido foi o ácido cafeico, pois de todos os padrões pesquisados, apenas esse foi identificado sendo avaliado nas mesmas condições de análise da amostra. As condições escolhidas permitiram observar o pico cromatográfico do padrão, assim como, observar a presença do mesmo no extrato hidrofílico do resíduo de ucuúba.

A determinação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas padrões de ácido cafeico. O método mostrou-se linear no intervalo de concentração de 2 - 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21), sendo obtida a equação de regressão linear $y=67,803x-0,2611$ e coeficiente de correlação (R^2) 0,9996 o que permite uma estimativa da qualidade da curva. O R^2 quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais, corroborando com a RE 899, cujo coeficiente de correlação aceitável deve ser no mínimo 0,99 (ANVISA, 2003).

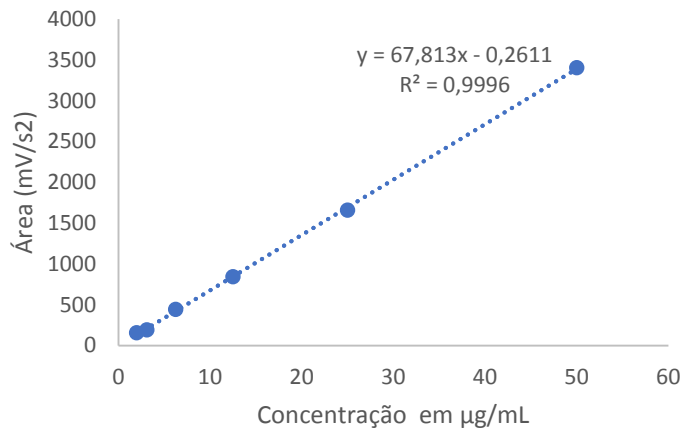


Figura 21: Curva padrão correlacionando a área dos picos com a concentração.

A precisão (repetibilidade) foi avaliada a partir de 6 repetições da concentração de 50 µg/mL (Tabela 12). O coeficiente de variação obtido foi de 2,72%, dentro do estabelecido pela ANVISA (2003), que é de 5%. O método desenvolvido mostrou-se preciso.

Tabela 12: Repetibilidade do padrão na concentração de 50 µg/mL.

Padrão	Área (mV/s²)	Concentração (µg/mL)
Ácido cafeico	3668,8	54,10
	3928,2	57,93
	3810,8	56,19
	3714,3	54,77
	3669,2	54,11
	3699,7	54,56
Média (mg/mL)		55,28
Desvio Padrão		1,50
Coeficiente de Variação		2,72

O método se apresentou exato, uma vez que os valores (Tabela 13) encontrados para as concentrações alta, média e baixa do padrão junto com o valor de recuperação foi superior a 95%, valor este preconizado pela ANVISA (2003). Uma recuperação é dita eficiente com base em cada analito avaliado, ou seja, a medida que cada analito tem maior afinidade pelo solvente, maior será sua extração e consequentemente maior será sua recuperação (SILVÉRIO et al, 2012).

Tabela 13: Exatidão do método, triplicata dos pontos baixo, médio e alto das concentrações do padrão.

Concentração do Padrão	2 µg/mL	12.5 µg/mL	50 µg/mL
Média	2,32	12,46	50,23
Recuperação (%)	116,49	99,72	100,47

O método empregado para validação do método apresentou limite de detecção de 1,39 µg/mL e limite de quantificação de 2,35 µg/mL, sendo considerados valores satisfatórios. A robustez do método analítico, mesmo advento pequena alteração do parâmetro temperatura não ocorreu alteração no tempo de retenção (15,4 min) do padrão, evidenciando que o método analítico se apresentou robusto.

Quanto a seletividade do método, os resultados foram avaliados através dos cromatogramas visualizados em 330 nm, do padrão ácido cafeico (A), extrato hidrofílico de ucuúba (B) e co-injeção do padrão + extrato (C) (Figura 22) com tempo de retenção dos picos de 15,01, 14,13 e 14,34 minutos, respectivamente. A comparação entre os cromatogramas possibilitou verificar a presença do pico referente ao padrão ácido cafeico no extrato hidrofílico de ucuúba, na concentração de 5,17 µg/mL.

(A)

Ácido cafeico

(B)

Ácido cafeico

(C)

Figura 22(A) Cromatograma do padrão ácido cafeico (15,01 min). (B) Cromatograma do extrato de hidrofílico de ucuúba (14,13 min) na concentração de 5mg/ml. (C) co-injeção padrão+extrato (14,38 min). Os cromatogramas foram visualizados em 330 nm.

A validação de uma metodologia analítica é importante, pois através dela é possível determinar a presença de marcadores químicos e confiabilidade dos resultados obtidos através do método empregado (Nunes, 2011). Com base nos resultados dos parâmetros de validação obtidos o método se apresentou linear, seletivo, preciso, exato e robusto, de acordo com as especificações da RE 899/2003.

O ácido cafeico é um tipo natural de flavonóide, encontrado em vegetais. A literatura revela que esse metabólito apresenta ação anti-inflamatória, antiviral, anticancerígena e ação antioxidante (WANG et al, 2013). Esse resultado sugere que o composto identificado contribua para ação antioxidante identificada neste estudo, fortalecendo a ideia de que o resíduo de ucuúba apresenta potencial de aproveitamento pela indústria.

6. CONCLUSÕES

É fundamental a caracterização dos parâmetros físico e química do pó, extrato hidrofílico e extrato lipofílico oriundos do resíduo de ucuúba o que auxiliará no controle de qualidade durante as etapas do processo de obtenção do produto final e assim contribuir na qualidade do mesmo. O pó do resíduo de ucuúba apresentou quantidades significativas de macronutrientes com destaque para carboidratos, fibras e lipídeos, mostrando que esse resíduo apresenta um grande potencial nutritivo.

A estabilidade térmica do pó e o extrato hidrofílico foi em torno de 100°C, além de permitir uma estimativa sobre água residual semelhante ao obtido pelo ensaio gravimétrico. O extrato lipofílico apresentou estabilidade térmica próximo a 300°, mostrando que o mesmo é pouco susceptível a altas temperaturas, o que está relacionado com a estrutura do solvente (óleo de soja) utilizado.

Quanto a presença de metabólitos secundários e atividade antioxidante o extrato hidrofílico apresentou quantidades de polifenóis e flavonoides. Já o extrato lipofílico apresentou a presença de carotenoides.

Ao se comparar os dois extratos quanto a atividade antioxidante é possível observar que apenas o extrato hidrofílico apresentou atividade pelo método DPPH e Cl_{50} apresentando bom potencial de inibição. Já o extrato lipofílico apresentou maior atividade antioxidante pelo método ABTS se comparado ao extrato hidrofílico extrato hidrofílico

O extrato hidrofílico apresentou ação antimicrobiana mais acentuada frente as bactérias gram positivas, do que para as bactérias gram negativas, enquanto que o extrato lipofílico não apresentou ação antimicrobiana para nenhuma das bactérias utilizadas no estudo.

O extrato hidrofílico nas concentrações avaliadas não possuiu ação citotóxica contra macrófagos, indicando ser um extrato seguro, nas concentrações estudadas, para o desenvolvimento de produtos para uso em humanos ou animais.

Pela análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível identificar a presença do metabólito secundário ácido caféico.

Ao observar os dois tipos de extrato foi possível concluir que o extrato hidrofílico apresentou maior potencial de aproveitamento, embora o extrato lipofílico também tenha resultados interessantes.

Com base nos resultados obtidos para os resíduos de ucuúba, mostra que o aproveitamento do mesmo é vantajoso podendo agregar valor à cadeia produtiva desse fruto, assim como contribuir para a sustentabilidade ambiental.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S.M. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Universidade de São Paulo – Escola Superior Luiz de Queiroz. Piracicaba.
- ALVES, T. V. G. et al. **Bioactive compounds and antioxidant potential for polyphenol-rich cocoa extract obtained by agroindustrial residue.** Natural Product Research. p.1-5, 2017.
- ALIAKBARIAN, B. et al. Antioxidant activity and biological evaluation of olive pomace extract. Natural Product Research. v. 26, n. 24, p.2280–2290, 2012.
- ABIDILLE, M. D. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. Food Chemistry, Barking, v. 90, n.4, p. 891-896, 2005.
- ABBAS, S. R. et al. **Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*).** Food Chemistry. v. 147, p. 10–16. 2014.
- ÁJILA, C.M. et al. **Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. Food Chemistry.** 105, 982-988. 2007.
- ALISKE, M. A. **Medidas de espectroscopia no infravermelho médio para determinação de biodiesel em óleo diesel.** Dissertação (Engenharia e Ciência dos Materiais) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.
- AMAYA-FARFAN, J.; KIMURA, M.; RODRIGUEZ- AMAYA, D. B. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoids em alimentos.** Brasília: MMA/SBF, 2008.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 13 de outubro de 1999.
- ANVISA, Resolução RE 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 29 de maio, 2003.
- AOAC International. (1997). Official methods of analysis. Gaithersburg: Published by AOAC International, 2, cap. 32, p.1-43.
- ARBI, S. et al. Imededdine. et al. **Evaluation and characterisation of *Citrullus colocynthis* (L) Schrad seed oil: Comparison with *Helianthus annuus* (Sunflower) Seed oil.** Food Chemistry, v.136, n.2, p.348-53, 2013.
- BARBOSA, N. P., CONCEIÇÃO, E. C. Alimentos com Potencial Aplicação em Cosméticos Naturais. **Revista de Processos Químicos.** p. 127-131, 2016.
- BARCIA, M. T. **Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 2, p. 381-390, abr./jun. 2010.
- BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento.** Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2010.
- BLUMENTHAL, E. E. D. A.; SILVA M. S.; et al. **Lignoids, flavonoids and polyketides of *Viola surinamensis*.** Phytochemistry. v. 46, n. 4, p. 745-749, 1997.
- BENDAOU, H. **GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*.** J Sci Food Agric. v.89, p.1292–1297. 2009.

- BORGES, L. L. et al. **Optimization of the spray-drying process for developing jaboticaba waste powder employing response surface methodology.** *Journal of Food Process Engineering.* p.1-9, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Food Science and Technology.* v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie,* London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. et al. **The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research.** *American Journal of Clinical Nutrition* 76 (4), 703–716. 2002.
- BURIOL, L. **Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico.** *Quim. Nova,* Vol. 32, No. 2, 296-302, 2009.
- HIRUMA- LIMA, A. C. **Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae).** *Journal of Ethnopharmacology* 122 (2009) 406–409
- CAMPOS, AM; LISSI, EA. **Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3- ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols.** *International Journal of Chemical Kinetics.* 219–224. 1997.
- CARVALHO A. A. L. et al. **Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*.** *Phytother Res.* v.24, n.1, 113-8, 2010.
- CASTRO, R.J.S., SATO, H. H.. **Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design.** *Industrial Crops and Products.* v.49, p.813-821, 2013.
- CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento da industrialização da mandioca.** São Paulo: Fundação Cargill, v.4, 320p, 2000.
- CHIRINOS, R. **Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region.** *Industrial Crops and Products.* v. 47, p. 145– 152, 2013.
- COELHO, M. A. Z. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde.** *B.CEPPA, Curitiba,* v. 19, n. 1, p. 3342, Jan./jun. 2001
- COSTA, R. S. et al. **Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC.** *J Therm Anal Calorim,* v.111, p.1959–1964, 2013.
- COSTA, R. S. **Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae).** *Rev. Bras. Farm.,* v.90, n.3, p.169-174, 2009.
- COSTA, G. V. **Atividade antibacteriana, antioxidante e citotóxica in vitro do extrato etanólico da entrecasca da planta *Ouratea hexasperma* (EEOH) (A. St.-Hil.) Baill var. *Planchonii* Engl.** *Dissertação (Ciências da Saúde). Universidade Federal do Pará – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Belém – Pará.* 2015.
- ČOPRA-JANIĆIJEVIĆ, A. et al. **Chemical composition and antioxidant activity of the endemic *Crataegus microphylla* Koch subsp. *malyana* K. I. Chr. & Janjić from Bosnia.** *Industrial Crops & Products.* v.113, p. 75–79, 2015.
- DITCHFIELD, C. **Estudo dos métodos para a medida da atividade de água.** *Dissertação da área de Engenharia Química – Universidade de São Paulo.* p. 195. 2000.
- ESPARZA-MARTÍNEZ, F. J. **Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures.** *Plant Foods Hum Nutri* 71:294–300, 2016.
- FARMACOPÉIA, 5° edição, 2010.

- FERNANDES, A. F. **Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum* Lineu).** Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, v. 28, n. 58 p.56-65. 2008.
- FERREIRA, E. S. et al. **Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-dobrasil (*Bertholletia excelsa* h.b.k)*.** Alim. Nutr.v.17, n.2, p.203-208, 2006.
- FLAKELAR, C. L. A. **Rapid method for the simultaneous quantification of the major tocopherols, carotenoids, free and esterified sterols in canola (*Brassica napus*) oil using normal phase liquid chromatography.** Food Chemistry. v. 214, p. 147–155. 2017.
- FOTAKIS, G., TIMBRELL, J. A. ***In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, vermelho neutro, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cádmium chloride.** Toxicology Letters. v.160, p. 171-177, 2006.
- FREITAS, C. B. **Análise cromatográficas por CLAE-DAD, termogravimétricas e morfo-anatômicas de amostras comerciais de *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) Micheli (chapéu-de-couro).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
- FU, Y et al.. **Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice.** Food Chemistry, 141(2), 1063–1071, 2013.
- FUENTEALBA, C. et al. **Characterization of main primary and secondary metabolites and in vitro antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes of *Pouteria lucuma*.** Food Chemistry. v. 190, p.403–411. 2016.
- GALUPPO, S.C.; CARVALHO, J.O.P. de. **Ecologia, manejo e utilização da *Virola surinamensis* Rol. (Warb.).** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 38p, 2001.
- GALUCIO, N. C. R. **ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE *Eleutherine plicata* Herb.** Dissertação (Ciências da Saúde). Universidade Federal do Pará – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Belém – Pará. 2014
- GHONIME, M. et al. **Immunomodulation of RAW 264.7 Murine Macrophage Functions and Antioxidant Activities of 11 Plant Extracts.** Immunological Investigations, v.44, n.3, p. 237–252. 2015.
- GIRONDI, C. M. et al. **Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp.** Future Microbiol. v.12, n.8, p.671–681. 2017.
- GOULA, A. M. **Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oil.** Ultrasonics Sonochemistry. v. 34, p. 821–830, 2017.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. **Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.** Immunity. v. 28, n. 32(5), p. 593-604. 2010.
- GONZALES, G.B. **Ultra(high)-pressure liquid chromatography–electrospray ionization-time-of-flight-ion mobility-high definition mass spectrometry for the rapid identification and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste.** Journal of Chromatography A. v.1323, p.39– 48, 2014.
- GURGEL, E. S. C., et al . ***Virola surinamensis* (Rol ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae): aspectos morfológicos do fruto, semente, germinação e plântula.** Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais, Belém, v. 1, n. 2, p. 37-46, maio-ago. 2006.
- GRAÇA, V. C., at al. **Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity.** Industrial Crops & Products. v. 108, p. 543–552, 2017.
- Graça, V.C., Ferreira, I.C.F.R., Santos, P.F. **Phytochemical composition and biological activities of *Geranium robertianum* L.: a review.** Ind. Crops Prod. v.87, p. 363–378, 2016.

- HANDAYANI, A. D. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresource Technology*. v. 99 p. 4414–4419. 2008.
- HATAMNIA, A., A. ABBASPOUR, N., DARVISHZADEH, R. **Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits**. *Food Chemistry*. v.145, p.306–311, 2014.
- HIRUMA-LIMA, C. A. et al. **Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae)**. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 122, p. 406–409.2009.
- HU, Q. et al. **Identification of flavonoids from *Flammulina velutipes* and its europrotective effect on pheochromocytoma-12 cells**. *Food Chemistry*. v. 204, p.274–282. 2016.
- IONASHIRO, M. A.; GIOLITO, I. **Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica**. *Cerâmica*, São Paulo, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.
- IGALAVITHANA, A. D. et al. **Heavy metal immobilization and microbial community abundance by vegetable waste and pine cone biochar of agricultural soils**. *Chemosphere*. v.174, p. 593-603, 2017.
- JI, C. et al. **A Review of the Anaerobic Digestion of Fruit and Vegetable Waste**. *Appl Biochem Biotechnol*. p.1-17, 2017.
- KATO, M. J. et al. **Uptake of Seeds SecondaryMetabolites by *Virola surinamensis* Seedlings**. *International Journal of Analytical Chemistry*. p. 1-5, 2012.
- KIM, M. **Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea**. *Food Chemistry*. v.122, p. 546–552, 2010.
- KIM, S. et al. **A pilot scale two-stage anaerobic digester treating food waste leachate (FWL): performanceand microbial structure analysis using pyrosequencing**. *Process Biochem*. v.49, p. 301-308, 2014.
- KLJAK , K.; GRBEŠA, D. **Carotenoid content and antioxidant activity of hexane extracts from selected Croatian corn hybrids**. *Food Chemistry* . v.167, p. 402–408, 20015.
- KUSKOSKI, E. M. et al. **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos**. *Cienc. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.)*, 25, 726–732, 2005.
- KUMAR, M.R. et al. **Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells**. *Toxicol In Vitro*. v.23, n.2, p.242-250, 2009.
- KUMAR, S. P.J. et al. **Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds**. *Chemistry Central Journal*. v.11, n.9, p. 1-9, 2017.
- LATIF S, et al. **Aqueous enzymatic process for oil and protein extraction from *Moringa oleifera* seed**. *Eur J Lipid Sci Technol*. v.113, p.1012–1018, 2011.
- LANDIN, R. **Brasil já é o terceiro maior exportador agrícola do mundo**. Material jornalístico produzido pelo Estadão, Disponível em: <economia.estadao.com.br/noticias/geral,brasil-ja-e-o-terceiro-maior-exportador- agricola-do-mundo,520500.2010.> Acesso em : 16 junho/2015.
- LAUFENBERG, G., **Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations**. *Bioresource Technology*, 87, pp.167-198, 2003.
- LI, Y. et al. **Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvente**. *Ultrasonics Sonochemistry*. v.20, p. 12–18, 2013.
- LONGHINI, R. et al. **Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(3): 388-395, Jul./Set. 2007.

- LOPES, N. P. et al. **Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians.** Journal of Ethnopharmacology. v. 67, p. 313–319, 1999.
- LOPES, N. P.; KATO, M. J. et al. **Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*.** Phytochemistry. v. 51, n. 1, p. 29-33, 1999.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, pp. 338–339, 2002.
- LOUSADA JÚNIOR, J. E. et al. **Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal.** Revista Ciência Agronômica, v.37, n.1, p.70-76, 2006.
- LOGUERCIO, A. P. et al. **Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells).** Cienc. Rural. 2005, vol.35, n.2, pp. 371-376.
- LUZIA, D. M. M. Propriedades funcionais de óleos extraídos de sementes de frutos do cerrado brasileiro. 2012. Tese (Engenharia e Ciência de Alimentos - Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. SÃO José do Rio Preto – São Paulo.
- MAG, Phcog et al. **Physicochemical characterization, fatty acid composition and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK Oil.** 147-52. Doi: 10.4103/0973-1296.149730, 2015.
- MARQUES, L. G. **Liofilização de Frutas Tropicais.** 2008. Tese (Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.
- MARQUES, A. et al. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) Cv. Tommy Atkins. Revista da Associação Brasileira de Nutrição, Rio de Janeiro, p. 1-5, 2010.
- MELO, P. S. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. Ciência Rural, Santa Maria, v.41, n.6, p.1088-1093, jun, 2011.
- MELO, G. B. **Síntese Verde e Caracterização de Nanopartículas de Prata Usando Extrato Aquoso de Erva Mate (*Ilex paraguariensis*).** Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Engenharia de Alimentos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.
- MELO, P.S. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais, 2010. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESAL/USP, Piracicaba.
- MICHELIN, D. C. **Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae.** Rev. Bras. Farmacogn. v.20,n.1, p. 18-22, 2010.
- MILLER, N. J., et al. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.** Clinical Science, v. 84, p. 407–412, 1993.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. **Antioxidant assay for plants and food components.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 56, p. 1655-1666, 2009.
- MORAES, L. S. Ação do alcaloide (+)-filantidina sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira. Dissertação (Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pará – Faculdade de Ciências Biológicas. Belém – Pará. 2014.
- NEO, Y. et al. **Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts.** Food Chemistry. v. 122, p. 353–359. 2010.
- NUNES, K. M. et al. **Analytical Method Validation for In Vitro Permeation of *Calendula officinalis* L.** Gel. Lat. Am. J. Pharm. v.30, n. 5, p. 925-30, 2011.
- OLIVEIRA, D. S et al. **Obtenção do biodiesel através da transesterificação do óleo de ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(3): 727-732, jul.-set. 2008.

- OWITI, A. O. **Desenvolvimento de um método para caracterização do extrato hidroetanólico de folhas de Mikania lindleyana DC. por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará, Belém.
- PARJIKOLAEI, B. R. et al. **Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste.** *Journal of Food Engineering.* v.155, p.22–28, 2015.
- PARK, K.J.; YADO, M.K.; BROD, F.P.R. **Estudo de secagem de pêra bartellet (*pyrus sp.*) em fatias.** *Ciênc. Tecnol. Aliment,* v. 21, n. 3, p. 288-292, 2001. Acessado em: 27 de ago. de 2014.
- PELIZER, L. H., PONTIERI M. H., MORAES, I. O. **Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental.** *J. Technol. Manag. Innov.* 2007, Volume 2,
- PELIZER, L.H, PONTIERI, L.M.H., MORAES, I.O. **Utilização de Resíduos Agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental.** *J. Technol. Manag. Innov.,* v. 2, 118-127p, 2007.
- PRASAD,K. N. et al. **Antioxidant Capacities of Peel, Pulp, and Seed Fractions of *Canarium odontophyllum* Miq. Fruit.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* p.1-9, 2010.
- PU, J., Bechtel, P. J., Sathivel, S. **Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates.** *Biosystems engineering.* v.107, p. 364-371, 2010.
- PUGLIESE, A.G; TOMAS-BARBERAN, F.A. TRUCHADO, P. GENOVESE, M.**Flavonoids, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) Pulp and Seeds.** *J. Agric. Food Chem,* 61, 2720–272, 2013.
- RE, R et al. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical Biology & Medicine, New York,* v. 26, n. 9-10, p.1231- 1237, 1999.
- RE, R. et al. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radicle Biology and Medicine.* v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- RIBEIRO, M. C. **Óleo de pequi: qualidade físico-química, teor de carotenoides e uso em animais com carência de vitamin A.** 2010. Dissertação (Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras. Lavras -Minas Gerais.
- RICE-Evans, C., & Miller, N. J. **Total antioxidant status in plasma and body fluids.** *Methodes in Enzymology,* v. 234, p. 279–293, 1994.
- ROA, V.; DAZA, M. S. T. Evaluation of water activity measurements with a dew point electronic humidity meter. *Lebensmittel – Wissencharft und Technologie,* v. 24, n. 3, p. 208-213, 1991.
- ROCKENBACH, I. I. et al. **Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota.** *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas,* 28(Supl.): 238-244, dez. 2008.
- RODRIGUES, S. B. **Resíduos da Agroindústria como fonte de fibras para elaboração de pães integrais,** 2010, 98 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RODRIGUES, W.A. **Revisão taxonômica das espécies de virola aublet (*myristicaceae*) do Brasil.** *Acta Amazonica,* v.10, n.1: Suplemento, 1980.
- RODRIGUES, A. P. D. et al. **A novel function for Kojie Acid, a secondary metabolite from *Aspergillus fungi*, as antileishmanial agent.** *Plos One.* v.9, p.91259, 2014.
- RODRIGUES, M. C. M. et al. Optimization of ultrasoundassisted extraction of phenolic compounds from *Myrcia amazonica* DC. (*Myrtaceae*) leaves. *Pharmacognosy magazine.* v. 12, n. 45, p. 9-12, 2016.
- ROESLER, R., et al. **Atividade antioxidante de frutas do cerrado.** *Ciência Tecnologia Alimentos, Campinas,* 27(1): 53-60, jan.-mar. 2007.

RUFINO, M. S. M. **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil.** Food Chemistry v.121, p. 996–1002, 2010.

RUBIÓ, L., MOTILVA, M.-J., ROMERO, M.-P. **Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices A review of the most effective antioxidant and anti- Inflammatory active principles.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr. v.53, p.943–953, 2013.

SATPATHY, G., TYAGI, Y. K., & GUPTA, R. K. **Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondia pinnata* K., an exotic fruit of India.** Food Research International, v.44, p.2076–2087, 2011.

SAVATOVIC, S. et al. **Tomato waste: A potential source of hydrophilic antioxidants.** International Journal of Food Sciences and Nutrition. v. 63, p.129–137, 2012.

SANCHÉZ, S. R. et al. **Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste.** Bioprocess Biosyst Eng. v.38, p.587–593, 2015.

SLAVOV, A. et al. **Combined recovery of polysaccharides and polyphenols from *Rosa damascena* wastes.** Industrial Crops and Products v.100, p.85–94, 2017.

SAN, B., YILDIRIM, A. N. **Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections.** Journal of Food Composition and Analysis. v. 23, p.706–71, 2010.

SACHINDRA, M.N. Mahendrakar M.N. **Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils.** Bioresource Technology. v. 96, p. 1195–1200, 2005.

SANCHEZ-MORENO, J. A., LARRAURI & SAURA-CALIXTO, F. **A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.** Journal of the Science of Food and Agriculture. v.76, p. 270–276, 1998.

SANTOS, G. M. et al. **Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart).** Archivos Latinoamericanos de Nutricion. v. 58 nº 2, p. 2008.

SILVA JUNIOR, J. O. C. et al. **Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 16, p. 671-677. 2006.

SILVA, S.L. **Modelagem molecular de derivados fenilpirazólicos e flavonoides e inibidores da xantina oxidase.** (Tese – Doutorado em Química). Campinas: UNICAMP, 2003.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6. ed. Rio de Janeiro: Editora: LTC, 2007. 490p.

SILVÉRIO, F. O. et al. **Análise de agrotóxico em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência.** Química Nova. V. 35, n. 10, 2012.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. **Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 41(1), 95-100, 2005.

SOARES, M. et al. **Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.28, n.3, p. 727-732, 2008.

SOUSA, M.S.B. et al. **Caracterização nutricional de compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais.** Ciênc. agrotec. Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, maio/jun., 2011.

SOUZA, J.N. **Obtenção de extratos padronizados a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) e avaliações biológicas in vitro,** 2014, 132 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

STRAUS, E.L.; MENEZES, L.V.T. **Minimização de resíduos.** In: Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, 17. Natal. Anais. Natal: ABES, p. 212-225, 1993.

STOJANOVIC, B. T. et al. **Phenolic profiles and metal ions analyses of pulp and peel of fruits and seeds of quince (*Cydonia oblonga* Mill.)** Food Chemistry . n. 232 , p. 466–475. 2017.

SU, L. **Total phenolic contents chelating capacities, and radical-scavenging porperties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf.** Food Chemistry, Barking, v. 100, n. 3, p. 990-99, 2007.

TEPE, B; SOKMEN, A. **Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora.** Bior e source Technol, v.98, p. 3076 – 3079, 2007.

TIBURSKI, J. H., et al. **Nutritional properties of yellow mombin (*Spondia mombin* L.) pulp.** Food Research International, v.44, p.2326–2331. 2011.

TIWARI P, et al. **Phytochemical screening and extraction: a review.** Internationale Pharmaceutica Scientia. v. 1, p.98–106. 2011.

UCHOA, A. M. A. et al. **Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais.** Segurança Alimentar e Nutricional, v.15, n. 2, p.58-65, 2008.

WANG, P. et al. **Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat.** Experimental and Toxicologic Pathology. v. 65, p.311–318, 2013.

WANG, Y. **Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity.** Food Chemistry. v. 218, p.152–158, 2017.

WENG, Z. et al. ***Sophora flavescens* Seed as a promising high potential by-product: Phytochemical characterization and bioactivity evaluation.** Industrial Crops & Products. v.109, p.19–26. 2017.

WIJNGAARD, H. H., ROBLE, C., BRUNTON, N. **A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants.** Food Chemistry v.116, p. 202–207, 2009.

XIANG, H. et al. **Chemical compositions, antioxidative, antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activities of *Curcuma aromatica* Salisb. essential oils.** Industrial Crops & Products. v.108, p.6–16, 2017.

ZÉTOLA, M. et al. **CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba-Verbenaceae* (Brazilian false melissa).** Journal Ethnopharmacology, v. 82, p. 207–215, 2002.

ZHANG, L. M.; ZHAO, X.; JI, J. J.; DAI, Y. J. **TG-DTG as an effective method for the characterization of rutin extracted from the buds of.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. p. 1-6, 2008.