UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NAILA ALBERTINA DE OLIVEIRA

**Caracterização da farinha do mesocarpo e do óleo das amêndoas
de Babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.) obtidos via extração com
fluido supercrítico e líquido pressurizado: estudos pré-clínicos e
toxicológicos**

Pirassununga/SP

2018

NAILA ALBERTINA DE OLIVEIRA

Caracterização da farinha do mesocarpo e do óleo das amêndoas de Babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.) obtidos via extração com fluído supercrítico e líquido pressurizado: estudos pré-clínicos e toxicológicos

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Pirassununga/SP

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Naila Albertina

Caracterização da farinha do mesocarpo e do óleo das amêndoas de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.) obtidos via extração com fluido supercrítico... / Naila Albertina Oliveira ; orientadora Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira ; coorientador Prof. Dr. Fukumasu, Heidge . -- Pirassununga, 2018. 208 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Extração supercrítica. 2. Extração líquido pressurizado. 3. Toxicidade. 4. Atividade anti-inflamatória. I. Oliveira, Profa. Dra. Alessandra Lopes de, orient. II. , Prof. Dr. Fukumasu, Heidge, coorient. III. Título.

NAILA ALBERTINA DE OLIVEIRA

Caracterização da farinha do mesocarpo e do óleo das amêndoas de Babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.) obtidos via extração com fluido supercrítico e líquido pressurizado: estudos pré-clínicos e toxicológicos

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Sonho Impossível

(J. Darion - M. Leigh, Versão Chico Buarque e Ruy Guerra/1972
Para o musical para O Homem de La Mancha de Ruy Guerra)

Sonhar
Mais um sonho impossível
Lutar
Quando é fácil ceder
Vencer o inimigo invencível
Negar quando a regra é vender
Sofrer a tortura implacável
Romper a incabível prisão
Voar num limite improvável
Tocar o inacessível chão
É minha lei, é minha questão
Virar esse mundo
Cravar esse chão
Não me importa saber
Se é terrível demais
Quantas guerras terei que vencer
Por um pouco de paz
E amanhã, se esse chão que eu beijei
For meu leito e perdão
Vou saber que valeu delirar
E morrer de paixão
E assim, seja lá como for
Vai ter fim a infinita aflição
E o mundo vai ver uma flor
Brotar do impossível chão

A Deus, por me proporcionar forças suficientes para desenvolver este trabalho.

Aos meus pais, Maria e Delcino, que sempre estiveram ao meu lado, com muito amor,
paciência... paciência... e amor!

Mãe, eu te amo muito, Deus me permitiu ser sua filha, e agradeço todos os dias! O maior
exemplo de que a força do amor sempre vence.

Dedico ao meu pai

Utopia

(Padre Zezinho)

Das muitas coisas
Do meu tempo de criança
Guardo vivo na lembrança
O aconchego de meu lar
No fim da tarde
Quando tudo se aquietava
A família se ajeitava
Lá no alpendre a conversar
Meus pais não tinham
Nem escola, nem dinheiro
Todo dia, o ano inteiro
Trabalhavam sem parar
Faltava tudo
Mas a gente nem ligava
O importante não faltava
Seu sorriso, seu olhar (...)
Tudo aos poucos se ajeitava (...)
Passou o tempo
Hoje eu vejo a maravilha
De se ter uma família
Quando tantos não a tem (...)

AGRADECIMENTOS

À Professora Alessandra Lopes de Oliveira, por me receber prontamente quando a procurei, por ter paciência, me ensinar que o impossível pode ser feito e que toda história tem, de fato, começo, meio... e fim! O meu MUITO OBRIGADA terá duração ETERNA!

Ao Professor Heidge Fukumasu, que colaborou e mostrou como fazer ciência de forma ética, crítica e como ser cientista.

Ao Professor, e querido amigo, Paulo José do Amaral Sobral, por todos os conselhos, atenção, motivação, estímulo e pela repetição incansável da frase *“Vai dar tudo certo...! Acredite!”*

À Professora Silvana Lima Górnaiak, pela oportunidade de realizar os meus experimentos no CEPTOX, aos conselhos profissionais e para a vida.

À querida Professora Cláudia Madalena Caldera Mori, por me ensinar como ser pessoa, pesquisadora, profissional, cientista, sempre respeitando os animais, os seres humanos, de forma calma, respeitosa, simples e com amor e carinho.

À Professora Maria Martha Bernardi, por me ensinar como analisar os dados de comportamento.

À Professora Cláudia Momo, por contribuir nas análises histológicas.

À Professora Eliana Setsuko Kamimura, por tantos ensinamentos e conselhos sábios e carinhosos.

Ao Professor Rogério Lacaz Ruiz.

Aos professores do departamento de Engenharia de Alimentos, por terem me acolhido e ajudado sempre que precisei, me aconselhando, me orientando. Em especial à Professora Christianne Elisabete da Costa Rodrigues, muito obrigada por tudo!

À minha muito querida amiga e companheira Thaisa Sandini Meira, que esteve ao meu lado me ensinando, me orientando, me ouvindo, me aconselhando... A amizade que a

USP/FMVZ/VPT trouxe para o resto da vida, seja qual for o país em que ambas residirmos, nossa amizade será ETERNA e a gratidão também!

À Elaine Cristina Lanzoni Martinelli, que sempre esteve presente nas horas de alegria, tristeza, trabalho, conselhos, “ouvidoterapia”. MUITO OBRIGADA por estar presente nas horas necessárias quando tudo parecia desabar e não ter saída; você sempre trazia a luz da esperança, enxugava as minhas lágrimas e me dizia “*Vai dar tudo certo, minha querida!*” A gratidão que tenho será ETERNA!

Ao casal mais querido do CEPTOX, Leonilda Ester Reinert Rasplantini e Paulo Cesar Rasplantini, muito obrigado por contribuírem no desenvolvimento dos meus experimentos, por me ouvirem, por me aconselharem, por serem meus pais no trabalho, por torcerem por minhas vitórias, por enxugarem as minhas lágrimas quando tudo estava complicado, por serem a família do CEPTOX, que será para a vida toda.

Às pessoas mais especiais que ganhei da USP para a vida: Patrícia Tatemoto, Juliana Bombardelli, Elaine Cristina Lanzoni Martinelli, Thaisa Sandini Meira, Maria Carolina Capellini (uma amiga especial que Deus enviou na hora certa).

À minha grande e muito amada amiga Bruna Leonel Gonçalves e sua família, da USP para SEMPRE!!! Muito obrigada! Sou grata a Deus por enviar você para a minha vida.

À bibliotecária mais querida da FZEA/USP, Vanessa Rodrigues, MUITO OBRIGADA!!!

À Karin Maia Monteiro, da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP.

Ao Nilson José Ferreira, por me auxiliar e por colaborar na realização do meu trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Alta Pressão e Produtos Naturais da FZEA/USP.

A todos os funcionários do CEPTOX (Baladore, Marcus, Estevam), pela ajuda e convivência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo Nº 2015/04729-0), pela concessão da bolsa de estudos e reserva técnica.

RESUMO

OLIVEIRA, N. A. de. **Caracterização da farinha do mesocarpo e do óleo das amêndoas de Babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.) obtidos via extração com fluido supercrítico e líquido pressurizado: estudos pré-clínicos e toxicológicos.** 2018. 202 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Enquanto as amêndoas de babaçu são conhecidas por fornecer óleo rico em zinco, fósforo e potássio, seu mesocarpo possui propriedades anti-inflamatórias ainda pouco exploradas. Este estudo visou determinar a composição físico-química e o potencial de toxicidade *in vivo* do óleo de amêndoas de babaçu e da farinha de seu mesocarpo (ambos extraídos com CO₂ supercrítico) bem como avaliar a atividade anti-inflamatória do mesocarpo (extraído com etanol pressurizado). Os extratos foram obtidos via técnicas inovadoras de extração que evitam a degradação de compostos termossensíveis e os resultados aqui alcançados apontam para a composição de extratos obtidos via tecnologia verde e sua caracterização. A extração com fluido supercrítico (SFE) é uma tecnologia limpa (pois não emprega solventes orgânicos) e promissora para obter extratos enriquecidos em compostos com atividade biológica como, por exemplo, fitosteróis. Por sua vez, a extração com líquido pressurizado (PLE) é considerada rápida, eficiente e seletiva, sendo este trabalho o primeiro a isolar os flavonoides do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu extraído via PLE. Os resultados indicaram que os maiores rendimentos de extração do óleo foram de 55,34 g/100g usando álcool isopropílico como solvente pressurizado e de 53,12 g/100g usando etanol. Tais rendimentos representam 92,4 e 88,7% do total de óleo nas sementes, respectivamente. Rico em ácidos láurico, mirístico, oleico e palmítico, o perfil de ácidos graxos foi o mesmo para os dois solventes nas condições operacionais utilizadas. Com uso de álcool isopropílico, o extrato apresentou a maior concentração de β -sitosterol mediante 3 min de contato com o solvente (St) e 66% de volume de solvente ($\cong$ 7,48 mL, SV). Com uso de álcool etílico, a maior concentração de β -sitosterol ocorreu para 3 min de tempo de contato (St) e 94% ($\cong$ 10,25 mL) de volume de solvente (SV). Em função da composição de ácidos graxos, os principais TAGs presentes no óleo foram COL, LOL, LOM, LOP e MOP. Na SFE, os maiores rendimentos do óleo de babaçu variaram de 51,94 a 57,71 g/100g (para 25 MPa) e de 53,65 a 59,93 g/100g (para 35 MPa), para temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C. A maior concentração de β -sitosterol (27,43 mg/100g de óleo) foi obtida na extração a 70 °C e 25 MPa. Os extratos do mesocarpo de babaçu também foram obtidos via PLE com etanol pressurizado. O maior rendimento (2,95%) e a maior concentração de fenólicos totais

(1.257,25 mgGAE/100g) de pó dos extratos do mesocarpo de babaçu foram obtidos a 86 °C e 3 min (St). A maior atividade antimicrobiana na inibição de *Staphylococcus aureus* ocorreu extrações com menores tempos de contato (St) e elevadas temperaturas (na faixa supra), condições que também propiciaram os melhores rendimentos de extração e atividade antioxidante. O estudo de toxicidade foi feito para o óleo de amêndoas de babaçu obtido via SFE. Na dose aguda de 2.000 mg/kg e no estudo subagudo nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg de óleo (doses repetidas), os resultados indicaram que este óleo não apresenta letalidade aos animais. Para avaliar a atividade anti-inflamatória foi utilizado o extrato do mesocarpo de babaçu obtido com etanol pressurizado a 86 °C e 3 min (St). Tal atividade foi confirmada para a dose de 30 mg/kg, administrada em ratos com processo inflamatório induzido com carragenina a 3%. Embora tenham sido constatadas a baixa toxicidade do óleo e a atividade anti-inflamatória do extrato do mesocarpo, mais estudos de avaliação toxicológica são necessários para aplicações do óleo de amêndoas e do extrato de mesocarpo de babaçu em produtos farmacêuticos, alimentícios e/ou cosméticos.

Palavras-chave: Extração com fluido supercrítico. Extração com líquido pressurizado. Toxicidade. Atividade anti-inflamatória

.

ABSTRACT

OLIVEIRA, N. A. de. **Characterization of mesocarp flour and almonds oil from babassu (*Orbignya phalerata*, Mart.) as obtained via supercritical fluid and pressurized liquid extractions**: preclinical and toxicological studies. 2018. 202 p. PhD Thesis – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of Sao Paulo, Pirassununga, 2018.

While babassu almonds are known for providing oil rich in zinc, phosphorus and potassium, its mesocarp has anti-inflammatory properties yet underexplored. The present study aimed at determining physical-chemical composition and *in vivo* toxicity potential of babassu almonds oil and its mesocarp flour (both extracted with supercritical CO₂) as well as anti-inflammatory activity of babassu mesocarp (extracted with pressurized ethanol). Extracts were obtained using innovative extraction techniques that avoid the degradation of thermosensitive compounds and results here obtained point to the composition of extracts obtained via green technology and their characterization. Supercritical fluid extraction (SFE) is a promising clean technology (as organic solvents are not employed) to obtain extracts enriched in compounds with biological activity (e.g. phytosterols). In its turn, pressurized fluid extraction (PFE) is considered fast, efficient and selective, this work being the first to isolate flavonoids from ethanolic extract of babassu mesocarp extracted via PLE. Results indicated that highest extract yields of babassu oil were 55.34 g/100 g with isopropyl alcohol as pressurized solvent and 53.12 g/100 g with ethanol as solvent. Aforesaid extracts respectively represent 92.4% and 88.7% of total oil in seeds. Rich in lauric, myristic, oleic and palmitic acids, the fatty acid profile was the same for the two solvents and applied operating conditions. Using isopropyl alcohol, extract had the highest β -sitosterol concentration for 3 min contact time with solvent (St) and 66% of volume of solvent, $\cong$ 22.44 mL (SV). Using ethyl alcohol as solvent, highest β -sitosterol concentration occurred for St = 3 min and SV = 94% $\cong$ 31.96 mL. According fatty acids composition, main TAGs present in oil were COL, LOL, LOM, LOP and MOP. In SFE, highest yields of babassu oil ranged from 51.94 to 57.71 g/100 g (at 25 MPa) and from 53.65 to 59.93 g/100 g (at 35 MPa) at temperatures of 40, 50, 60, 70 and 80 °C. The highest concentration of β -sitosterol (namely, 27.43 mg/100g-oil) was obtained for extraction at 70 °C and 25 MPa. Babassu mesocarp extracts were also obtained via PLE with pressurized ethanol. The highest yield (2.95%) and the highest total phenolic concentration (1,257.25 mgGAE/100g) of babassu mesocarp extract were obtained at 86 °C and 3 min (St). The highest antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus* inhibition occurred for lower contact time (St) values and higher temperatures (in aforesaid values), which were conditions also providing the best extraction yields and antioxidant activity. Toxicity study was carried out for babassu almond oil obtained via SFE. At the acute dose of 2,000 mg/kg and in subacute

dose study at 1, 3 and 5 mg/kg of oil (repeated doses), results indicated that this oil did not present lethality in animals. Anti-inflammatory activity was evaluated by using babassu mesocarp extracted with pressurized ethanol at 86 °C and 3 min (St). Such activity was confirmed at 30 mg/kg dose administered in rats with induced inflammatory process with carrageenan at 3%. While low toxicity of oil and anti-inflammatory activity of mesocarp extract were both observed, further evaluation studies are required for applications of almond oil and babassu mesocarp extracts in pharmaceutical, food and/or cosmetic products.

Key words: Supercritical fluid extraction. Pressurized liquid extraction. Toxicity. Anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

2 REVISÃO DE LITERATURA	28
Figura 1 - Coco de Babaçu	30
Figura 2 - Diagrama de fases pressão-temperatura de uma sustância pura	33
CAPÍTULO I: Óleo de amêndoas de babaçu extraído com solventes alternativos pressurizados, sua composição em triacilglicerol e concentração de β-sitosterol	50
Figura 1 - (A) Micrografias eletrônicas de varredura da matéria-prima amêndoa de babaçu, (B) PLE 4 pós-extração (St 9 min, volume de solvente de 94% $\cong$ 31,96 mL, etanol absoluto, 60 °C, teste 4), e (C) PLE 5 (St 2 min, volume de solvente de 80% $\cong$ 27,3 mL, álcool isopropílico, 60, teste 5), (D) EDS.....	59
Figura 2 - Diagrama de Pareto mostrando os efeitos do tempo estático (St) e volume de solvente (SV) no rendimento do extrato de semente de babaçu obtido por PLE com etanol absoluto (A) e álcool isopropílico (B)	62
Figura 3 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que indica a influência das variáveis de processo (St e SV) sobre o rendimento de extratos de óleo de babaçu obtidos por PLE com etanol absoluto	65
Figura 4 - Diagrama de Pareto mostrando os efeitos do tempo estático (St) e volume de solvente (SV) na concentração de β -sitosterol no óleo de amêndoas de babaçu obtido via PLE com isopropanol.....	69
Figura 5 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que indica a influência das variáveis de processo (St e SV) sobre a concentração de β -sitosterol no óleo de amêndoas de babaçu obtido via PLE com isopropanol.....	69
CAPÍTULO II: Propriedades físicas e composição do óleo das amêndoas de babaçu (<i>Orbignya phalerata</i>) obtido via extração com CO₂ supercrítico.....	75
Figura 1 - Curvas cinéticas obtidas a 70 °C, 35 MPa e 10 g/min de CO ₂ usando um extrator de leito fixo de 290 cm ³ com 10 g de amêndoa de babaçu triturada	86
Figura 2 - Micrografias das amêndoas antes (A) e após (B) extração supercrítica a 70 °C e 35 MPa	89
CAPÍTULO III: Otimização do processo de obtenção de extratos do mesocarpo de babaçu (<i>Orbignya phalerata</i>) utilizando tecnologia verde – Extração com etanol pressurizado	99
Figura 1 - Micrografias eletrônicas de varredura do mesocarpo de babaçu	108
Figura 2 - Micrografias do mesocarpo de babaçu pós extração PLE	109
Figura 3 - Gráfico de dispersão de partículas do mesocarpo de babaçu.....	112

Figura 4 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e St no rendimento do extrato do mesocarpo de babaçu obtido via PLE	114
Figura 5 - Superfície de resposta do modelo de primeira ordem para rendimento do extrato de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto	115
Figura 6 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e St na concentração de fenólicos totais do extrato do mesocarpo de babaçu obtido via PLE	116
Figura 7 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e tE na atividade antimicrobiana para <i>Staphylococcus aureus</i> do extrato do mesocarpo de babaçu obtido via PLE.....	119
Figura 8 - Superfície de resposta do modelo de primeira ordem para atividade antimicrobiana para <i>Staphylococcus aureus</i> do extrato de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto	121
Figura 9 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e St na atividade antimicrobiana para <i>Bacillus cereus</i> do extrato do mesocarpo de babaçu obtido via PLE	122
CAPÍTULO IV: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda (28 dias) em ratos do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico enriquecido em beta-sitosterol	127
Figura 1 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico em ratos e ratas no comportamento observado no campo aberto.....	137
Figura 2 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico em ratos e ratas no teste do labirinto em cruz elevada.....	138
Figura 3 - Efeitos da administração subaguda (repetida) das doses de 1, 3 e 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico sobre o consumo de ração e a variação de peso corpóreo em ratos expostos ao óleo durante 28 dias de tratamento comparados ao grupo controle	143
CAPÍTULO V: Avaliação da toxicidade subaguda (28 dias) da farinha do mesocarpo de babaçu em ratos	158
Figura 1 - Efeitos da adição do mesocarpo de babaçu na ração (5, 10 e 15%) sobre o consumo de ração e a variação de peso corpóreo em ratos expostos à farinha de mesocarpo de babaçu durante 28 dias, comparados ao grupo controle	170
CAPÍTULO VI: Efeito do extrato do mesocarpo de babaçu na inflamação induzida por carragenina (edema de pata) em ratos.....	184
Figura 1 - Bloqueio do nervo ciático com cloridrato de bupivacaína (A) contenção, (B) aplicação do anestésico no nervo ciático, (C) nervo anestesiado	191
Figura 2 - Pletismômetro usado na avaliação do edema de pata.....	193
Figura 3 - Extrato de mesocarpo de babaçu diluído	195

Figura 4 - Cromatogramas da identificação da quercetina 270nm (A) e catequina 272nm e epicatequina 278nm (B) no extrato do mesocarpo de babaçu	196
Figura 5 - Edema de pata dos animais do grupo experimental tratados com 30 mg/kg de extrato de mesocarpo de babaçu comparados ao grupo controle (solução salina)	197
Figura 6 - Redução do número de neutrófilos por campo do grupo experimental e do grupo controle.....	199

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Óleo de amêndoas de babaçu extraído com solventes alternativos pressurizados, sua composição em triacilglicerol e concentração de β -sitosterol..... 50

Tabela 1 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com as variáveis reais e codificadas e sua influência na extração do óleo de amêndoa de babaçu com álcool isopropílico e álcool etílico pressurizados 61

Tabela 2 - Perfil de ácido graxos (PAG) (em %) do óleo obtido a partir da amêndoa de babaçu usando PLE 67

Tabela 3 - Composição estimada dos principais TAGs presentes no óleo de babaçu extraído com álcool isopropílico (teste 11) e álcool etílico (teste 4) 68

CAPÍTULO II: Propriedades físicas e composição do óleo das amêndoas de babaçu (*Orbignya phalerata*) obtido via extração com CO₂ supercrítico..... 75

Tabela 1 - Extração global e rendimento de recuperação de óleo de amêndoa de babaçu após 120 min de extração dinâmica..... 87

Tabela 2 - Perfil mineral da farinha do mesocarpo e amêndoas de babaçu 89

Tabela 3 - Propriedades físicas do óleo de babaçu obtido via SFE..... 91

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos (% de massa) de óleo de amêndoa de babaçu obtido via extração SFE..... 92

Tabela 5 - Perfil de triacilgliceróis de óleo de babaçu extraídos por fluido supercrítico nas condições de 25 MPa e 70 °C e 35 MPa e 80 °C..... 93

CAPÍTULO III: Otimização do processo de obtenção de extratos do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) utilizando tecnologia verde – Extração com etanol pressurizado 99

Tabela 1 - Níveis dos dois fatores (T e St) do DCCR no estudo da otimização do rendimento do extrato de mesocarpo de babaçu..... 105

Tabela 2 - Resultados das análises de composição centesimal do mesocarpo de babaçu..... 107

Tabela 3 - Perfil de Minerais da Farinha do Mesocarpo de Babaçu¹ 111

Tabela 4 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que mostra as variáveis (reais e codificadas) e sua influência no rendimento do extrato e na concentração de compostos fenólicos do mesocarpo de babaçu obtido com etanol pressurizado..... 113

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) dos modelos de primeira e segunda ordem para rendimento do extrato de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto..... 114

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira e segunda ordem para a concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto..... 117

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana medida pelo halo de inibição dos extratos do mesocarpo de babaçu extraídos via PLE	118
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para a atividade antimicrobiana para <i>Staphylococcus aureus</i> dos extratos de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto.....	120
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira e segunda ordem para a atividade antimicrobiana para <i>Bacillus cereus</i> dos extratos de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto.....	122
CAPÍTULO IV: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda (28 dias) em ratos do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico enriquecido em beta-sitosterol	127
Tabela 1 - Resultados da análise estatística da variação do consumo de ração entre ratas e ratos após administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu	136
Tabela 2 - Parâmetros de atividade geral (em frequência) observados em ratas e ratos no campo aberto, no 12º dia após a exposição ou não (grupo controle) dos animais após administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu.....	138
Tabela 2.1 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado, de ratas e ratos no 13º dia após a exposição ou não (grupo controle) dos animais após administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu	139
Tabela 3 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico em ratas e ratos nos parâmetros hematológicos (série vermelha)	140
Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico em ratas e ratos nos parâmetros hematológicos (série branca)	140
Tabela 5 - Efeitos da administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico nos parâmetros bioquímicos de ♀=fêmeas e ♂=machos	141
Tabela 6 - Efeitos da administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico no peso relativo dos órgãos	142
Tabela 7 - Parâmetros de atividade geral (em frequência) de ratos observados no campo aberto, no 26º dia após administração das doses de 1, 3 e 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico durante 28 dias ou não (grupo controle)	144
Tabela 7.1 - Parâmetros de atividade geral (em frequência) observados em ratos no labirinto em cruz elevado, no 27º dia após administração das doses de 1, 3 e 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico durante 28 dias ou não (controle) ..	144

Tabela 8 - Parâmetros hematológicos (série vermelha) de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1,3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias.....	145
Tabela 9 - Parâmetros hematológicos (série branca) de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1, 3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias.....	145
Tabela 10 - Parâmetros bioquímicos de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1, 3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias	147
Tabela 11 - Peso relativo dos órgãos (fígado, coração, baço, rins, pulmões e timo) de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1, 3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias.....	148
CAPÍTULO V: Avaliação da toxicidade subaguda (28 dias) da farinha do mesocarpo de babaçu em ratos	158
Tabela 1 - Resultados das análises de composição centesimal do mesocarpo de babaçu.....	169
Tabela 2 - Parâmetros do comportamento no campo aberto de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo <i>pair feeding</i> durante 28 dias.....	171
Tabela 2.1 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo <i>pair feeding</i> durante 28 dias	172
Tabela 3 - Parâmetros hematológicos (série vermelha) de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo <i>pair feeding</i> durante 28 dias.....	172
Tabela 4 - Parâmetros hematológicos (série branca) de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo <i>pair feeding</i> durante 28 dias.....	173
Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo <i>pair feeding</i> durante 28 dias	173
Tabela 6 - Peso relativo dos órgãos (fígado, coração, baço, rins, pulmões e timo) de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo <i>pair feeding</i> durante 28 dias	175
CAPÍTULO VI: Efeito do extrato do mesocarpo de babaçu na inflamação induzida por carragenina (edema de pata) em ratos.....	184
Tabela 1 - Quantidade de flavonoides no extrato do mesocarpo de babaçu	196
Tabela 2 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de mesocarpo de babaçu nos parâmetros hematológicos (série vermelha) de machos	198

Tabela 3 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de mesocarpo de babaçu nos parâmetros hematológicos (série branca) de machos.....	198
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido Gálico
AGM	Ácidos Graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos Graxos Poli-insaturados
ANOVA	Análise de Variância
Ar	Argônio
ASE	Extração com Solvente Acelerado
ASR	Análise de Superfície de Resposta
BA	Braços Abertos
BF	Braços Fechados
CA	Campo Aberto
CLAE	Cromatografia Líquida da Alta Eficiência
CO₂	Dióxido de Carbono
cv.	Cultivar
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
E	Porosidade
EM	Espectro de Massa
Eq.AG	Equivalente em Ácido Gálico
EtOH	Etanol
FID	Detector de Ionização de Chamas
GC/MS	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
H₂	Hidrogênio
H₂O	Água
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
KOH	Hidróxido de Potássio
MeOH	Metanol
MTBE	Terc Butil Metil Éter
N₂	Nitrogênio
NaCO₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Potássio
P	Pressão
PLE	Extração com Líquido Pressurizado
SFE	Extração com Fluido Supercrítico
SV	Volume de Solvente
St	Tempo estático
T	Temperatura
tE	Tempo estático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
	Referências	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	<i>Orbignya phalerata</i> Martius (babaçu) e seus efeitos.....	28
2.2	Extração com Fluido Supercrítico (SFE).....	32
2.3	Extração com Líquido Pressurizado (PLE)	34
2.4	Estudos de Toxicidade <i>in vivo</i>	35
2.5	Compostos Fenólicos	40
2.6	Fitosteróis.....	41
	Referências	42
3	OBJETIVOS	49
3.1	Gerais.....	49
3.2	Objetivos Específicos	49
	CAPÍTULO I: Óleo de amêndoas de babaçu extraído com solventes alternativos pressurizados, sua composição em triacilglicerol e concentração de β -sitosterol	50
I-	Resumo.....	51
I-1	Introdução.....	52
I-2	Material e Métodos.....	54
I-2.1	Amostragem e caracterização física da matéria prima	54
I-2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
I-2.3	Perfil Mineral	54
I-2.4	Densidade real e aparente e porosidade do leito fixo	55
I-2.5	Extração Pressurizada Líquida (PLE).....	55
I-2.6	Identificação e Quantificação de Ácidos Graxos e Composição de Triacilglicerol (TAGs) e Quantificação de β -Sitosterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	56
I-2.7	Análise Estatística	58
I-3	Resultados e Discussão.....	58
I-3.1	Caracterização da matéria prima.....	58
I-3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
I-3.3	Perfil Mineral	60
I-3.4	Rendimento de óleo das amêndoas de babaçu obtido via PLE com isopropanol e etanol	62
I-3.5	Identificação e quantificação do perfil de ácidos graxos e composição de triacilgliceróis (TAGs) e quantificação de β -sitosterol.....	65

I-4	Conclusões	70
I-	Agradecimentos	71
I-	Referências	72
CAPÍTULO II: Propriedades físicas e composição do óleo das amêndoas de babaçu (<i>Orbignya phalerata</i>) obtido via extração com CO ₂ supercrítico		75
II-	Resumo	76
II-1	Introdução	77
II-2	Material e métodos.....	79
II-2.1	Obtenção e caracterização física da matéria prima	79
II-2.2	Propriedades do leito fixo	80
II-2.3	Extração de fluido supercrítico (SFE)	81
II-2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	81
II-2.5	Determinação das propriedades físicas do óleo	82
II-2.5.1	Determinação do índice de refração.....	82
II-2.5.2	Determinação da densidade e viscosidade dinâmica	82
II-2.6	Perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis (TAG).....	83
II-2.7	Quantificação de β -Sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)....	84
II-2.8	Análise Estatística	84
II-3	Resultados e Discussão.....	84
II-3.1	Caracterização da matéria prima.....	84
II-3.2	Densidade real e aparente e porosidade do leito fixo	85
II-3.3	Extração supercrítica do óleo de amêndoa de babaçu	86
II-3.4	Influência do processo de extração na estrutura das partículas das amêndoas	88
II-3.5	Propriedades físicas do óleo	89
II-3.6	Perfil de ácidos graxos, composição em triacilgliceróis (TGA) e concentração de β -sitosterol no óleo	92
II-4	Conclusões	94
II-	Agradecimentos	95
II-	Referências	95
CAPÍTULO III: Otimização do processo de obtenção de extratos do mesocarpo de babaçu (<i>Orbignya phalerata</i>) utilizando tecnologia verde – Extração com etanol pressurizado		99
III-	Resumo.....	100
III-1	Introdução	101
III-2	Material e Métodos.....	103
III-2.1	Obtenção e caracterização física da matéria-prima	103
III-2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	103
III-2.3	Perfil de minerais.....	104

III-2.4	Densidade real, aparente e porosidade do leito fixo	104
III-2.5	Extração com Líquido Pressurizado (PLE)	105
III-2.6	Fenólicos totais	105
III-2.7	Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão de disco	106
III-2.8	Análise estatística	106
III-3	Resultados e Discussão.....	107
III-3.1	Caracterização da matéria-prima.....	107
III-3.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	108
III-3.3	Perfil de minerais.....	110
III-3.4	Densidade real, aparente e porosidade do leito.....	111
III-3.5	Rendimento da extração e otimização do processo.....	113
III-3.6	Compostos Fenólicos Totais (CFT) nos extratos da farinha do mesocarpo de babaçu	
	115	
III-3.7	Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana dos extratos de mesocarpo de babaçu	117
III-4	Conclusões	123
III-	Agradecimentos	123
IV-	Referências	124
CAPÍTULO IV: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda (28 dias) em ratos do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO ₂ supercrítico enriquecido em beta-sitosterol		127
IV-	Resumo.....	128
IV-1	Introdução.....	129
IV-2	Material e métodos.....	130
IV-2.1	Animais	130
IV-2.2	Teste de Toxicidade Oral Aguda	131
IV-2.3	Toxicidade Subaguda (28 dias)	132
IV-2.4	Procedimentos comportamentais	132
IV-2.4.1	Campo Aberto.....	132
IV-2.4.2	Labirinto em Cruz Elevado	133
IV-2.5	Análise hematológica e bioquímica sérica	134
IV-2.6	Necropsia e histopatologia	135
IV-2.7	Análise estatística	135
IV-3	Resultados	135
IV-3.1	Toxicidade oral aguda	135
IV-3.2	Toxicidade subaguda (28 dias) em ratos machos.....	142
IV-4	Discussão	148
IV-5	Conclusão	154

IV-	Agradecimentos	154
IV-	Referências	154
CAPÍTULO V: Avaliação da toxicidade subaguda (28 dias) da farinha do mesocarpo de babaçu em ratos		158
V-	Resumo	159
V-1	Introdução	160
V-2	Material e Métodos	161
V-2.1	Animais	161
V-2.2	Adição da farinha do mesocarpo de babaçu	162
V-2.3	Composição centesimal	162
V-2.4	Toxicidade Subaguda (28 dias)	164
V-2.5	Avaliação de comportamento	164
V-2.5.1	Campo Aberto	165
V-2.5.2	Labirinto em Cruz Elevado	165
V-2.6	Análise de hematologia e bioquímica sérica	166
V-2.7	Necropsia e histopatologia	167
V-2.8	Análise estatística	167
V-3	Resultados	168
V-3.1	Composição da Farinha do mesocarpo de babaçu	168
V-3.2	Toxicidade subaguda (28 dias)	169
V-4	Discussão	176
V-5	Conclusão	179
V-	Agradecimentos	179
V-	Referências	179
CAPÍTULO VI: Efeito do extrato do mesocarpo de babaçu na inflamação induzida por carragenina (edema de pata) em ratos		184
VI-	Resumo	185
VI-1	Introdução	186
VI-2	Material e Métodos	187
VI-2.1	Extração do mesocarpo de babaçu	187
VI-2.2	Quantificação de flavonoides	188
VI-2.3	Animais	189
VI-2.4	Avaliação da atividade anti-inflamatória	189
VI-2.4.1	Administração do extrato de mesocarpo de babaçu	189
VI-2.4.2	Bloqueio do nervo ciático	190
VI-2.4.3	Edema de pata de ratos induzido por carragenina	192
VI-2.5	Análises hematológica e histológica	193

VI-2.6	Análise estatística	194
VI-3	Resultados	195
VI-3.1	Extração e preparo do extrato do mesocarpo de babaçu	195
VI-3.2	Quantificação de flavonoides do extrato de mesocarpo de babaçu	195
VI-3.3	Avaliação da resposta inflamatória	197
VI-3.4	Análises hematológica e histológica	198
VI-4	Discussão	199
VI-5	Conclusão	201
VI-	Agradecimentos	202
VI-	Referências	202
4	CONCLUSÕES GERAIS	205
5	TRABALHOS FUTUROS	208

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que contém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial (BRASIL, 2006). As plantas medicinais nativas da flora brasileira se enquadram nessa porcentagem, sendo responsáveis pela produção e desenvolvimentos de medicamentos fitoterápicos.

Esta biodiversidade, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi criada com o intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo na área de plantas medicinais e fitoterápicos, visto que o uso de plantas na medicina popular é muito amplo no Brasil. Assim, a criação de uma política nacional direcionada e específica no quesito plantas medicinais constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social, bem como elo importante de transversalidade em ações de promoção da saúde e qualidade de vida no Brasil (BRASIL, 2016).

A maior biodiversidade encontrada no Brasil está diretamente associada a uma rica diversidade étnica e cultural, de fauna e flora, que detém um estimado conhecimento popular combinado ao uso e aplicação de plantas medicinais (BRASIL, 2016). Outro fator importante a ser considerado, é o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados aplicáveis em tecnologias e terapêuticas apropriadas para o uso de cada planta designada de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS), que consta na lista das 71 espécies vegetais da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS (BRASIL, 2009).

Os princípios que nortearam a elaboração da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos incluem a promoção de melhoria da atenção à saúde, uso responsável, científico e sustentável da biodiversidade brasileira e fortalecimento da agricultura familiar, geração de emprego e renda, desenvolvimento industrial e tecnológico e perspectiva de inclusão social e regional em estados do Norte e Nordeste. Nestas regiões o extrativismo vegetal é uma fonte de renda familiar e outros princípios se referem à participação popular e controle social sobre as ações decorrentes dessa iniciativa (BRASIL, 2016).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos neste país, além de estimular o desenvolvimento e produção de tecnologias e inovações, voltadas

diretamente para o desenvolvimento de novos fitoterápicos oriundos de plantas medicinais brasileiras, assim como exercer o fortalecimento das cadeias produtivas de pequenas comunidades extrativistas, tais como Associação de Mulheres Quebradeiras de Coco Babaçu do Município de São Luís Gonzaga – Maranhão (AMTQC), o Movimento Interestadual das Quebradeiras de Coco de Babaçu (MIQCB), ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento de novos produtos oriundos do Complexo Produtivo da Saúde.

O uso popular expressivo das plantas medicinais está distante de ser esgotado. Tal afirmação está apoiada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Novos conhecimentos acerca do reino vegetal são futuras soluções para a escassez, para o desenvolvimento de novos medicamentos, haja vista que o desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações, tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação, ainda são interrompidas por eventos adversos descobertos em estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, já que de 70 a 80% das pesquisas de novos medicamentos, sejam eles oriundos de plantas ou ativos sintéticos, são interrompidas nas etapas de pesquisa pré-clínica ou em estudos de pesquisa clínica de fase I (COSTA-LUFOTO et al., 2009).

Em virtude do crescente interesse popular e institucional no sentido de fortalecer a fitoterapia no SUS, foram intensificadas iniciativas a partir da década de 1980. Nesse contexto, políticas, programas, resoluções, portarias e relatórios foram elaborados com ênfase nesse tema. Contudo, esse programa objetivou desenvolver terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, por meio do estabelecimento de medicamentos fitoterápicos originados a partir da determinação do real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais, com vistas à sua inclusão na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME).

No que se refere ao babaçu, esta pesquisa visou o estabelecimento de um estudo do emprego de inovação tecnológica na obtenção, caracterização e doses de consumo deste importante fitoterápico empregado na medicina popular brasileira e listado como uma das 71 espécies vegetais de interesse do SUS descrita na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS (BRASIL, 2009).

Os métodos de extração sólido-líquido mais amplamente usados para obter extratos ricos em compostos ativos podem ser divididos em “tradicionais” e “novos”. As técnicas tradicionais são essencialmente embasadas nos processos de difusão e osmose, incluindo extração Soxhlet, a qual ocorre sob ebulição e refluxo do solvente e agitação ultrassônica. Os mais novos métodos de extração têm sido: extração com fluido supercrítico (SFE), extração por líquido pressurizado (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE)

(SMIDERLE et al., 2017; VANDENBURG et al., 1999). Os métodos tradicionais de extração são realizados à pressão atmosférica, já nos novos métodos é possível alterar as condições de temperatura, bem como a pressão.

Nesse sentido, a presente pesquisa estudou extratos obtidos por dois destes métodos considerados inovadores, extração com fluido supercrítico (SFE) e com líquido pressurizado (PLE), ambos operados em condições de pressão elevada.

Referências

BRASIL, RENISUS. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. **Portal Saúde**, Brasília, v. 24, 2009. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Política e programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção 1, p. 2. 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos; histórico perspectivas. **Química nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

SMIDERLE, F. R. et al. Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β -d-glucans from mushrooms. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 156, p. 165-174, 2017.

VANDENBURG, H. J. et al. Comparison of pressurised fluid extraction and microwave assisted extraction with atmospheric pressure methods for extraction of additives from polypropylene. **Analyst**, Cambridge, v. 124, p. 397-400, 1999.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Orbignya phalerata* Martius (babaçu) e seus efeitos

O nome do babaçu tem origem Tupi-Guarani em que *ba* é fruto e *açu*, grande. É uma palmeira nativa das regiões de matas coqueirais do cerrado norte, nordeste e central do Brasil. Algumas espécies são identificadas nas diferentes regiões, como *Orbignya phalerata* Martius, *O. martiana* Barbosa Rodrigues, *O. barbosiana* Burret. A espécie *Orbignya oleifera* Burret, chamada de babaçu do cerrado, é encontrada nos estados de Minas Gerais e Bahia, onde é utilizada basicamente para produção de óleo para subsistência (CRUZ, 2011). O fruto dessa palmeira é elipsoidal e dividido em epicarpo (11-13%), mesocarpo (20-23%), endocarpo (57-63%) e amêndoas (7-9%) (VINHAL et al., 2014).

A palmeira *Orbignya phalerata* Mart. (família Arecaceae) é popularmente conhecida no Maranhão e nordeste do Brasil. Esta palmeira é a espécie mais abundante do gênero *Orbignya*, sendo a espécie predominante na área geográfica chamada "Região dos Cocais". O fruto da palmeira de babaçu é plenamente explorado, sendo usado como fonte de energia, alimento e medicamento (SOUZA et al., 2011).

A amêndoa de babaçu é uma oleaginosa com grande potencial na produção de biodiesel, devido ao alto teor de óleo nela disponível. A amêndoa compreende 60% do coco e é rica em ácido láurico, enquanto o óleo de babaçu é constituído por ácidos graxos saturados e insaturados com predominância do ácido láurico (LIMA, 2007).

O principal produto do babaçu é o óleo da amêndoa, constituindo 65% do peso, esse óleo é classificado como subproduto para a fabricação de sabão, glicerina e óleo comestível, posteriormente transformado em margarina, e de uma torta utilizada na produção de ração animal e de óleo comestível (ALBIERO et al., 2007).

Segundo Carvalho et al. (2011), o uso de produtos tais como polpa e o resíduo derivado de babaçu para o tratamento de gastrite e de cicatrização de feridas é parte do conhecimento popular acumulado ao longo dos séculos.

A avaliação pré-clínica dos efeitos terapêuticos do mesocarpo do babaçu demonstrou que este produto possui atividades antitumorais, anti-inflamatórias e propriedades antimicrobianas (BARROQUEIRO et al., 2011). Da mesma forma, também é utilizada na medicina popular para o tratamento de dismenorreia, constipação, obesidade, reumatismo, tumores, tais como leucemia e doenças venosas, úlceras, doenças inflamatórias relacionadas, tais como a colite e artrite e, finalmente, doenças infecciosas (BARROQUEIRO et al., 2011).

Ferreira et al. (2006) descreveram o efeito da *Orbignya phalerata* em escala microscópica no processo de cicatrização de feridas induzidas na bexiga de ratos. Batista

(2006) concluiu que o extrato aquoso do mesocarpo, na dose de 50 mg/kg, por via intraperitoneal em ratos foi capaz de favorecer completa coaptação de bordas da cicatriz gástrica, quando comparada ao grupo controle, nos animais submetidos à eutanásia no sétimo dia do período pós-operatório.

No estudo com administração do extrato aquoso do mesocarpo do babaçu na dose de 50 mg/dia durante 30 dias, Pinheiro et al. (2010) constataram que em camundongos machos das linhagens BALB/c (TH2), DBA/2 (TH2), CBA (TH1) e C57BL/6 (TH1) (5 animais/grupo), com idade entre 2 e 3 meses, o extrato aquoso do mesocarpo de babaçu foi capaz de reduzir o número de células esplênicas nas linhagens C3H/HePas e BALB/c. Vale ressaltar que a concentração de colesterol total foi maior nos grupos tratados com o extrato do mesocarpo do babaçu na linhagem CBA e menor do que o controle nos camundongos C3H/HePas.

O estudo do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*, *Palmae*) administrado em camundongos swiss machos de 2 a 3 meses de idade por um período de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias, indicou um aumento dos títulos séricos de anticorpos IgM anti-tiroxina durante todo o tratamento, sem aumento do anticorpo IgG anti-tiroxina, que sugere que o aumento da produção do anticorpo IgM pode ser um fator preditivo no desenvolvimento de doenças autoimunes da tireoide (PINHEIRO et al., 2010).

A administração oral é a principal via de aplicação do mesocarpo para o tratamento de doenças inflamatórias do estômago (gastrite). O óleo de babaçu também tem sido usado por via oral ou mesmo sob a forma de banhos para o tratamento de vulvovaginite. A aplicação tópica de produtos do babaçu (óleo, resíduos e mesocarpo) também é comum para o tratamento de fase I e fase II de feridas cutâneas (SOUZA et al., 2011).

May, Neto e Cheves Pozo (2000) afirmam que além de utilizar a casca para produzir carvão, as famílias utilizam o mesocarpo do babaçu, que apresenta 60% de amido, o que o torna uma excelente fonte de carboidrato para alimentação. Em populações rurais e em tempos de escassez, a farinha do mesocarpo é usada como alimento pela produção de mingau (água e farinha), considerada excelente remédio para alterações gastrointestinais.

De maneira geral, o fruto tem potencial em indústrias de cosméticos, na obtenção de óleo comestível, margarinas, saboarias, velas, carvão, etanol, ácido acético, metanol, alcatrão, celulose e papel. Da amêndoa ainda pode-se obter rações, ácidos graxos e glicerinas. Em escala comercial, somente o carvão e o óleo têm sido produzidos. Na culinária, o uso é muito restrito uma vez que não concorrem em preço e qualidade nutricional com outros óleos, como o de soja, girassol e amendoim. A torta do babaçu, apesar de possuir qualidade inferior à da soja, é utilizada nas formulações regionais de rações para animais (SOLER; VITALI; MUTO, 2007).

O mesocarpo do babaçu é formado por materiais lignocelulósicos, que são constituídos de mistura de celulose, hemicelulose e lignina. Por isso, pode ser usado como sequestrador de corantes em meio aquoso, proporcionando resultados satisfatórios na remoção do corante têxtil verde de oliva. Ainda, estudos corroboram que a remoção de corantes têxteis utilizando mesocarpo do babaçu pode ocorrer pelo fenômeno de adsorção física (SOBRINHO et al., 2015).

Figura 1 - Coco de Babaçu

Fonte: Própria autoria, 2018.

Nos últimos anos, moléculas bioativas de plantas atraíram a atenção de cientistas devido ao crescente interesse pela saúde humana. De todos os metabólitos secundários da planta, compostos fenólicos foram extensivamente estudados e são comumente usados como antioxidantes para uma ampla gama de aplicações. Vários vegetais, particularmente plantas medicinais, têm sido amplamente estudados por sua atividade antioxidante natural. Compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes naturais adequados para substituir os

sintéticos e interferir no processo de oxidação e na alteração de lipídios, proteínas e DNA (NEFFATI et al., 2017). Os antioxidantes naturais também podem fornecer proteção contra doenças degenerativas, particularmente doenças cardiovasculares, câncer e inibição radicais livres (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

O babaçu é uma das plantas tradicionais nativas da flora brasileira e tem um grande potencial na finalidade medicinal. A farinha do mesocarpo de babaçu é usada como suplemento alimentar na alimentação escolar por seus valores nutritivos. Outro emprego desta farinha são os extratos ricos em compostos fenólicos, flavonoides, apigenina, catequina, epicatequina e quercetina. Tais compostos que promovem atividade biológica como medicamento, sendo atividade antimicrobiana (BARROQUEIRO et al., 2016), atividade antioxidante (MANIGLIA; TÁPIA-BLÁCIDO, 2016) e antinociceptiva (PINHEIRO; BOYLAN; FERNANDES, 2012).

O mesocarpo de babaçu é extraído da farinha em pó e dissolvido em água para uso popular como suplemento alimentar, pois é rico em carboidratos e sais minerais (GAITAN et al., 1994). Da mesma forma, também é usado na medicina popular para o tratamento de dores menstruais, constipação, obesidade, reumatismo, ulcerações, leucemia e tumores e, finalmente, em doenças inflamatórias relacionadas, como colite e artrite (DA SILVA; PARENTE, 2001; CAETANO et al., 2002). O uso de farinha de mesocarpo de babaçu como medicamento é empírico e baseado no conhecimento popular, que recomenda dissolver duas colheres de sopa de farinha de mesocarpo de babaçu em 1 litro de água e utilizá-lo duas vezes ao dia por via tópica ou oral, dependendo da doença.

As propriedades anti-inflamatórias e analgésicas do mesocarpo de babaçu foram confirmadas experimentalmente usando um extrato de clorofórmio dos frutos secos (MAIA; RAO, 1989; DA SILVA; PARENTE, 2001). O efeito pode estar relacionado aos triterpenos presentes em *Orbignya phalerata* (GARCÍA et al., 1995). Outros compostos também foram encontrados no babaçu, como taninos, açúcares, saponinas e compostos esteroides (BANDEIRA et al., 1986).

Na indústria de ervas medicinais, a condição de extração pode influenciar o isolamento e a caracterização de compostos. De fato, a variação na composição e a atividade antioxidante estão relacionadas às técnicas de pós-colheita, tipo de solvente, preparação de amostras e método de extração (TANKO et al., 2005). Ao avaliar a extração de compostos fenólicos, o tipo de solvente tem sido considerado como um dos fatores mais importantes; sendo os mais utilizados água ou solventes orgânicos, tais como, etanol, metanol, acetona e éter dietílico (DORTA; LOBO; GONZALEZ, 2012). Assim, a quantidade e qualidade do extrato final são influenciadas pelo tipo de solvente utilizado para a extração de compostos bioativos.

Fenólicos totais, flavonoides totais, polifenóis não flavonoides e ácido ascórbico são os principais antioxidantes, que possuem maior afinidade com solventes hidrofílicos. A polaridade do solvente de escolha na extração de compostos fenólicos, portanto, tem um efeito significativo (CHAN et al., 2009). Qualitativa e quantitativamente, o etanol e o metanol são os principais solventes de escolha, pois são amplamente utilizados na indústria de bebidas, alimentos e cosméticos. Devido à sua eficiência na extração de compostos fenólicos, o etanol é um solvente verde, mais adequado para consumo humano (sendo o Brasil um dos maiores produtores), reutilizável e não tóxico (YAKOUB et al., 2018).

2.2 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

A extração convencional com solventes orgânicos é muito utilizada para obter extratos naturais, mas apresenta desvantagens como uma seletividade muito baixa, alto custo energético e possível perda de compostos durante a remoção dos solventes. A alta solubilidade e vantagens associadas a brandas temperaturas tornam a extração com fluido supercrítico (SFE) muito atrativa para obter extratos de produtos naturais (MALAMAN et al., 2011).

SFE é um processo de separação baseado no contato de uma substância que contém compostos extraíveis com um solvente em condições supercríticas. SFE é considerada uma tecnologia “verde” ou de baixa toxicidade ao ambiente e à saúde humana, quando se considera a ausência de resíduos de solventes orgânicos no produto final. Esta técnica tem sido utilizada para obter extratos de muitos produtos naturais com o objetivo de aplicação nas áreas farmacêuticas e de alimentos, dessa forma, SFE é uma tecnologia promissora para obtenção de novos produtos (OLIVEIRA; KAMIMURA; RABI, 2009).

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que apresenta propriedades P-V-T (pressão-volume-temperatura) acima dos seus valores críticos. Enquanto abaixo do ponto crítico, uma substância pode existir como sólido, líquido ou vapor (Figura 2). Na região supercrítica, que corresponde a uma zona onde $T > T_c$ e $P > P_c$, as variações das propriedades termodinâmicas podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (BRUNNER, 2005; SANDLER, 1989). Este fluido exibe propriedades físico-químicas intermediárias entre as de um gás e de um líquido, o que aumenta sua função como solvente. Sua densidade relativamente alta lhe confere um bom poder de solvência, enquanto que sua viscosidade relativamente baixa e sua alta difusividade promovem um apreciável poder de penetração na matriz do soluto (RIERA et al., 2004; RIZVI et al., 1986).

A eficiência da extração supercrítica deve-se às seguintes considerações: (a) alta variação da solubilidade com dependência da densidade e, portanto, da temperatura e pressão do solvente; (b) aumento da seletividade com aproximação do valor da pressão do

solvente à pressão crítica do mesmo; e (c) variação na solubilidade com o peso molecular do soluto, para solutos de estrutura molecular semelhante (BROGLE, 1982; RIZVI et al., 1986). A seletividade do dióxido de carbono pode ser controlada com temperatura e pressão, ou seja, a extração seletiva de materiais de alta e baixa volatilidade torna-se possível pela escolha apropriada e manipulação correta das condições de operação.

Figura 2 - Diagrama de fases pressão-temperatura de uma substância pura

Fonte: Própria autoria, 2018.

Diferentes substâncias têm temperatura e pressão críticas distintas. Estas propriedades são importantes na seleção de fluidos e condições apropriadas para a aplicação de um processo de SFE. O fluido usado pode ser reciclado ou usado com perda mínima. Entre os fluidos estudados, o CO_2 é o mais comum porque tem propriedades críticas mais baixas quando comparadas com outras substâncias. Atualmente, a extração com CO_2 supercrítico converteu-se numa técnica promissora usada em muitas áreas. Alguns motivos para o uso são que o solvente possui baixa toxicidade, é reciclável, barato, relativamente inerte, não inflamável e o processo melhora a qualidade dos produtos (MENDES et al., 2003; RIERA et al., 2004). A extração supercrítica é um processo para a produção de extratos naturais limpos e o conhecimento da composição de extratos é crucial para a identificação de prováveis compostos ativos (PEIXOTO; OLIVEIRA; CABRAL, 2010).

Nos extratos, há substâncias polares e apolares com atividades. O dióxido de carbono como fluido supercrítico é um solvente com alta eficiência na extração de óleo devido a sua natureza apolar, extraíndo eficientemente compostos apolares, como misturas complexas de

óleo essencial, ésteres, terpenos, ácidos graxos, ceras, resinas e pigmentos naturais. A extração dos compostos bioativos polares pode ser obtida adicionando pequenas quantidades de outros solventes (cossolventes), por exemplo, etanol (ALBUQUERQUE, 2008; CONTADO et al., 2010).

Nos últimos anos, a extração com fluidos supercríticos tem recebido uma crescente atenção como uma importante alternativa aos métodos tradicionais de separação para a obtenção de compostos de interesse. Sendo CO₂ o solvente supercrítico, os extratos podem ser obtidos sem contaminação de solventes orgânicos residuais, além de não apresentar degradação térmica devido à sua baixa temperatura crítica (31 °C) (MENDES et al., 2003).

Os fluidos supercríticos são utilizados como processos de extração de baixa toxicidade para o meio ambiente. Suas propriedades de solubilização como líquido e de transporte como gás permitem um processo eficiente e rápido de extração, além de sua eliminação completa nos extratos já que o CO₂, por exemplo, é um gás em condições normais (DEL VALLE; URREGO, 2012; POVILAITIS; VENSKUTONIS, 2015).

SFE é uma técnica eficiente para extrair analitos hidrofóbicos de amostras sólidas. Com a adição de uma pequena fração de modificadores polares (como metanol ou etanol), o dióxido de carbono supercrítico é frequentemente usado como solvente de extração. O fluido supercrítico tem uma viscosidade mais baixa e os analitos têm maiores difusividades no fluido supercrítico em comparação com os solventes líquidos convencionais, permitindo maiores taxas de extração. Os parâmetros do processo pressão, temperatura e fração cossolvente facilitam o ajuste da seletividade, que por sua vez influencia a composição do material extraído (ABRAHAMSSON et al., 2018).

2.3 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

A PLE permite extração rápida (menos do que 30 min) dos analitos em ambiente inerte a alta pressão, porém geralmente igual ou menor que 20 MPa e temperaturas entre 25 a 200 °C. Uma grande vantagem da PLE sobre os métodos convencionais de extração por solventes conduzidos à pressão atmosférica é a de que os solventes a maior pressão permanecem no estado líquido bem acima dos seus pontos de ebulição. Isso permite alta temperatura de extração, condição que melhora a interação analito-solvente, aumentando a solubilidade e melhora na cinética de dessorção dos compostos bioativos a partir das matrizes. Assim, os solventes de extração, tais como o etanol que não é tão eficiente em extrair antocianinas e outros polifenóis em baixas temperaturas, podem ser muito mais eficientes para as temperaturas elevadas usadas no PLE (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012).

A técnica de PLE atualmente é considerada uma tecnologia verde, pois utiliza solventes de baixa toxicidade. A química verde tem como filosofia desenvolver e incentivar a utilização de procedimentos que reduzam o uso ou a produção de substâncias altamente tóxicas e perigosas para o meio ambiente (MUSTAFA; TURNER, 2011).

No estudo da obtenção de extratos de sementes de pitanga via PLE, Oliveira et al. (2014) constatou que a técnica de extração com líquido pressurizado (PLE) pode ser considerada vantajosa na obtenção de produtos naturais. A PLE ou extração por solvente acelerado (ASE) apresenta resultados similares aos de Soxhlet, em termos de recuperação, repetibilidade e seletividade na extração; contudo, tanto os tempos de extração como o consumo de solvente sofrem considerável redução. O aumento da temperatura diminui a viscosidade do solvente, fazendo com que haja melhor penetração na matriz e aumento da difusividade. A redução do tempo de extração permite uma preservação da matriz vegetal, fato no qual os compostos bioativos da amostra são conservados.

A alta pressão na PLE impulsiona o solvente para o interior da matriz, o que facilita a extração, ao passo que a alta temperatura promove a solubilidade mais elevada do analito, pelo aumento da taxa de transferência de massa e pela diminuição da viscosidade da tensão superficial dos solventes; dessa forma, ocorre maior eficiência na extração. No estado líquido, é possível obter rendimentos mais elevados de extratos num tempo mais curto utilizando volumes significativamente menores de solventes do que em métodos de extração convencionais (CASTRO-PUYANA et al., 2013).

Esta tese visou garantir o acesso seguro e o uso racional de componentes e extratos de plantas nomeados fitoterápicos, otimizando e desenvolvendo tecnologias *green* com solventes de baixa toxicidade. Tais solventes são seguros para saúde e meio ambiente quando utilizados em baixas quantidades ou de forma controlada.

2.4 Estudos de Toxicidade *in vivo*

A toxicologia é uma ciência que estuda os efeitos danosos decorrentes da influência mútua das substâncias químicas com organismos vivos em geral, englobando também os agentes físicos causadores de efeitos tóxicos. Como ciência, define através de estudo qualitativo e quantitativo os efeitos nocivos de substâncias químicas ou agentes físicos, bem como alterações estruturais (lesões anatômicas/histológicas) e de resposta à exposição do organismo frente à substância tóxica (alterações bioquímicas, fisiopatológicas e alterações comportamentais) (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Os testes de toxicidade permitem caracterizar o quão nociva é uma substância, a dose/resposta entre a exposição, o agente químico, suas reações adversas e principalmente as doses críticas de exposição, informações essas que, no conjunto, contribuem para

estimar efeitos nocivos em humanos decorrentes da exposição a uma determinada substância química (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

O potencial tóxico de uma substância pode ser determinado por estudos *in vitro*, *in vivo*, em organismos uni ou pluricelulares, suas vias potenciais de exposição e as respostas esperadas na espécie estudada. Estudos pré-clínicos em mamíferos são muito utilizados devido à semelhança com o homem, fato o qual prediz melhor os efeitos esperados e o mecanismo de ação do agente químico, objetivando aumentar a confiabilidade na extrapolação dos resultados para humanos (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como medicina tradicional, alternativa ou complementar o uso tradicional de plantas para manutenção, prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de saúde, seja em doenças físicas ou mentais, baseado em crenças ou cultura popular (WHO, 2014).

Na medicina tradicional, bem como nas abordagens holísticas amplamente utilizadas desde séculos, derivados de origem vegetal e animal são utilizados com o intuito de aliviar e/ou curar muitas condições patológicas. Devido ao seu conteúdo de compostos ativos (fenólicos, flavonoides e ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3), qualquer alimento em geral tem o potencial de ir além de seu valor nutricional como fonte de macro e micronutrientes, e também pode ser usado como um medicamento dependendo da dose. No entanto, deve-se atentar para os potenciais fatores de risco relacionados ao uso de produtos oriundos de matrizes vegetais, tais como segurança do material de partida, ausência de compostos alergênicos, ausência de toxicidade, ausência de contaminantes exógenos e endógenos, possível presença de metabólitos secundários tóxicos e/ou poluentes ambientais que possam potencialmente causar uma ameaça à saúde (SANTINI; TENORE; NOVELLINO, 2017).

Além disso, a utilização tradicional de medicamentos fitoterápicos refere-se ao longo uso histórico desses medicamentos. Seu uso é bem estabelecido e amplamente reconhecido como seguro e eficaz (do ponto de vista toxicológico), sendo geralmente aceito pelas autoridades de saúde (ELISABETSKY, 1986; ELISABETSKY; WANNMACHER, 1993). Estudos da etnofarmacologia visam identificar as plantas e extrair os compostos com atividade biológica, utilizando condições semelhantes (de preferência idênticas) às descritas na medicina popular, com o intuito de testar e validar biomarcadores relacionados à atividade farmacológica de um determinado composto de origem vegetal, diretamente relacionado à doença e, com isso, avaliar os efeitos toxicológicos do extrato testado *in vivo* (animais e humanos), identificando e determinando efeitos dose-resposta para, assim, propor uma dose terapêutica para o extrato (MA et al., 2017; MAIMOONA et al., 2011; WANG et al., 2015; GRANATO; NUNES; BARBA, 2017).

A incidência e o mecanismo de toxicidade de muitos fitoterápicos, plantas, vegetais e grãos utilizados mundialmente, todavia, são desconhecidos. Efeitos tóxicos mesmo em estudos pré-clínicos ou em estudos clínicos podem ser inconclusivos, pois aspectos como fatores ambientais (época do ano, forma de secagem ou técnica de extração) são fatores que impactam diretamente na quantidade de ativos em estudos de toxicidade (BAE et al., 2014).

Com relação ao desenvolvimento de novos fármacos, os estudos são divididos em duas etapas principais: estudos pré-clínicos, que são realizados em modelos celulares e animais, e os estudos clínicos, que são desenvolvidos em seres humanos. A Resolução CNS 251/97 infere que estudos pré-clínicos realizados em animais sejam parâmetros para justificar a condução de estudos clínicos em humanos. Os resultados dos estudos pré-clínicos devem prever possíveis aplicações terapêuticas, efeitos adversos e possíveis danos reversíveis e irreversíveis à saúde humana (BRASIL, 1997).

A avaliação de toxicidade é utilizada com o intuito de determinar o quanto uma substância pode ser considerada tóxica, sendo ela advinda de medicamentos, alimentos ou cosméticos. Tais avaliações são importantes para estabelecer se há toxicidade e quais os sintomas relacionados com um quadro de intoxicação aguda pertinente ao ativo em estudo.

O teste da DL_{50} foi introduzido para avaliar substâncias que poderiam ser utilizadas em humanos. Contudo, o teste de determinação de DL_{50} teve como objetivo principal definir uma dose letal de um medicamento para 50% dos animais do grupo teste; desde então, esse teste começou a ser amplamente utilizado para classificação de toxicidade de diversas substâncias. Atualmente, a utilização da DL_{50} foi gradualmente substituída pelo protocolo OECD-420 que usa menor número de animais (como, por exemplo, três fêmeas), permitindo assim verificar inicialmente a classificação toxicológica da substância teste.

Estudos pré-clínicos devem indicar o grau de confiabilidade de um medicamento que poderá ter uso em humanos. Para tanto, estudos de toxicidade aguda (dose única), subaguda (28 dias), crônica (90 dias), genotoxicidade, carcinogênese, e teratogênese são necessários para determinar a existência ou ausência de sinais clínicos sistêmicos de toxicidade, a atividade farmacêutica, via de administração, farmacocinética, farmacodinâmica e posteriormente estudos clínicos fases I, II, III e IV. Vale ressaltar que estudos pré-clínicos devem ter no mínimo três espécies distintas, roedores e não roedores, envolvendo machos e fêmeas (OECD, 2001).

O emprego destes estudos tem a finalidade de descobrir ações qualitativas ou quantitativas diferentes, produzidas ao longo do período de exposição do produto, e, conseqüentemente, possibilitar a medição do período de latência do desenvolvimento de efeitos tóxicos e o acúmulo do composto ativo no organismo (LAPA et al., 2007).

Estudos toxicológicos permitem estabelecer o potencial terapêutico, o perfil de letalidade ou sinais de toxicidade, doses terapêuticas e tóxicas, interação medicamentosa ou alimentar que podem potencializar ou diminuir a concentração plasmática do ativo ou metabólito no organismo. Dessa forma, estudos de toxicodinâmica e toxicocinética são importantes para estabelecer determinados parâmetros que podem influenciar na absorção e distribuição de determinados agentes, bem como na capacidade de gerar ativos mais potentes durante a biotransformação (VALADARES, 2007). Além disso, há ensaios *in vivo* e *in vitro* para avaliar genotoxicidade, a carcinogenicidade, a imunotoxicidade, além de protocolos para avaliar a toxicidade reprodutiva (NUGENT; DUNCAN; COLAGIOVANNI, 2013).

Com relação aos ativos do óleo de babaçu e do extrato de mesocarpo de babaçu, sabe-se que os fitosteróis do óleo têm ação anti-inflamatória e os flavonoides do mesocarpo tem atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. Contudo, efeitos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica não estão descritos na literatura para tais substâncias nos extratos de babaçu. Tais ensaios seguem como parâmetro inicial o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, regido pela Resolução RE nº 90/04 (BRASIL, 2004).

O desenvolvimento de novo fármaco sintético ou fitoterápico tem importantes etapas para garantir a segurança de sua utilização futura. Etapas de avaliação botânica, estudos de farmacotécnica, ensaios pré-clínicos executados em animais de laboratório (camundongos, ratos, coelhos, cães e porcos e/ou primatas), ensaios clínicos de fase I, II, III e IV devem ser realizados para garantir o uso seguro em seres humanos (CAVALCANTE et al., 2007).

A pesquisa clínica é baseada em estudos clínicos conduzidos para desenvolver novos medicamentos ou para avaliar a bioequivalência de um medicamento genérico frente ao medicamento de referência. O medicamento genérico é o que contém o mesmo fármaco (princípio ativo), na mesma dose e forma farmacêutica, e é administrado pela mesma via e com a mesma indicação terapêutica e segurança do medicamento de referência no país. A intercambialidade entre os medicamentos é possível, sendo definida pela substituição segura do medicamento de referência pelo medicamento genérico (BRASIL, 1997).

A Fase I consiste em avaliar a tolerância/segurança do medicamento em um número limitado de indivíduos saudáveis. A partir de resultados satisfatórios na primeira etapa, passa-se à Fase II – se não forem detectados eventos adversos relacionados ao medicamento teste. Nessa fase são realizados testes em voluntários portadores da patologia (doença para a qual o medicamento pode ser o tratamento), com número restrito de voluntários (doentes), para avaliar a eficácia do tratamento frente à doença. Se os resultados são positivos nessa fase, tal fase servirá de guia para nortear a condução da Fase III. Nesta fase, estudos

terapêuticos expandidos são realizados para determinar o risco-benefício do tratamento com o fármaco novo estudado (QUENTAL; SALES FILHO, 2006).

A realização da Fase IV ocorre quando o produto já está sendo comercializado. Seus efeitos colaterais são reavaliados e, posteriormente, se novos efeitos colaterais forem observados por médicos, profissionais da saúde e/ou pacientes, tais efeitos serão descritos na bula do medicamento. Se eventos adversos severos que causam danos permanentes ao paciente forem documentados na Fase IV, o fármaco deverá ser reavaliado do mesmo modo em um novo estudo de Fase III, para que a segurança e eficácia sejam verificadas e notificadas à agência regulatória nacional e internacional (em todos os países do mundo onde o medicamento é comercializado), através da realização de estudos clínicos multicêntricos (QUENTAL; SALES FILHO, 2006).

A fim de harmonizar a forma de condução de estudos de toxicidade em parcerias com outras agências e instituições internacionais, a OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) desenvolveu protocolos de condução de estudos pré-clínicos com animais, padronizando metodologias que pudessem ser utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, agências regulatórias e universidades. Tais protocolos se tornaram guias para regulamentar as substâncias sintéticas e de origem vegetal. Os protocolos de avaliação de toxicidade oral aguda (protocolo nº 420) e de toxicidade oral em doses repetidas 28 dias em roedores (protocolo nº 407) norteiam e fundamentam o uso de animais de laboratório nas etapas iniciais de pesquisas com princípios ativos estudados para desenvolvimento de futuros fármacos. Fundamenta-se assim a conformidade de estudos clínicos para as agências regulatórias, de tal modo a comparar sua similaridade com humanos e predizer se tal substância pode ser usada no futuro. É possível comparar a farmacocinética e a biodisponibilidade do medicamento (e a biotransformação em um organismo vivo, antecedendo seus efeitos e avaliando também a segurança e eficácia do uso em humanos).

A espécie a ser utilizada é uma escolha que deve ser pautada no que se pretende estudar e qual serão as respostas esperadas, para que seja baseada na sensibilidade do que se almeja avaliar. A espécie roedora é a mais utilizada em estudos de toxicidade, avaliação de desreguladores endócrinos e em estudos de toxicidade inalatória e de administração oral; em geral ratos são mais utilizados devido à sensibilidade da espécie para avaliar tais aspectos (CAMPOS et al., 2009).

O protocolo de toxicidade oral aguda (método doses fixas, protocolo nº420 da OECD) tem como principais aspectos avaliar o aparecimento de sinais de toxicidade a partir da exposição a doses de 5, 50, 2.000 e 5.000 mg do possível ativo/kg de peso vivo do animal. O teste é iniciado com a menor dose que evidentemente não cause sinais de toxicidade e que não levem o animal a óbito. A não apresentação de sinais de toxicidade ou morte dos animais expostos à substância estudada define se o estudo terá continuidade; da mesma

forma, a ocorrência de óbitos ou aparecimento de sinais de toxicidade determinam a finalização do estudo. Nesse teste são utilizados preferencialmente ratos, especificamente fêmeas e na quantidade de três animais por dose testada, com administração oral da substância por gavagem (sondagem oro-gástrica) (OECD, 2001).

Estudos de toxicidade de doses repetidas são utilizados para mimetizar os efeitos tóxicos locais e sistêmicos que as substâncias de uso crônico podem oferecer à saúde humana. Para tanto, animais de laboratório como ratos são usados em modelos de estudo de exposição aguda, 28 dias e 90 dias para avaliar se há sinais de toxicidade com o uso agudo, subagudo e crônico. Em estudos de toxicidade subaguda, efeitos adversos em potencial são estudados e futuramente serão relatados em bulas de medicamento.

A OECD dispõe do protocolo nº 407 de toxicidade oral em doses repetidas (28 dias) em roedores, utilizando ratos machos e fêmeas (adultos com 60 dias de idade) e o número mínimo de 5 animais por grupo. Esse protocolo recomenda a utilização de um grupo controle com 10 animais para avaliação dos efeitos de toxicidade nas doses a serem testadas. Esta indicação torna mais evidente a observação da persistência, reversibilidade e efeitos depois de decorridos o período de 28 dias de tratamento.

No período de administração da substância ativa, sinais clínicos tais como hiperexcitabilidade, consumo de água e ração e alterações de peso corporal devem ser observados. Após o período do estudo, devem ser avaliados parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos dos órgãos-alvo, além dos pesos absolutos e relativos dos órgãos. Recomenda-se que sejam avaliadas, também, alterações de sistema imunológico, sistema nervoso central e sistema endócrino (OECD, 2008).

2.5 Compostos Fenólicos

Os flavonoides são uma das importantes classes de fitoquímicos abundantemente encontrados em todas as plantas. Catequina é um "flavonol" e o termo "catequina" se originou do catechu, que é obtido do extrato fervido de *Mimosa catechu*, ricamente encontrado no chá verde (WEISS; ANDERTON, 2003), chá preto (HENNING et al., 2003) e sementes de uva (FERRUZZI et al., 2009). As catequinas têm demonstrado vários efeitos farmacológicos, tais como analgésico e anti-inflamatório (NAKANISHI et al., 2010; GANESHPURKAR; SALUJA, 2018).

Membro da família flavonoides, a catequina é uma mistura de compostos químicos como galato de galocatequina, galato de epicatequina e galato de epigalocatequina (FUKUDA et al., 2009). É uma categoria de fenol natural com atividade antioxidante e encontrada como metabólito secundário em plantas que apresenta propriedade de remoção

de radicais livres, removendo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que levam à proteção de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (LOBO et al., 2010).

Atualmente, cientistas de todo o mundo adotaram uma nova estratégia que envolve o uso de ervas e agentes dietéticos como flavonoides, terpenoides e polifenóis, para combater vários tipos de enfermidades (NEWMAN; CRAGG, 2007). Sabe-se que os produtos naturais exercem efeitos protetores, pois atuam na remoção de radicais livres e na imunomodulação. Estudos epidemiológicos têm sugerido que produtos naturais ricos em flavonoides reduzem os riscos de diabetes, distúrbios neurodegenerativos, distúrbios cardiovasculares e câncer (CLERE et al., 2011; FU et al., 2011; GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; HOENSCH et al., 2010; MANDEL et al., 2008; WANG; MORRIS, 2007; SHAHID et al., 2016).

Os efeitos benéficos da catequina na saúde humana têm sido demonstrados e comprovados por estudos epidemiológicos e *in vitro* (GOH et al., 2015; HIGDON; FREI, 2003; ALSHATWI, 2010; CAPORALI et al., 2004; SCALTRITI et al., 2005).

2.6 Fitosteróis

Fitoesteróis são componentes estruturais de membranas celulares vegetais com uma estrutura semelhante ao colesterol; no entanto, diferenciam-se na cadeia lateral pela introdução de um grupo etil ou metil. Estes componentes possuem a capacidade de tornar a absorção do colesterol ineficaz e, conseqüentemente, têm um potencial efeito de redução do colesterol em nível sérico. De fato, muitos ensaios clínicos demonstraram que os fitoesteróis incorporados em vários alimentos em doses aproximadas de 2 g/dia são capazes de reduzir cerca de 9% (em média) os níveis de colesterol LDL em seres humanos. As fontes mais concentradas destes compostos (sitosterol, campesterol e estigmasterol) são óleos vegetais, sementes, nozes e leguminosas (SANGLEMENTE et al., 2012).

Moléculas de β -sitosterol são vitais, pois estabilizam as bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares. Este fitoesterol tem muitos benefícios à saúde em doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares e diabetes. Fitoesteróis são insolúveis em água (1 a 2% em água) e pouco solúveis em gordura e óleo (3 a 4% em óleo) (YIN et al., 2018).

Os fitoesteróis campesterol e β -sitosterol são usados como marcadores metabólicos para avaliar tanto a absorção como a síntese do colesterol. Para tanto, tais moléculas atuam como fármacos usados no tratamento da hipercolesterolemia. A redução do colesterol sérico ocorre porque os fitoesteróis atuam tanto na absorção como na excreção transintestinal. A competição do fitoesterol com as moléculas de colesterol ocorrem nas micelas intestinais, interferindo assim na taxa de absorção do colesterol no lúmen do intestino (BOMBO, 2014).

Referências

- ABRAHAMSSON, V. et al. Multicomponent inverse modeling of supercritical fluid extraction of carotenoids, chlorophyll A, ergosterol and lipids from microalgae. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 139, p. 53-61, 2018.
- ALBIERO, D. et al. Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) para a agricultura familiar. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 37, n. 03, p. 337-346, 2007.
- ALBUQUERQUE, C. L. C. **Extração supercrítica de matrizes vegetais oleaginosas: rendimento global, cinética de extração, composição química e atividade antioxidante**. 2008. 120 f. Dissertação - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- ALSHATWI, A. A. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 167, 2010.
- BAE, J. W. et al. Characterizing the human equivalent dose of herbal medicines in animal toxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 162, p. 1-6, 2015.
- BANDEIRA, M. A. M. et al. Contribuição ao estudo químico do coco babaçu. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 1, p. 27-28, 1986.
- BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Evaluation of acute toxicity of babassu mesocarp in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, p. 710-714, 2011.
- BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Immunomodulatory and Antimicrobial Activity of Babassu Mesocarp Improves the Survival in Lethal Sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2016, 2016.
- BATISTA, C. P. et al. Efeito do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização do estômago em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 3, p. 26-321, 2006.
- BOMBO, R. P. A. Ação dos fitoesteróis sobre lesão aterosclerótica em camundongos com ablação gênica do receptor de LDL. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 90. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- _____. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n. 251 de 07 de agosto de 1997. Normas de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1997. p. 21117.
- BROGLE, H. CO₂ in solvent extraction. **Chemistry and Industry**, Chichester, p. 385-390, 1982.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, London, v. 67, n. 1, p. 21-33, 2005.

CAETANO, N. et al. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 12, p. 132-135, 2002.

CAMPOS, S. V. et al. Toxicidade sobre aguda e crônica. In: CORRÊA, C. L. et al. **Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos**. São Paulo: ILSI-Brasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, cap. 4, p. 95-130, 2009.

CAPORALI, A. et al. The chemopreventive action of catechins in the TRAMP mouse model of prostate carcinogenesis is accompanied by clusterin over-expression. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 11, p. 2217-2224, 2004.

CARVALHO, I. M. C. M. M. et al. Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 720, p. 58-61, 2011.

CASTRO-PUYANA, M. et al. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 13, p. 4607-4616, 2013.

CAVALCANTE, W. L. G. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, p. 490-497, 2007.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Reduction, refinement and replacement of animal use in toxicity testing: an overview. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CHAN, S. W. et al. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 16, n. 2, p. 203-213, 2009.

CLERE, N. et al. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry** (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents), v. 9, n. 2, p. 62-77, 2011.

CONTADO, E. W. N. F. et al. Estudo dos métodos de extração de carotenóides em cenoura por fluido supercrítico (EFS) e convencional. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. spe, 2010.

CRUZ, E. T. L. **Caracterização do Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya sp.*): termoanálise (TG/DTA) e Avaliação do conteúdo de Amido**. 2011. Monografia do curso de Farmácia. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, Milano, v. 72, n. 8, p. 887-893, 2001.

DEL VALLE, J. M.; URREGO, F. A. Free solute content and solute-matrix interactions affect apparent solubility and apparent solute content in supercritical CO₂ extractions. A hypothesis paper. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 66, p.157-175, 2012.

DORTA, E.; LOBO, M. G.; GONZALEZ, M. Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 77, n. 1, p. C80-C88, 2012.

ELISABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. **Journal of Ethnobiology**, v. 6(1), pp. 121-128, 1986.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, n. 2-3, p. 129-135, 1993.

FERREIRA, E. C. F. et al. Análise da cicatrização da bexiga com o uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (babaçu): Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, supl. 3, p. 33-39, 2006.

FERRUZZI, M. G. et al. Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 18(1), p. 113-124, 2009.

FU, Z. et al. Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 8, p. 1218-1225, 2011.

FUKUDA, I. et al. Suppression of cytochrome P450 1A1 expression induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse hepatoma hepa-1c1c7 cells treated with serum of (-)-epigallocatechin-3-gallate and green tea extract-administered rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1206-1208, 2009.

GAITAN, E. et al. Antithyroid effects in vivo and in vitro of babassu and mandioca: a staple food in goiter areas of Brazil. **European journal of endocrinology**, Bristol, v. 131, n. 2, p. 138-144, 1994.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. Protective effect of catechin on humoral and cell mediated immunity in rat model. **International Immunopharmacology**, v. 54, p. 261-266, 2018.

GARCÍA, S. et al. Triterpene methyl ethers from *Palmae* epicuticular waxes. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 39, n. 6, p. 1381-1382, 1995.

GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537-552, 2009.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 13-22, 2017.

GOH, R. et al. Green tea catechins reduced the glycaemic potential of bread: an in vitro digestibility study. **Food Chemistry**, v. 180, p. 203-210, 2015.

HENNING, S. M. et al. Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. **Nutrition and Cancer**, v. 45, p. 226-235, 2003.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 89-143, 2003.

HOENSCH, H. et al. Colorectal cancer prevention by flavonoids. **Medizinische Klinik** (Munich, Germany: 1983), v. 105, n. 8, p. 554-559, 2010.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

LIMA, J. R. O. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

MA, Y. Q.; WANG, X.; GAO, S. Hypoglycemic Activity of Polysaccharides from Sweet Corn cob on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 1, p. 208-213, 2017.

MAIA, M. B. S.; RAO, V. S. Anti-inflammatory activity of *Orbignia phalerata* in rats. **Phytotherapy Research**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 170-174, 1989.

MAIMOONA, A. et al. Analysis of total flavonoids and phenolics in different fractions of bark and needle extracts of *Pinus roxburghii* and *Pinus wallichiana*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 13, p. 2724-2728, 2011.

MALAMAN, F. S. et al. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n. 1, 1/1, p. 85-92, 2011.

MANDEL, S. A. et al. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 14, n. 4, p. 352-365, 2008.

MANIGLIA, B. C.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 55, p. 47-55, 2016.

MAY, P. V.; NETO, F. C.; CHEVES POZO, O. V. **Valoração econômica da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2000. 90 p.

MENDES, R. L. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 356, p. 328-334, 2003.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.

NAKANISHI, T. et al. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, p. 145-150, 2010.

NEFFATI, N. et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of medicinal plants collected from the Tunisian flora. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 31, n. 13, p. 1583-1588, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NUGENT, P.; DUNCAN, J. N.; COLAGIOVANNI, D. B. The preparation of a preclinical dossier to support an investigational new drug (ind) application and first-in-human clinical trial. In: FAQI, A. S. **A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development**. London: Elsevier, 2013. p. 309-333.

OLIVEIRA, A. L. et al. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora*). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 145, p. 522-529, 2014.

OLIVEIRA, A. L.; KAMIMURA, E. S.; RABI, J. A. Response surface analysis of extract yield and flavour intensity of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) obtained by supercritical carbon dioxide extraction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 189-194, 2009.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2008.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2001.

PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Composition of supercritical carbon dioxide extracts of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, Hoboken, v. 33, n. 5, p. 848-860, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Kidlington, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PINHEIRO, M. M. G.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: evidence for the involvement of apigenin. **Life Sciences**, London, v. 91, n. 9-10, p. 293-300, 2012.

PINHEIRO, M. T. et al. Efeito do mesocarpo de babaçu no metabolismo de carboidratos em camundongos de diferentes linhagens. **Revista de Ciências da Saúde**, São Luís, v.12, n.1, P. 11-17, 2010.

POVILAITIS, D.; VENSKUTONIS, P.R. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of rye bran using response surface methodology and evaluation of extract properties. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 100, p. 194-200, 2015.

QUENTAL, C.; SALLES FILHO, S. Ensaios clínicos: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 408-424, 2006.

RIERA, E. et al. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 241-244, 2004.

RIZVI, S. S. H. et al. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modelling methods. **Food Technology**, Chicago, v. 40, p. 55-65, 1986.

SANCLEMENTE, T. et al. Naturally-occurring phytosterols in the usual diet influence cholesterol metabolism in healthy subjects. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 22, n. 10, p. 849-855, 2012.

SANDLER, S. I. **Chemical and engineering thermodynamics**. 2nd ed. New York: Wiley 1989. 622 p.

SANTINI, A.; TENORE, G. C.; NOVELLINO, E. Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 53-61, 2017.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, London, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.

SCALTRITI, M. et al. Molecular classification of green tea catechin-sensitive and green tea catechin-resistant prostate cancer in the TRAMP mice model by quantitative real-time PCR gene profiling. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2005.

SHAHID, A. et al. Modulatory effects of catechin hydrate against genotoxicity, oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by benzo (a) pyrene in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 92, p. 64-74, 2016.

SOBRINHO, O. P. L. et al. Uma proposta de aula experimental utilizando mesocarpo de babaçu (*Orbignya speciosa*) na remoção do azul de metileno de soluções aquosas. **Educación Química**, México, v. 26, n. 4, p. 314-318, 2015.

SOLER, M. P.; VITALI, A. A.; MUTO, E. F. Tecnologia de quebra do coco babaçu (*Orbignya speciosa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 717-722, 2007.

SOUZA, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 133, p. 1-5, 2011.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. Manole, 2008.

TANKO, H. et al. Pre-and post-harvest processing of medicinal plants. **Plant Genetic Resources**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 304-313, 2005.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VINHAL, J. O.; LIMA, C. F.; BARBOSA, L. C. Analytical pyrolysis of the kernel and oil of babassu palm (*Orbignya phalerata*). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 107, p. 73-81, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.02.005>.

WANG, D. et al. Evaluation of kudzu root extract-induced hepatotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 321-326, 2015.

WANG, X.; MORRIS, M. E. Effects of the flavonoid chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics in rats: potential involvement of ABCG2. **Drug Metabolism and Disposition**, 2006.

WEISS, D. J.; ANDERTON, C. R. Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, n. 1-2, p. 173-180, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional Medicine Strategy 2014–2023**. WHO, Geneva: 2014, 71 pp.

YAKOUB, A. R. B. et al. Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 118, p. 206-213, 2018.

YIN, Y. et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 9, p. 1525-1533, 2018.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

A presente tese teve como objetivos gerais:

- Otimizar condições operacionais dos processos de extração que empregam alta pressão, sendo extração com fluido supercrítico (SFE) e extração com líquido pressurizado (PLE), com intuito de obter extratos do mesocarpo e do óleo das amêndoas de babaçu;
- Determinar a composição da farinha e das amêndoas de babaçu bem como caracterizar os extratos obtidos via PLE e os óleos obtidos via SFE e PLE;
- Avaliar a toxicidade do extrato na condição otimizada em ensaios pré-clínicos de toxicidade.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram determinados de acordo com cada capítulo da tese:

- Realizar a caracterização físico-química da matéria-prima, mesocarpo e sementes (amêndoa) do babaçu (Capítulo I);
- Estudar as variáveis do processo de extração com fluido supercrítico (SFE) e líquido pressurizado (PLE) de maneira a obter altos rendimentos de extratos (Capítulos I e II);
- Avaliar a composição dos extratos do mesocarpo e da amêndoa do babaçu buscando compostos cujas atividades biológicas possam ser atribuídas (Capítulos II e III);
- Avaliar se estes extratos possuem atividade microbiológica e antioxidante (Capítulo III);
- Realizar testes *in vivo* de toxicidade aguda, subaguda, doses repetidas e atividade anti-inflamatória (Capítulos IV, V e VI).

CAPÍTULO I: Óleo de amêndoas de babaçu extraído com solventes alternativos pressurizados, sua composição em triacilglicerol e concentração de β -sitosterol

Naila Albertina de Oliveira^a, Alessandra Barbosa dos Santos Garcia^a, Heidge Fukumasu^b, Alessandra Lopes de Oliveira^{a*}

^aLTAPPN, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ^bFaculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: alelopes@usp.br. Telefone: +55 1935654268.

I- Resumo

O volume de solvente (SV) e o tempo de contato (St) entre o solvente e a matriz sólida são duas variáveis importantes no processo de extração com líquido pressurizado (PLE). O comportamento destas variáveis foi avaliado na extração de óleo de amêndoa de babaçu usando-se dois tipos de solventes, a saber: álcool etílico e álcool isopropílico. Enquanto SV foi significativo para PLE usando álcool etílico, St foi a variável significativa para PLE com álcool isopropílico como solvente. A análise de superfície de resposta (ASR) indicou que alto St resulta em rendimentos elevados, independentemente da quantidade de solvente. Os maiores rendimentos foram de 55,34 g/100 g para álcool isopropílico e 53,12 g/100 g para álcool etílico, o que representa 92,4% e 88,7% de óleo nas sementes, respectivamente. Rico em ácidos láurico, mirístico, oleico e palmítico, o perfil de ácidos graxos foi o mesmo, independentemente do solvente e das condições operacionais utilizadas. A PLE com álcool isopropílico apresentou a maior concentração de β -sitosterol para St = 3 min e SV = 66% $\cong$ 22,44 mL. Para PLE com álcool etílico, a maior concentração de β -sitosterol ocorreu para St = 2 min e SV = 80%. Em função da composição de ácidos graxos, os principais triacilgliceróis presentes no óleo de babaçu foram COL, LOL, LOM, LOP e MOP. Além disso, este óleo é rico em Zn, P e K.

Palavras-chave: *Orbignya phalerata*. Perfil de ácidos graxos. Conteúdo mineral. Extração com líquido pressurizado.

I-1 Introdução

O babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) é uma palmeira nativa das regiões de coqueirais do Norte, Nordeste e Centro do Cerrado do Brasil. A fruta é composta principalmente por epicarpo (11-13%), mesocarpo (20-23%), endocarpo (57-63%) e amêndoas (7-9%) (VINHAL; LIMA; BARBOSA, 2014). A produção nacional de amêndoa de babaçu em 2015 foi de 77,9 ton (CONAB, 2016).

A amêndoa de babaçu é considerada oleaginosa e importante para a indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia, devido ao alto teor de óleo (60%) disponível. O óleo é frequentemente usado na fabricação de margarina, sabão e glicerina, e seu subproduto é usado na produção de ração animal (ALBIERO et al., 2007). Além disso, o óleo contém o ácido láurico como seu ácido graxo predominante (DE OLIVEIRA LIMA et al., 2007). A amêndoa de babaçu também é rica em potássio (3,294 µg/g), fósforo (3,395 µg/g), magnésio (1,673 µg/g), cálcio (397 µg/g) e zinco (22 µg/g) (NAOZUKA et al., 2011), que são minerais essenciais para a saúde humana.

O óleo de sementes de babaçu é rico em fitoesteróis, dentre eles o β -sitosterol. A concentração de β -sitosterol no óleo de babaçu de acordo com a Comissão do *Codex Alimentarius* (2008) é de aproximadamente 48,2 a 53,9 mg/kg e de acordo com Bezerra e Antonioisi Filho (2014), a concentração de β -sitosterol no óleo é de 380 mg/kg. Os fitoesteróis e os fitoestanois (fitoesteróis saturados) também desempenham um papel importante no corpo humano. Tais compostos influenciam a absorção do colesterol, pois reduzem sua concentração no nível plasmático, sendo um composto importante no controle da hipercolesterolemia (KAMAL-ELDIN; MOAZZAMI, 2009).

Atualmente, a principal forma de extração de óleo de amêndoas de babaçu é realizada em pequena escala, utilizando um processo rudimentar, que emprega as amêndoas em água em altas temperaturas ou por prensagem a frio. A prensagem consiste em esmagar as amêndoas e filtrar o óleo. Estas duas técnicas são atualmente empregadas na obtenção do óleo comercial (ASSOCIAÇÃO REGIONAL DE MULHERES TRABALHADORAS BICO DE PAPAGAIO, [2017?]).

Novos métodos de extração que empregam baixas temperaturas e solventes seguros à saúde têm sido estudados nos últimos anos. A técnica de extração líquida pressurizada (PLE), por exemplo, pode ser utilizada na extração do óleo a partir desta matéria-prima oleaginosa, utilizando solventes alternativos, como álcool isopropílico e álcool etílico.

A PLE permite a extração rápida (menos de 40 min) de solutos em ambiente inerte, a alta pressão (geralmente igual ou menor que 20 Mpa) e temperaturas entre 25 e 200 °C. Uma grande vantagem da PLE sobre os métodos convencionais de extração de solvente conduzidos à pressão atmosférica é que os solventes a pressão mais alta permanecem no

estado líquido bem acima de seus pontos de ebulição.

Isto permite alta difusividade do solvente na matriz, uma vez que sua viscosidade é reduzida. Essas características proporcionam melhor interação soluto-solvente, aumentando, portanto, a solubilidade e melhorando a dessorção dos solutos das matrizes (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012). Essas propriedades do solvente promovem a redução do tempo de extração, o que implica na possível redução dos gastos com energia elétrica. A alta difusividade do solvente e a maior solubilidade do soluto promovem o aumento da taxa de transferência de massa, portanto, há maior eficiência na extração. Isso também é influenciado pela variação de temperatura do processo.

No estudo de processos inovadores de extração, como a PLE, bem como os que usam solventes alternativos, o objetivo é obter maiores rendimentos. Nesse contexto, deve ser avaliada a relação entre o rendimento dos extratos e as variáveis do processo. Estudos analíticos sobre a composição dos extratos, cuja extração foi realizada com líquido pressurizado, indicaram que maiores rendimentos em menor tempo foram obtidos utilizando volumes significativamente menores de solventes do que em métodos convencionais de extração (CASTRO-PUYANA et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014).

Na extração líquida pressurizada, existem muitas variáveis de processo a serem consideradas para sua otimização, com o propósito de se obter um extrato rico em um soluto específico. Neste estudo em particular, o processo foi otimizado considerando o tempo estático de contato do solvente com a matriz em cada lote (St) e o volume de solvente (SV). Ambas as variáveis afetam diretamente o custo de produção. Além disso, os solventes estudados eram solventes seguros para a saúde (etanol e isopropanol), o que classifica este processo como tecnologia verde. As demais variáveis do processo (pressão, número de ciclos ou banho e temperatura da extração) foram mantidas constantes.

No estudo de novos processos e matérias-primas para obter novos produtos, o número de variáveis a serem consideradas é alto. Neste caso, delineamentos estatísticos experimentais foram aplicados com a intenção de reduzir o número de experimentos sem diminuir a influência das variáveis no processo. O delineamento fatorial deste experimento associado à análise de superfície de resposta (ASR), proposto por Box na década de 1950, tem sido aplicado nos últimos anos com esse objetivo. Esta ferramenta, baseada em teoria estatística, fornece informações confiáveis sobre o processo (BOX et al., 1978; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Neste experimento, a influência das variáveis St e SV sobre o rendimento global e composição de ácidos graxos do óleo de amêndoa do babaçu obtido via PLE usando etanol e isopropanol como solvente foi estudada usando um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR) e análise de superfície de resposta (ASR).

I-2 Material e Métodos

I-2.1 Amostragem e caracterização física da matéria prima

As amêndoas de babaçu vieram de Esperantina (latitude: 03° 54 '06 "S longitude: 42° 14' 01" W) e de Teresina (latitude: 05° 05 '21 "S longitude: 42° 48' 07" W), no estado do Piauí. Foram coletadas em junho de 2016. A composição centesimal foi analisada de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). Para essa caracterização foram realizadas as análises de umidade, cinzas, proteína e gordura.

No Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP), as amêndoas foram selecionadas e secas em estufa de circulação de ar (Marconi, Piracicaba, BR) por 48 horas a 50 °C. A determinação da umidade dos grãos foi realizada pelo método gravimétrico de volatilização. As amostras, após serem esmagadas, foram armazenadas em freezer (Frost Free, Brastemp, BR) a -22 °C.

I-2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amêndoas de babaçu moídas foi analisada a partir de imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura modelo TM 3000 Tabletop (Hitachi, Tóquio, JP). Antes da obtenção das imagens, a amostra foi espalhada sobre uma fita de carbono dupla face (Ted Pella, Inc, Redding, EUA), aderida ao orifício da amostra e seca em sílica gel por 24 horas à temperatura ambiente (25 ± 2) °C. As amostras das amêndoas de babaçu moídas e secas foram inseridas nos *stubs* para leitura no equipamento. As amostras foram examinadas em voltagem de 15 kV de acordo com a metodologia de Lu, Weng e Cao (2006) e foi usado o aumento de 100 vezes para as amêndoas de babaçu. As amostras foram analisadas pela MEV sem tratamento prévio, a fim de se caracterizar a matéria-prima. Após a PLE, as amostras também foram avaliadas quanto ao efeito dos solventes nas mesmas.

I-2.3 Perfil Mineral

A determinação dos minerais cobre, ferro, fósforo, manganês, potássio, selênio, sódio e zinco nas amêndoas de babaçu foi realizada por digestão ácida da amostra em forno de micro-ondas (Brastemp, São Bernardo do Campo, BR). As soluções foram analisadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer - Optima 8300, Waltham, EUA). Os minerais foram quantificados através de curvas analíticas construídas a partir de soluções padrão (cobre, ferro, fósforo, manganês, potássio, selênio, sódio e zinco) (Merk, Darmstadt, GR). A análise foi realizada na Central

Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

I-2.4 Densidade real e aparente e porosidade do leito fixo

As amêndoas secas foram trituradas em liquidificador (Arno, São Bernardo do Campo, BR) e o diâmetro médio das partículas foi determinado pelo uso da série Tyler, com conjunto de seis peneiras padrão e agitação por 15 min. O diâmetro médio das partículas foi calculado pela seguinte relação (Eq. 1) (ASAE, 2008-S319.4).

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{j=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{j=1}^n w_i} \right], \text{ com } d_i = (d_i d_{i+1})^{0.5} \quad (1)$$

em que d_i (mm) é a abertura nominal da i -ésima peneira, d_{i+1} (mm) é a abertura nominal da peneira maior que a i -ésima peneira e w_i é a massa do material retido na i -ésima peneira.

A densidade real das amêndoas de babaçu esmagadas foi determinada pela equipe da Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP, utilizando um picnômetro a gás (Quantachrome Ultrapyc 1200e, FL, EUA) e uma balança analítica (Quimis, modelo QI-AS, EUA). O equipamento utilizou o gás hélio para medir o volume. A densidade real das partículas sólidas foi determinada pela técnica de deslocamento de gás.

A densidade aparente foi determinada empiricamente pela relação entre a massa total das amêndoas de babaçu moídas acondicionados no extrator PLE com volume de 32,65 cm³. A massa das amêndoas de babaçu foi empacotada no extrator e pesada por volta de dez vezes em uma balança analítica (SHIMADZU AUY220, Tóquio, JP), e o cálculo da densidade aparente foi representado como a média desses onze testes.

A porosidade do leito extrator foi calculada pela relação entre as densidades real e aparente, utilizando-se a Eq. (2).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (2)$$

em que ε é a porosidade do leito, ρ_a é a densidade aparente, e ρ_r é a densidade real.

I-2.5 Extração Pressurizada Líquida (PLE)

Os óleos de amêndoa de babaçu foram obtidos a partir da extração líquida pressurizada (PLE) nos equipamentos ASE[®] 150, Dionex (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, EUA), com álcool etílico absoluto (99,8%) (Panreac, Barcelona, ES) e álcool isopropílico (Ciclofarma, Serrana, BR) como solventes. Para a escolha dos solventes, foi dada consideração sobre saúde e uso de um solvente seguro para a saúde (Geralmente Reconhecido como Seguro - GRAS).

Para a otimização do processo de PLE, o volume total de solvente (SV) utilizado foi medido para compará-lo com o uso de solventes em métodos convencionais, relacionando isso com o rendimento de óleo.

No estudo da influência nas variáveis do processo, avaliou-se o tempo estático (St) entre o solvente e a matriz no extrator em cada banho ou ciclo e o volume total do solvente (SV). Um delineamento composto central rotacional (DCCR para 2 variáveis independentes) foi usado e estes níveis são mostrados na Tabela 1. As outras variáveis no processo foram mantidas constantes; temperatura de 60 °C, pressão de 10,34 MPa, e o número de ciclos (C), ou lotes foram três (3). O volume da célula de extração utilizada foi de 32,65 cm³.

I-2.6 Identificação e Quantificação de Ácidos Graxos e Composição de Triacilglicerol (TAGs) e Quantificação de β -Sitosterol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada segundo AOAC (método 991.39, 2005) com modificações. Foram pesados 50 mg de óleo da amêndoa de babaçu em um tubo falcon de 50 mL e foram adicionados 4 mL de solução de NaOH 0,5 M (Dinâmica, Diadema, BR). Esta mistura permaneceu em banho maria (Marconi, Piracicaba, BR) a 90 °C durante 4 min. Foram adicionados 4 mL do reagente de esterificação, BF₃ metanólico (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Essa solução foi agitada por 30 s em agitador de tubos (Marconi, Piracicaba, BR) e posteriormente reaquecida a 90 °C por 4 min. A mistura foi mantida em repouso por 1 min em temperatura ambiente e a seguir adicionou-se 4 mL de solução saturada de NaCl (35,7 g de NaCl/100 mL de H₂O) (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, BR). Em seguida, essa solução foi agitada por 30 s em agitador de tubos. Foram adicionados 5 mL de n-hexano (Panreac, Barcelona, ES) e novamente essa solução foi agitada por 30 s em agitador de tubos. Após esse procedimento a solução foi mantida em repouso até a separação completa de fases. Então, a fase sobrenadante contendo ésteres metílicos de ácidos graxos foi seca utilizando N₂ em um concentrador de amostras (Marconi, Piracicaba, BR). Os ésteres metílicos foram diluídos em hexano, na concentração de 10 mg/mL.

A quantificação dos ácidos graxos foi feita em equivalência ao metil meristato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), o qual foi utilizado para a construção da curva padrão nas concentrações de 0 a 14 mg/mL.

Análises de ácidos graxos foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG/MS) (QP, 2010 Plus, Shimadzu, Tóquio, JP) com injetor automático (AOC-5000, Shimadzu, Tóquio, JP). Foi usada uma coluna capilar com fase estacionária de bis-cianopropil polissiloxano (100 m $\pm$ 0,25 mm id $\pm$ 0,20 μ m df, SP-2560 Supelco, Bellefonte, EUA) e hélio foi o gás carreador a uma velocidade interna de 28,8 cm/s.

A temperatura do forno foi regulada para obter uma rampa com início em 100 °C por 1 min, 100 °C a 195 °C a uma razão de 5 °C/min e depois de 195 °C a 250 °C a uma razão de 20 °C/min. A identificação prévia dos picos foi feita através da comparação dos espectros de massas das bibliotecas da NIST acopladas ao equipamento e a quantificação foi feita utilizando curva padrão de metil meristato nas concentrações de 32, 160, 800, 4.000 e 12.500 μ g/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Essas condições cromatográficas foram baseadas na AOAC (método 996.05,2005).

Considerando todos os triacilgliceróis (TAGs) com diferentes ácidos graxos ligados a um glicerol e seus respectivos tipos diferentes de isomerismo, o perfil de TAGs pode incluir mais de 100 componentes. A análise experimental específica para óleos e gorduras em termos de seus TAGs pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa, mas a identificação de picos cromatográficos requer muito conhecimento e informações sobre padrões puros, que muitas vezes não são disponíveis, levando a uma incerteza relativamente alta nessas análises (BESSA et al., 2015; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

Devido à dificuldade em realizar a análise do TAG, o provável perfil de TAG do óleo de babaçu foi determinado utilizando o algoritmo estatístico sugerido por Antoniosi Filho, Mendes e Lanças (1995). Para cálculo de probabilidade, MATLAB R2013a Inc. foi utilizado para determinar a composição dos TAGs.

A extração das amostras foi baseada na metodologia proposta por Mazalli et al. (2003) e Ortíz et al. (2006) com as seguintes etapas: saponificação a frio com 20 mL de solução de KOH a 15% (Exodo Científica, Hortolândia, BR) em etanol (Panreac, Barcelona, ES) por 12 horas; seguida pela adição de 10 mL de solução saturada de NaCl (Exodo Científica, Hortolândia, BR) e duas extrações com 5 mL de n-hexano (Panreac, Barcelona, ES) sob agitação, utilizando *vortex* por 5 minutos.

A quantificação do β -sitosterol foi baseada na metodologia de Mazalli et al. (2003), utilizando um cromatógrafo líquido (SHIMADZU, Kyoto, JP) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), com absorvância de 208 nm. A coluna analítica utilizada foi de C18 de 100 x 4,6 mm x 4 m (Chromolith, Merck, Darmstadt, GE), temperatura 40 °C, fase móvel de

acetonitrila:isopropanol (85:15) (Panreac, Barcelona, ES); fluxo 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

A identificação do β -sitosterol foi realizada comparando o tempo de retenção de cada amostra com o padrão e quantificação através de áreas de pico correspondentes por padronização externa em que o padrão puro de β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi diluído em etanol concentrações de 20 a 100 µg/mL.

I-2.7 Análise Estatística

Como as condições operacionais de extração de alguns extratos são definidas de acordo com um DCCR, as respostas são apresentadas por análise de resposta de superfície (ASR) com suas respectivas análises de variância (ANOVA), análise dos principais efeitos das variáveis controladas no processo, e modelos preditivos de primeira e segunda ordem. Todos os tratamentos estatísticos foram realizados usando o software Statistic 12.1 (Tibco, software, Califórnia, EUA).

I-3 Resultados e Discussão

I-3.1 Caracterização da matéria prima

A composição centesimal de 100 g de amêndoa de babaçu (*Orbignya phalerata*) seca foi a seguinte: teor de umidade de 4,37 g/100g, teor de cinzas de 1,34 ($\pm 0,01$) g/100g, fibras de 23,47 ($\pm 0,43$) g/100g, lipídios de 62,14 ($\pm 0,41$) g/100g, proteínas de 8,26 ($\pm 0,26$) g/100g e 0,42 ($\pm 0,41$) g/100g de carboidratos. As amêndoas de babaçu, assim como outras amêndoas oleaginosas, possuem lipídios como fração predominante (62,14%) em relação aos demais componentes. Também é observado que esta semente é fibrosa.

O diâmetro médio das partículas das amêndoas de babaçu teve uma média de 1,1 mm, calculado pela equação (1). O diâmetro das partículas é relevante para a avaliação da resistência interna de transferência de massa. A fim de aumentar o rendimento global da extração, a redução do diâmetro médio das partículas é favorável, uma vez que proporciona o aumento na área da superfície de contato com o solvente. Isto diminui a distância que o soluto percorre dentro da partícula porosa até a superfície (OLIVEIRA et al., 2010).

I-3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) também foi utilizada para caracterizar a

amêndoa de babaçu antes e após a extração com PLE. A Figura 1A ilustra uma estrutura semelhante à organização vegetal das células, bem como entre cada cluster. É possível observar gotículas de óleo aglomeradas na parede da estrutura; no entanto, não é possível observar claramente a presença de minerais.

Figura 1 - (A) Micrografias eletrônicas de varredura da matéria-prima amêndoa de babaçu, (B) PLE 4 pós-extração (St 9 min, volume de solvente de 94% $\cong$ 31,96 mL, etanol absoluto, 60 °C, teste 4), e (C) PLE 5 (St 2 min, volume de solvente de 80% $\cong$ 27,3 mL, álcool isopropílico, 60, teste 5), (D) EDS

Fonte: Própria autoria, 2018.

As Figuras 1B e 1C mostram a morfologia das partículas após a extração, na qual modificações estruturais são observadas, em comparação com a Figura 1A. As manchas brancas na Figura 1B são minerais impregnados na estrutura das amêndoas de babaçu. Esses minerais, de acordo com a análise qualitativa por meio da Espectrometria de Raios X por Energia Dispersiva (EDS), indicaram a presença de cálcio, sódio, potássio, manganês, fósforo e zinco (Figura 1D). A presença de íons Ca, Mg, Al e K, detectada por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) (Figura 1D), foi consolidada pela análise do perfil mineral e quantificada por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Isto permitiu a quantificação dos minerais na matéria-prima. Assim, foi possível concluir que ambos os solventes não foram eficientes na extração de minerais do óleo de amêndoas de babaçu.

O solvente alterou a morfologia da estrutura da amêndoa, conforme observado na Figura 1C. Há também a formação de espaços vazios, bem como modificações estruturais nas circunferências, onde as moléculas de óleo removidas pelo solvente foram provavelmente impregnadas durante o processo de extração.

I-3.3 Perfil Mineral

O teor do mineral no óleo de amêndoa de babaçu extraído via PLE foi realizado por meio de análise quantitativa. Estes foram quantificados em mg/100g de amostra. Os principais minerais encontrados foram fósforo, potássio, sódio e zinco. Não há dados sobre o perfil mineral da amêndoa de babaçu na literatura. Assim, a avaliação completa do perfil mineral desta matéria-prima pré e pós-extração, além dos minerais que estão presentes no óleo de amêndoas, descritos neste estudo, também contribuirão para a caracterização tanto da matéria-prima quanto do produto, além de elucidar a influência do processo para ambos os materiais finais.

Na análise quantitativa dos minerais presentes na amêndoa e no óleo de babaçu, foi possível observar altas concentrações de potássio e cálcio de 300 mg/100g. Os minerais minoritários observados foram o zinco, 2,85 mg/100g e manganês, 2,75 mg/100g. A presença de minerais no óleo extraído via PLE foi analisada no extrato que apresentou maiores rendimentos (teste 4 com etanol e teste 5 com isopropanol, Tabela 1). O objetivo desta análise foi identificar quais minerais permaneceram no óleo de amêndoa de babaçu após a PLE. O perfil mineral do óleo extraído mostrou que, independentemente do solvente (álcool etílico ou isopropílico), os principais minerais da amêndoa não foram extraídos com o óleo, exceto para Zn, P e K.

Os minerais são essenciais para o funcionamento correto do corpo humano; portanto, os valores de referência para sua ingestão são estabelecidos e revisados periodicamente a partir de novas descobertas. De acordo com esses parâmetros, os valores diários para adultos (homens e mulheres, com idades entre 19 e 70 anos) dos minerais avaliados são: Mn de 1,8 a 2,3 mg/dia; Zn de 8 a 11 mg/dia; Cu 0,9 mg/dia; Fe de 8 a 18 mg/dia; Mg de 310 a 400 g/dia; Na de 1300 a 1500 mg/dia; e P a 700 mg/dia (BERTO et al., 2015). A partir desses parâmetros, pode-se inferir que tanto os consumos da amêndoa quanto do óleo de babaçu podem produzir efeitos benéficos, e essa matéria-prima pode ser considerada uma rica fonte de suplementação mineral.

Vale ressaltar que o incentivo ao consumo de amêndoas brasileiras de baixo custo, como as amêndoas de babaçu enriquecidas com minerais como Fe, Mn, Zn, Na, P e K, pode se tornar uma alternativa viável para a redução da desnutrição e desperdício de alto valor nutricional no nordeste do Brasil (BERTO et al., 2015).

Tabela 1 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com as variáveis reais e codificadas e sua influência na extração do óleo de amêndoa de babaçu com álcool isopropílico e álcool etílico pressurizados

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Rendimento (%)	β-sitosterol mg/100g de óleo	Rendimento (%)	β-sitosterol mg/100g de óleo
	St	SV	St (min)	SV (%)	Álcool isopropílico	Álcool isopropílico	Álcool etílico	Álcool etílico
1	-1	-1	3	66	44,28	25,94	49,81	21,56
2	1	-1	9	66	49,17	14,95	52,17	10,22
3	-1	1	3	94	52,19	24,50	47,33	22,46
4	1	1	9	94	54,63	18,35	53,12	17,55
5*	0	0	6	80	47,04	17,64	52,21	13,13
6*	0	0	6	80	49,13	13,21	51,52	14,51
7*	0	0	6	80	48,66	17,21	52,34	7,04
8	-1,41	0	2	80	51,02	14,80	47,13	22,09
9	1,41	0	10	80	47,70	17,74	52,95	17,52
10	0	-1,41	6	60	41,67	19,77	50,65	4,76
11	0	1,41	6	100	55,34	15,75	51,16	15,07

* Pontos centrais do DCCR.

Fonte: Própria autoria, 2018.

I-3.4 Rendimento de óleo das amêndoas de babaçu obtido via PLE com isopropanol e etanol

As extrações com álcool isopropílico pressurizado resultaram em altos rendimentos, variando de 41,67 a 55,34%. O maior rendimento (55,34%) ocorreu quando a condição de 6 min foi usada como St e 100% do volume do extrator foi completado com álcool isopropílico (Tabela 1).

Figura 2 - Diagrama de Pareto mostrando os efeitos do tempo estático (St) e volume de solvente (SV) no rendimento do extrato de semente de babaçu obtido por PLE com etanol absoluto (A) e álcool isopropílico (B)

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na análise dos principais efeitos das variáveis estudadas no processo (tempo estático - St e volume de solvente - SV) para produção de óleo, verificou-se que o volume de solvente (SV) teve influência positiva significativa no rendimento da PLE, que pode ser visto no Diagrama de Pareto (Figura 2A). A variável St e a interação entre St × SV não apresentaram influência significativa (Figura 2A).

Ao analisar os coeficientes estimados que compõem o modelo de primeira ordem, fica claro que apenas o SV teve influência significativa (*) na resposta de rendimento (Eq. 3).

$$Y = 49.3000^* + 1.8325St + 3.3425SV^* - 0.6125St \times SV \quad (3)$$

Por meio do teste F, o modelo linear, embora constituído por coeficientes significativos, não foi capaz de prever o rendimento do óleo de amêndoa de babaçu extraído com álcool isopropílico. Como o $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o F_{tabelado} , o modelo

apresenta um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,88$) que não é muito preditivo (informação adicional).

Na análise de variância dos coeficientes que compõem o modelo quadrático, pode-se verificar que o coeficiente de regressão do modelo quadrático ou de segunda ordem também não foi significativo, pois apresentou valores quase iguais de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} (informações adicionais). Embora o $F_{\text{calculado}}$ tenha apresentado um valor um pouco maior, o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,83$) também indica a baixa capacidade preditiva do modelo (Eq. 4).

$$Y = 48.27218^* + 0.33209St + 0.83161St + 4.09276SV^* + 0.40156SV - 0.61250St \times SV^* \quad (4)$$

Considerando o baixo ajuste de ambos os modelos aos pontos experimentais e, conseqüentemente, a geração de modelos não preditivos, não foi possível avaliar o comportamento das variáveis do processo no rendimento do óleo obtido com álcool isopropílico pressurizado através de análises de resposta superficial (ARS). No entanto, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que os maiores rendimentos foram obtidos quando maiores volumes de solvente foram utilizados, exceto para o teste 2.

Quando o etanol foi usado como solvente pressurizado, o rendimento variou de 47,13 a 53,12%. A melhor condição de extração ocorreu no ensaio 4, quando 9 min foi utilizado para St e 94% do volume foi preenchido com o solvente (Tabela 1).

Na análise estatística dos principais efeitos, o tempo estático (St) apresentou influência positiva no rendimento de extração do óleo das amêndoas de babaçu. No entanto, tanto a variável SV como a interação St $\times$ SV não influenciaram no rendimento da extração do óleo. O efeito dessas variáveis do processo no rendimento de extração pode ser verificado no diagrama de Pareto (Figura 2B) mostrando o limite da linha de significância em 95%.

O fato de o volume de etanol não influenciar no rendimento da extração é uma vantagem do processo que mais uma vez apresenta resultados indicando que baixas concentrações de solventes podem gerar óleos com alto rendimento. A economia de solvente nos processos de extração sólido-líquido reflete o valor do produto final.

Na análise de variância (ANOVA), confirma-se que pelo menos uma das variáveis foi significativa, coincidindo com a indicada no diagrama de Pareto. No modelo linear, o coeficiente significativo foi relacionado ao tempo estático (St) (Eq. 5). No entanto, o modelo de primeira ordem apresentou um baixo coeficiente de determinação (R^2) de 0,84. Também, por meio do teste F, verificou-se que o modelo linear para a produção de óleos extraídos

pela PLE a partir da amêndoa de babaçu extraída com etanol não foi preditivo, já que o valor do $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o F_{tabelado} (informação adicional).

$$Y = 51.2143^* + 4.0750St^* - 0.7650SV + 1.7150St \times SV \quad (5)$$

Pela análise estatística dos coeficientes que compõem o modelo quadrático analisado pela ANOVA, verifica-se que o modelo quadrático ou de segunda ordem foi significativo para as duas variáveis, para os coeficientes de St, e para a interação de St x SV (Eq. 6). A influência positiva do St mostra que valores mais altos promovem melhores rendimentos de óleos de amêndoa de babaçu obtidos via PLE na extração com álcool etílico. O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,97$) ajustado para o modelo quadrático (Eq. 6) sugere que este modelo possui uma boa capacidade preditiva dos dados experimentais para o rendimento de óleo de amêndoa de babaçu, já que o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} .

$$Y = 52.0223^* + 2.0506St^* - 0.9610St^{2*} - 0.1016SV^* - 0.5260SV^2 + 0.8575St \times SV^* \quad (6)$$

A análise da superfície de resposta (ASR) gerada pelo modelo de segunda ordem (Figura 3) mostra que na faixa estudada para ambas as variáveis, a região otimizada é a que apresenta os maiores valores de St para toda a faixa de SV, apresentando um pico quando maiores volumes de solventes foram utilizados. O fato de que o volume de solvente não influenciou o rendimento nesta faixa de valores estudados constitui uma forte indicação de que bons rendimentos podem ser obtidos para baixas quantidades de solventes empregadas nesta extração líquida pressurizada. O uso da temperatura fixa a 60 °C foi uma alternativa, considerada para substâncias termossensíveis como compostos bioativos a serem preservados. Assim, a extração por PLE pode ter vantagens quando comparada aos métodos tradicionais, nos quais altas temperaturas e grandes quantidades de solventes são frequentemente utilizadas.

Figura 3 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que indica a influência das variáveis de processo (St e SV) sobre o rendimento de extratos de óleo de babaçu obtidos por PLE com etanol absoluto

Fonte: Própria autoria, 2018.

O comportamento das variáveis do processo de extração em relação ao rendimento do óleo depende do tipo de solvente utilizado, havendo necessidade de otimização do processo dependendo do solvente a ser utilizado. Embora ambos os solventes fossem álcoois e usassem os mesmos valores de faixa variável, o tempo de contato entre o solvente e a matriz em cada ciclo (St) foi significativo quando o etanol era o solvente pressurizado. No entanto, este resultado não permitiu a análise da superfície de resposta, uma vez que os modelos gerados (linear e quadrático) não foram preditivos. No entanto, quando se empregou álcool isopropílico, a variável que influenciou positivamente o processo foi o volume de solvente (SV) e, apesar de St não ser uma variável significativa, também foram obtidos maiores rendimentos para maiores valores de St (Figura 3).

I-3.5 Identificação e quantificação do perfil de ácidos graxos e composição de triacilgliceróis (TAGs) e quantificação de β -sitosterol

O perfil de ácidos graxos do óleo de amêndoa de babaçu extraído por PLE em lote com álcool isopropílico como solvente mostrou a presença de ácidos graxos, como ácido láurico (C12:0, de 32,9% a 38,9%), ácido mirístico (C14:0, de 17,4% a 20,5%) e ácido oleico

(C18:1, de 18,3 a 21,4%), semelhantes aos encontrados por Solis, Alejos e Kyros (2016) em óleo de amêndoa comercial: C12:0 (44%), C14:0 (15,4%) e C18:1 (16,1%) (Tabela 2).

O óleo apresentou maiores porcentagens de ácidos graxos saturados (AGS), variando de 75,7 a 78,9% quando o isopropanol foi utilizado como solvente. Também apresentou ácidos graxos monoinsaturados (AGM) que variaram de 18,3 a 21,4% e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) de 2,3 a 3,2%. Estes ácidos graxos poli-insaturados apresentam efeito biológico no metabolismo dos hormônios (DOS SANTOS FREITAS et al., 2013).

Os testes de 1 a 6, cujos extratos foram obtidos com isopropanol, não apresentaram ácido graxo caprílico (C8:0) e nenhuma relação pode ser atribuída às diferentes condições do processo (St ou SV) (Tabela 2). Em geral, a porcentagem de ácidos graxos não se alterou consideravelmente entre os testes, e a proporção de ácidos graxos na concentração mais alta para todos os testes foi mantida. Os ácidos graxos em maiores concentrações foram o ácido láurico (C12:0), seguido pelos ácidos mirístico (C14:0), oleico (C18:1) e palmítico (C16:0). Além disso, Soares et al. (2007) descobriram os mesmos principais ácidos graxos no óleo comercial de amêndoa de babaçu.

O perfil de ácidos graxos do óleo de babaçu extraído com etanol pressurizado como solvente apresentou o mesmo comportamento dos extratos obtidos quando se utilizou isopropanol pressurizado. Os ácidos graxos encontrados em concentrações mais altas foram o ácido láurico (C12:0), seguido pelo mirístico (C14:0), oleico (C18:1) e ácido palmítico (C16:0) (Tabela 2). Neste extrato, o ácido caprílico (C8:0) não foi detectado unicamente no teste 8 (Tabela 2). Os resultados mostraram um conteúdo de C12:0 (ácido láurico) de 33,8% a 35,2%, C14:0 (ácido mirístico) de 18% a 19,7% e C18:1 (ácido oleico) de 17,6% a 20,4%.

Os ácidos graxos saturados (AGS) estavam presentes de 76,4 a 79,9% quando o etanol foi o solvente pressurizado utilizado. A composição de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) variou de 17,6 a 20,4%, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) variaram de 2,5 a 3,4% (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfil de ácido graxos (PAG) (em %) do óleo obtido a partir da amêndoa de babaçu usando PLE

AG	1	2	3	4	5*	6*	7*	8	9	10	11	M* ($\pm \sigma$)
Álcool isopropílico												
C8:0	-	-	-	-	-	-	2,6	4,0	1,4	1,8	4,3	-
C10:0	1,4	1,0	3,9	3,6	3,4	4,3	5,5	5,8	5,4	5,3	6,2	4,40 $\pm$ 1,05
C12:0	36,3	35,5	35,0	35,4	36,9	38,9	34,9	34,1	36,1	35,3	32,9	36,90 $\pm$ 2,00
C14:0	20,5	20,4	19,3	19,1	19,5	19,0	18,3	17,7	18,7	18,5	17,4	18,93 $\pm$ 0,60
C16:0	12,8	13,0	12,6	12,1	12,2	11,4	11,8	11,5	11,7	11,8	11,5	11,80 $\pm$ 0,40
C18:0	5,6	5,8	6,0	5,6	5,4	4,8	5,6	5,5	5,5	5,6	5,8	5,20 $\pm$ 0,57
C18:1	20,7	21,4	20,0	19,6	19,9	19,2	18,5	18,5	18,3	18,7	18,3	19,20 $\pm$ 0,70
C18:2	2,7	3,0	3,2	2,9	2,7	2,3	2,8	3,0	2,8	3,0	3,5	2,30 $\pm$ 0,26
SFA	76,5	75,7	76,8	77,4	77,3	78,5	78,7	78,6	78,9	78,3	78,3	78,17 $\pm$ 0,76
AGM	20,7	21,4	20,0	19,8	19,9	19,2	18,5	18,5	18,3	18,7	18,6	19,20 $\pm$ 0,70
AGPI	2,7	3,0	3,2	2,9	2,7	2,3	2,8	3,0	2,8	3,0	3,5	2,60 $\pm$ 0,26
Álcool etílico												
FA*	1	2	3	4	5*	6*	7*	8	9	10	11	M* ($\pm \sigma$)
C8:0	3,5	4,5	1,6	2,4	0,7	1,2	1,0	-	0,8	1,6	2,9	0,97 $\pm$ 0,25
C10:0	6,0	6,0	5,3	5,3	5,1	5,2	5,0	2,7	4,8	4,9	5,4	5,10 $\pm$ 0,10
C12:0	33,8	34,6	34,1	36,2	34,6	34,4	34,3	35,2	34,5	35,7	34,6	34,43 $\pm$ 0,15
C 14:0	18,1	18,0	18,7	18,5	18,9	18,9	18,8	19,7	18,5	18,8	18,5	18,87 $\pm$ 0,06
C 16:0	11,9	11,4	12,3	11,6	12,5	12,4	12,4	12,8	12,3	12,0	12,0	12,43 $\pm$ 0,06
C 18:0	5,8	5,4	6,0	5,3	6,1	6,1	6,0	6,0	5,9	5,6	5,4	6,07 $\pm$ 0,06
C 18:1	18,1	17,6	18,7	18,1	19,2	18,9	19,4	20,4	19,9	18,6	18,4	19,17 $\pm$ 0,25
C 18:2	2,8	2,5	3,4	2,5	3,0	3,1	3,0	2,7	3,2	2,7	2,8	3,03 $\pm$ 0,06
SFA	79,1	79,9	78,0	79,4	77,8	78,0	77,6	76,4	76,8	78,7	78,8	77,80 $\pm$ 0,20
AGM	18,1	17,6	18,7	18,1	19,2	18,9	19,4	20,4	19,9	18,6	18,4	19,17 $\pm$ 0,25
AGPI	2,8	2,5	3,4	2,5	3,0	3,1	3,0	2,7	3,2	2,7	2,8	2,03 $\pm$ 0,06

M*= média dos pontos centrais

Fonte: Própria autoria, 2018.

Com base na composição de ácidos graxos do óleo de babaçu obtido com solventes verdes alternativos, os triacilgliceróis (TAGs) foram determinados (Tabela 3).

A metodologia estatística usada neste experimento resulta em um grande número de TAGs. Para reduzir essa transição, os TAGs foram classificados pelos seguintes aspectos: todos os isômeros estruturais foram adicionados em um conjunto de componentes com x carbonos e y duplas ligações e nomeados de acordo com o TAG principal neste conjunto de isômeros. Além disso, grupos com uma composição total de TAG inferior a 0,5% não foram considerados (GONÇALVES; MEIRELLES, 2004; HIRATA et al., 2013; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

Os TAGs em maior proporção em ambos os extratos obtidos com etanol pressurizado e propanol, em ordem decrescente, foram COL (ácido cáprico, oleico e láurico) com aproximadamente 9% de massa, LOL (ácido láurico, oleico e láurico) com aproximadamente 24% em massa, LOM (ácido láurico, oleico e mirístico) com aproximadamente 24% em massa, LOP (ácido láurico, oleico e palmítico) com 16% e MOP (ácido mirístico, oleico e palmítico) com 10% (Tabela 3).

A quantificação de β -sitosterol em óleo de amêndoa de babaçu foi realizada a partir do óleo via PLE em função das variáveis de processo estudadas (St e SV). As concentrações de β -sitosterol variaram de 13,21 a 25,94 g/100g para álcool isopropílico e para álcool etílico a concentração de β -sitosterol variou de 10,22 a 22,46 g/100g de óleo (Tabela 1).

Tabela 3 - Composição estimada dos principais TAGs presentes no óleo de babaçu extraído com álcool isopropílico (teste 11) e álcool etílico (teste 4)

Grupos	Álcool isopropílico		Álcool etílico	
(x:y)	TAGs	Massa (%)	TAGs	Massa (%)
C36:1	CpOC	1,09	CpOC	0,55
C38:1	CpOL	5,88	CpOL	3,91
C40:1	COL	9,03	COL	8,09
C42:1	LOL	20,22	LOL	23,84
C44:1	LOM	17,59	LOM	20,68
C46:1	LOP	13,62	LOP	15,79
C48:1	MOP	8,67	MOP	9,56
C50:1	MOS	3,39	MOS	3,56
C52:1	POS	1,25	POS	1,23
C38:3	CpLnL	1,13	CpLnL	0,54
C40:3	CLnL	1,74	CLnL	1,13
C42:3	LLnL	3,90	LLnL	3,32
C44:3	LLnM	3,39	LLnM	2,88
C46:3	LLnP	2,63	LLnP	2,20
C48:3	MLnP	1,67	MLnP	1,33
C50:3	MLnS	0,65	-	-
C54:3	OOO	2,64	OOO	3,22
C54:5	OOLn	1,50	OOLn	1,33

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 4 - Diagrama de Pareto mostrando os efeitos do tempo estático (St) e volume de solvente (SV) na concentração de β -sitosterol no óleo de amêndoas de babaçu obtido via PLE com isopropanol

Fonte: Própria autoria, 2018.

A análise dos efeitos principais (St e SV) e a interação entre eles (St x SV) indicam que nenhuma das variáveis influenciou as concentrações de β -sitosterol obtidas via PLE com álcool isopropílico como solvente (Fig. 4) como mostra nos diagramas de Pareto, com nível de confiança de 95%.

Figura 5 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de segunda ordem que indica a influência das variáveis de processo (St e SV) sobre a concentração de β -sitosterol no óleo de amêndoas de babaçu obtido via PLE com isopropanol

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na análise estatística dos coeficientes que compõem o modelo quadrático analisado pela ANOVA, verifica-se que o modelo quadrático ou de segunda ordem foi significativo para a variável St, mas não para os coeficientes de SV, e nem para a interação de St x SV (Eq. 7). A influência positiva do St indica que valores mais altos promovem melhores concentrações de β -sitosterol obtido via PLE na extração com álcool etílico. O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,90$) ajustado para o modelo quadrático (Eq. 7) sugere que este modelo possui uma boa capacidade preditiva dos dados experimentais para as concentrações de β -sitosterol obtidas, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} (informação adicional).

$$Y = 13.46532^* - 2.84518St^* + 3.48566St^{2*} + 1.51972SV^* + 0.40986 + 1,60750St \times SV^* \quad (7)$$

Obtidas via PLE com álcool etílico como solvente, as concentrações de β -sitosterol na análise de superfície de resposta (ASR) foram geradas pelo modelo de segunda ordem. Como mostra a Figura 5 na faixa estudada para a variável St, a região otimizada é aquela com os maiores valores St, apresentando um pico quando se utilizaram tais valores maiores.

Embora não tenha sido possível gerar modelos preditivos quando o álcool isopropílico foi usado como solvente, a maior concentração de β -sitosterol foi obtida na condição 1 (3 min e 66% SV) (Tabela 1). A maior concentração de β -sitosterol para álcool etílico como solvente foi obtida na condição 8 (2 min e 80% SV) (Tabela 1). Existem dados na literatura que mostram que a concentração de β -sitosterol no óleo de Amêndoas de babaçu varia de 48,2 a 53,9 mg/kg (CODEX, 2008) e 380 mg/kg (BEZERRA; ANTONIOSI FILHO, 2014).

I-4 Conclusões

Amêndoas de babaçu apresentam 59,89 g/100g de lipídios nas sementes. Este valor foi determinado quando a percolação com éter de petróleo foi empregada via Soxhlet. Utilizando isopropanol pressurizado e extração com etanol, solventes verdes com polaridades muito diferentes, os maiores rendimentos foram obtidos respectivamente em 55,34 g/100g e 53,12 g/100g. Esses resultados são promissores quando usados com o hexano, o solvente convencional utilizado na extração do óleo, uma vez que esse teor de lipídios representa 92,4 e 88,7% do óleo nas sementes, respectivamente.

Na extração líquida pressurizada (PLE) do óleo das amêndoas de babaçu, duas variáveis do processo foram estudadas, o tempo de contato entre a matriz e o solvente em cada lote (St) e o volume de solvente na extração (SV). A influência destas variáveis no rendimento do extrato foi avaliada por meio de um DCCR e, nas principais análises de efeitos do St, SV e de sua interação (St x SV) no rendimento do óleo de babaçu utilizando

etanol como solvente. Foi possível concluir que a variável St exerceu influência positiva sobre este parâmetro avaliado. No entanto, nenhum modelo preditivo para análise de superfície de resposta (ASR) pôde ser gerado.

Quando o volume de solvente não é um fator significativo no processo de extração com solvente pressurizado, isso pode ser considerado como um fator econômico importante, pois podem ser empregadas quantidades menores de solvente e, mesmo assim, bons rendimentos podem ser alcançados. Esta é uma grande vantagem quando se utiliza solvente pressurizado no processo de extração.

No entanto, quando se utilizou isopropanol pressurizado, o volume de solvente (SV) influenciou na PLE e houve diferença significativa no rendimento do óleo das sementes de babaçu. Especificamente neste caso, foi possível gerar uma superfície de resposta e detectar estatisticamente que maiores quantidades de solventes para tempos de contato (St) em torno de 3 min geram os maiores rendimentos.

Este diferente comportamento depende da polaridade do solvente empregado, de modo que a otimização dos processos de extração se torna importante na investigação de novos processos que visam empregar métodos alternativos e solventes para ter produtos de qualidade.

O perfil de ácidos graxos do óleo de babaçu foi igual, independentemente do solvente, método ou condições utilizadas na extração. Independentemente do solvente, o óleo era rico em ácidos graxos essenciais. Os ácidos graxos em maior concentração foram ácidos láurico, mirístico, oleico e palmítico, que apresentam efeitos clínicos no tratamento de úlceras (lesões comuns em idosos) e queimaduras. Em função da composição de ácidos graxos, os principais triacilgliceróis presentes neste óleo foram COL, LOL, LOM, LOP e MOP.

I- Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processos nº 2016/13460-8 e nº 2015/04729-0 - pela bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processo nº 306317/2016-8.

I- Referências

ALBIERO, D. et al. Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) para a agricultura familiar. **Acta Amazônica**, Manaus, p. 337-346, 2007.

ANTONIOSI FILHO, N. R.; MENDES, O. L.; LANÇAS, F. M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 40, p. 557-562, 1995.

AOAC. **Method 991.39**. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2005.

_____. **Method 996.06**. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2005.

ASAE. Method of determining and expressing fineness of feed. materials by sieving. S319.4 **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. Saint Joseph, Michigan, 2008.

ASSOCIAÇÃO REGIONAL DE MULHERES TRABALHADORAS RURAIS BICO DO PAPAGAIO (**ASMUBIP**), [2017?]. Disponível em: <<http://www.asmubip.org.br/babacu/oleo-e-azeite-tradicional/>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

BERTO, A. et al. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. **Food Research International**, Kidlington, v. 77, p. 441-449, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.018>.

BESSA, L. C. et al. (Liquid+ liquid) equilibrium of systems involved in the stepwise ethanolysis of vegetable oils. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, London, v. 89, p. 148-158, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2015.04.036>.

BEZERRA, K. S.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Characterization and quantification by gas chromatography of free steroids in unsaponifiable matter of vegetable oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, p. 238-245, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130288>.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments**: An introduction to designs, data analysis and model building. New York: Wiley, 1978.

CASTRO-PUYANA, M. et al. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 13, p. 4607-4616, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6687-y>.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex-Stan 210**: codex standard for named vegetable oils. Rome, 2008.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 3, n. 4. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2016.

CORNELIO-SANTIAGO, H. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 128, p. 386-394, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.030>.

DE OLIVEIRA LIMA, J. R. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

DE OLIVEIRA, P. M. A. et al. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction—Characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 95, p. 137-145, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.08.016>.

DOS SANTOS FREITAS, L. et al. Effect of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of Brazilian grape seed oil. **Separation and Purification Technology**, Kidlington, v. 116, p. 313-318, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.06.002>.

GONÇALVES, C. B.; MEIRELLES, A. J. Liquid–liquid equilibrium data for the system palm oil+ fatty acids+ ethanol+ water at 318.2 K. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v. 221, n. 1-2, p. 139-150, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2004.05.002>.

HIRATA, G. F. et al. Liquid–liquid equilibrium of fatty systems: A new approach for adjusting UNIFAC interaction parameters. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v. 360, p. 379-391, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.10.004>.

KAMAL-ELDIN, A.; MOAZZAMI, A. Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, Sharjah, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2009.

LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Morphological, thermal and mechanical properties of ramie crystallites–reinforced plasticized starch biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 63, n. 2, p. 198-204, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.027>.

MAZALLI, M. R.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 1, p. 49-54, 2003.

NAOZUKA, J. et al. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 1667-1672, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.051>.

OLIVEIRA, A. L. et al. Modelling of high-pressure phase equilibrium in systems of interest in the food engineering field using the Peng-Robinson equation of state with two different mixing rules. **Journal of Food Process Engineering**, Hoboken, v. 33, n. s1, p. 101-116, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00310.x>.

ORTÍZ, C. M. L.; MOYA, M. S. P.; NAVARRO, V. B. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 19, n. 2-3, p. 141-149, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SANTOS, D. T., VEGGI, P. C., MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, London, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022>.

SOARES, B. M. C. et al. Solubility of triacylglycerols in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 25-31, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.03.013>.

SOLIS, J. L.; ALEJO, L.; KIROS, Y. Calcium and tin oxides for heterogeneous transesterification of Babassu oil (*Attalea speciosa*). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Amsterdam, v. 4, n. 4, p. 4870-4877, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.04.006>.

VINHAL, J. O.; LIMA, C. F.; BARBOSA, L. C. Analytical pyrolysis of the kernel and oil of babassu palm (*Orbignya phalerata*). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 107, p. 73-81, 2014. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.02.005>.

ZENEBON, O.; PASCUET, S.N.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2018.

CAPÍTULO II: Propriedades físicas e composição do óleo das amêndoas de babaçu (*Orbignya phalerata*) obtido via extração com CO₂ supercrítico

Naila Albertina de Oliveira^a, Mônica Roberta Mazzali^a, Heidge Fukumasu^b, Cintia Bernardo Gonçalves^a, Alessandra Lopes de Oliveira^{a*}

^aLTAPPN, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ^bFaculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: alelopes@usp.br. Telefone: +55 1935654268.

II- Resumo

O óleo de amêndoas de babaçu é rico em fitoesteróis, dentre os quais o β -sitosterol, e sua extração com fluido supercrítico (SFE) é considerada segura para a saúde humana. A meta deste trabalho foi analisar as propriedades físicas e a composição de tal óleo extraído via SFE em diferentes condições, a saber: temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C e pressões de 25 e 35 MPa. O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) e a composição de triacilgliceróis (TAGs) foi estimada a partir desses resultados. Os maiores rendimentos do óleo de babaçu, 86,56% e 89,86%, foram obtidos respectivamente nas condições de 70 °C e 25 MPa e 80 °C e 35 MPa. O rendimento de óleo aumentou à medida que a temperatura aumentou, com exceção das condições de 80 °C e 25 MPa e 50 °C e 35 MPa. Sob condições de 25 MPa e 40 °C, houve a maior concentração de β -sitosterol, 27,43 mg/100g de óleo. As condições de extração não influenciaram a composição dos ácidos graxos no óleo e, conseqüentemente, nos TAGs. O perfil de TAGs mostrou variações entre os números de carbono (C38 a C54). Com relação a parâmetros físicos, o óleo de babaçu apresentou densidade de 0,9021 a 0,9171 g/mL, viscosidade dinâmica de 28,2786 a 52,2843 Pa·s e índice de refração de 1,4520 a 1,4563. Estes valores são comparáveis aos óleos vegetais refinados. De acordo com a composição dos ácidos graxos, os principais triacilgliceróis presentes nesse óleo foram LOL, LOM, LOP e MOP. Tal caracterização do óleo de amêndoas de babaçu é de suma importância para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de feridas cutâneas tais como úlceras de pressão.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Sitosterol. Propriedades físicas. Triacilgliceróis.

II-1 Introdução

O babaçu (*Orbignya phalerata*) é uma palmeira nativa da região Norte e Nordeste do Brasil. O principal produto do babaçu é um coco pequeno, e cada palmeira pode gerar em média de 15 a 25 cocos. O óleo de babaçu é extraído das amêndoas e tem uma cor amarela clara quando extraído por cozimento – o principal método tradicional de extração. Este óleo contém um alto nível de ácidos graxos saturados de cadeia curta, sendo o ácido láurico o mais abundante (40 a 55%). Este óleo contém maior concentração de ácidos graxos insaturados (10 a 26%) em comparação ao óleo de coco (6 a 12%), um importante agente de textura na indústria alimentar (REIPERT; RODRIGUES; MEIRELLES, 2011).

O óleo de sementes de babaçu é rico em fitoesteróis, dentre eles o β -sitosterol. A concentração de β -sitosterol no óleo de babaçu de acordo com a Comissão do *Codex Alimentarius* (2008) é de aproximadamente 48,2 a 53,9 mg/kg e de acordo com Bezerra e Antonioisi Filho (2014), a concentração de β -sitosterol no óleo é de 380 mg/kg. Os fitoesteróis e os fitoestanois (fitoesteróis saturados) também desempenham um papel importante no corpo humano. Eles influenciam a absorção do colesterol, pois reduzem sua concentração no nível plasmático, sendo um composto importante no controle da hipercolesterolemia (KAMAL-ELDIN; MOAZZAMI, 2009).

Óleos vegetais são extraídos de sementes oleaginosas, farelos, nozes ou polpas de frutas, principalmente utilizando solventes derivados do petróleo, como o hexano (CERIANI et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 1996). A extração convencional com solventes orgânicos é amplamente utilizada para obter extratos de fontes vegetais, mas apresenta desvantagens como baixa seletividade, altos custos de energia e possível perda de compostos durante a remoção do solvente. A alta seletividade devido às condições de operação do processo e a vantagem de usar temperaturas amenas tornam a extração com fluido supercrítico (SFE) muito atraente para obter extratos de produtos naturais (MALAMAN et al., 2011).

O processo de extração por fluido supercrítico (SFE) é um processo de separação baseado no contato de uma matriz sólida, que contém compostos extraíveis, com um solvente em condições supercríticas. A SFE é considerada uma tecnologia verde que gera extratos livres de resíduos de solventes orgânicos e, portanto, segura para a saúde humana. Esta técnica tem sido utilizada para obter extratos de muitos produtos naturais para aplicação nas áreas farmacêutica e alimentícia, por isso é uma tecnologia promissora para a obtenção de novos produtos (DEL VALLE; URREGO, 2012; OLIVEIRA; KAMIMURA; RABI, 2009; POVILAITIS; VENSKUTONIS, 2015).

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que possui propriedades de pressão, volume e temperatura (P-V-T) acima de seus valores críticos. Enquanto que, abaixo do ponto crítico, uma substância pode existir como um sólido, líquido ou vapor. Na

região supercrítica, as variações das propriedades termodinâmicas podem ser intensas, causando diferentes efeitos no solvente e nos solutos (BRUNNER, 2005; SANDLER, 1989). Fluidos supercríticos exibem propriedades físico-químicas intermediárias entre as de um gás e um líquido, o que aumenta sua função como solvente. Sua densidade relativamente alta confere poder de solvência, enquanto sua viscosidade relativamente baixa e alta difusividade promovem um apreciável poder de penetração na matriz de soluto (RIERA et al., 2004; RIZVI et al., 1986).

A eficiência de extração via SFE se deve às seguintes considerações: (a) alta variação da solubilidade com dependência de densidade e, portanto, temperatura e pressão do solvente; (b) aumento a seletividade com a aproximação do valor da pressão do solvente à pressão crítica da mesma; e (c) variação na solubilidade com o peso molecular do soluto, para solutos com estrutura molecular similar (BROGLE, 1982; RIZVI et al., 1986). A seletividade do dióxido de carbono pode ser controlada com temperatura e pressão, ou seja, a extração seletiva de materiais de alta e baixa volatilidade se torna possível pela escolha apropriada e manuseio correto das condições de operação.

Diferentes substâncias possuem temperatura e pressão críticas diferentes; estas propriedades são importantes na seleção de fluidos e condições adequadas para a aplicação do processo via SFE. O fluido usado pode ser reciclado ou usado com perda mínima. Entre os fluidos estudados, o CO₂ é a escolha mais comum, pois possui propriedades críticas mais baixas do que outras substâncias. Atualmente, a técnica de extração supercrítica de CO₂ se tornou promissora e usada em muitas áreas. Algumas razões para seu uso são: o solvente tem baixa toxicidade, é reciclável, barato, relativamente inerte, não inflamável e o processo melhora a qualidade do produto (MENDES et al., 2003; RIERA et al., 2004). Extração supercrítica é um processo que produz extratos naturais limpos e o conhecimento da composição dos extratos é crucial para a identificação de prováveis compostos ativos (PEIXOTO; OLIVEIRA; CABRAL, 2010).

O dióxido de carbono, como fluido supercrítico, é um solvente com alta eficiência na extração de óleo devido à sua natureza apolar, extraindo eficientemente compostos apolares, como misturas complexas de óleos essenciais, ésteres, terpenos, ácidos graxos, ceras, resinas e pigmentos naturais. A extração de compostos bioativos polares pode ser obtida pela adição de pequenas quantidades de outros solventes (cossolventes), por exemplo, etanol (ALBUQUERQUE, 2008; CONTADO et al., 2010).

A extração com fluidos supercríticos tem recebido crescente atenção como uma importante alternativa aos métodos tradicionais de separação para obter compostos de interesse. O CO₂ é o solvente supercrítico mais utilizado, uma vez que os extratos podem ser obtidos sem contaminação de solventes orgânicos residuais, além de não apresentar degradação térmica devido a sua baixa temperatura crítica (31 °C) (MENDES et al., 2003).

Esta extração se tornou uma tecnologia vantajosa para obter compostos naturais com atividade antioxidante (MUNSHI; BHADURI, 2009).

As propriedades do fluido supercrítico conferem altas taxas de transferência de massa e seu comportamento sensível a mudanças de pressão e temperatura permite a separação seletiva de compostos com atividade biológica como diterpenos (DE OLIVEIRA et al., 2014), fitoesteróis e antioxidantes de matrizes vegetais (RAI; BHARGAVA; MOHANTY, 2017).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi extrair óleo de uma semente oleaginosa típica brasileira (amêndoa de babaçu) utilizando CO₂ supercrítico, além de avaliar a influência das condições de operação no rendimento, no perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis e na concentração de fitosteróis.

II-2 Material e métodos

II-2.1 Obtenção e caracterização física da matéria prima

As amêndoas de babaçu foram provenientes das cidades de Esperantina (latitude: 03° 54'06 "S, longitude: 42° 14 '01" W) e Teresina (latitude: 05° 05 '21 "S, longitude: 42° 48' 07" W), estado do Piauí, coletadas em junho de 2016 e fornecidas pela incubadora de empresas BABACOAL (Teresina, BR). As amêndoas selecionadas foram secas em forno de circulação de ar (Marconi, Piracicaba, BR) por 48 horas a 50 °C, até o peso constante. Após as amêndoas serem trituradas, foram armazenadas em freezer vertical (Frost Free, Brastemp, BR) a -22 °C.

A umidade das amêndoas foi determinada por gravimetria (AOAC 925.45b, 2016) e o teor de cinzas pelo peso do material submetido ao aquecimento à temperatura de 600 °C, até combustão total da amostra (AOAC 923.03, 2016) (AOAC, 2007). Na caracterização das amêndoas secas, foram contempladas também as análises de extrato etéreo (lipídeos) (AOAC 920.39, 2016), fibra bruta, determinação de nitrogênio total e proteína bruta (AOAC, 2007).

A determinação lipídica foi realizada via Soxhlet, com o hexano como solvente (Synth, Diadema, BR) por 6 h; em seguida, o solvente foi removido por evaporação em condições ambientais. Para análise de fibra bruta, ± 1 g da amêndoa foi esmagada, seca e desengordurada. Para cada amostra, 100 mL de ácido sulfúrico a 1,25% (Synth, Diadema, BR) foram adicionados e introduzidos no aparelho para determinação da fibra, e permaneceram por 30 min após o início da ebulição. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada até a ocorrência da reação neutra. Cada amostra foi seca e

pesada. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em mufla a 600 °C por 2 h, resfriadas e novamente pesadas.

A determinação da proteína bruta foi realizada pelo método de Kjeldahl, utilizando o aparelho Micro-Kjeldahl para determinação de nitrogênio. Nesta análise, a 1 g de amêndoas de babaçu adicionou-se uma mistura de sulfato de cobre e sulfato de sódio anidro (Synth, Diadema, BR) e, em seguida, 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (Synth, Diadema, BR). Após esse procedimento, realizou-se a digestão das amostras em um bloco digestor de Micro-Kjeldahl por 2 h a 400 °C. Após o resfriamento, foram adicionados 35 mL de água destilada. Em um béquer de 250 mL, foram transferidos aproximadamente 10 mL de ácido bórico 5% e 2 gotas do indicador de vermelho de metila e azul de metileno. As amostras foram colocadas novamente no aparelho destilador de Micro-Kjeldahl e foram, então, adicionados 15 mL de hidróxido de sódio 40% (Synth, Diadema, BR); em seguida, a quantificação foi realizada por titulação com ácido clorídrico 0,02N (Synth, Diadema, BR). Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrogênio total na amostra convertidos em proteína pelo fator 6,25 (AOAC, 2007). O teor de carboidrato foi calculado pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteína, gordura, umidade e cinzas.

II-2.2 Propriedades do leite fixo

As amêndoas secas foram trituradas em liquidificador (Arno, São Bernardo do Campo, BR) e o diâmetro médio das partículas foi determinado pelo emprego de um jogo de seis peneiras da série padrão Tyler, com agitação durante 15 min. O diâmetro médio das partículas foi calculado pela relação apresentada na Eq. 1 (ASAE, 2008-S319.4).

O diâmetro médio das partículas foi calculado pela relação entre a abertura nominal das peneiras e a massa do material retido em cada peneira (CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

A determinação da densidade real das amêndoas de babaçu esmagadas foi feita pela Central Analítica do Instituto de Química de Campinas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por picnometria de gás hélio, em um picnômetro automático (Quantachrome Ultrapyc 1200e, Flórida, US). A picnometria de gás hélio permite obter o volume de um sólido reduzindo o fluxo de gás em uma câmara de medição, que é causada pela presença de um sólido.

A densidade aparente foi determinada empiricamente pela razão entre a massa total das amêndoas de babaçu moídas no extrator e volume de 290 cm³. A massa da amêndoa de babaçu empacotada no extrator foi pesada dez vezes em balança analítica (Shimadzu AUY220, Tóquio, JP).

A porosidade do leito extrator foi calculada pela relação entre a densidade real e a densidade aparente e a densidade real pela Eq. (1).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (1)$$

em que ε é a porosidade, ρ_a é a densidade aparente e ρ_r é a densidade real.

II-2.3 Extração de fluido supercrítico (SFE)

O processo de extração por SFE foi realizado em SFE-2 em escala laboratorial, conforme descrito por Cornelio-Santiago et al. (2017). Na SFE, 10 g de amêndoas de babaçu foram acondicionadas no leito fixo do extrator (290 cm³) e misturados com cerca de 20 g de esferas de vidro de 3 mm de diâmetro em cada lado para encher completamente o canal de extração. O CO₂ utilizado possuía pureza de 99,9% (Linde, Sertãozinho, BR).

Para determinar o tempo de extração, foram realizadas cinéticas de extração a uma temperatura de 70 °C e pressão de 30 MPa, condições otimizadas para extração de alguns óleos vegetais pelo grupo de pesquisa (CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2014, SANTOS et al., 2016). O óleo foi coletado a cada 20 minutos em frascos de vidro de 50 mL, até o esgotamento do óleo na matriz.

Os experimentos foram realizados em um fatorial simples com três repetições, duas pressões (25 MPa e 35 MPa) e cinco temperaturas diferentes (40, 50, 60, 70 e 80 °C) (Tabela 1). O fluxo de CO₂ foi mantido constante a 1,6 × 10⁻⁴ kg-CO₂/s por 2 h, respeitando um tempo estático inicial de 20 min.

Após o período de extração, o rendimento global (Y) foi calculado pela Eq. 2, onde m é a massa total do óleo coletado após 2 h de extração e A é a massa de amêndoas de babaçu esmagadas usada em cada experimento.

$$Y = \frac{m}{A} \times 100 \quad (2)$$

II-2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amêndoas de babaçu esmagadas foi analisada a partir das imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura TM 3000 Tabletop (Hitachi, Tóquio, JP) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA/FZEA/USP). As amostras foram examinadas em voltagem de 15 kV de acordo com Lu, Weng e Cao (2006) em um

aumento de 100x. As amostras foram avaliadas por MEV antes e após a SFE com a intenção de avaliar o efeito do CO₂ no estado supercrítico na estrutura das partículas.

II-2.5 Determinação das propriedades físicas do óleo

II-2.5.1 Determinação do índice de refração

O índice de refração (n) foi medido em um refratômetro (LAMBDA, 2WAJ, ATTO, Instruments Co., Tsuen Wan, HK) com luz de sódio ajustada para um comprimento de onda de 598,3 nm. Uma gota de amostra de óleo de amêndoa de babaçu foi colocada no poço da amostra e as leituras foram realizadas a 25 e 40 °C (AOAC 921.08, 1997). Para manter a temperatura constante, o refratômetro foi mantido em banho termostatizado (Marconi, Piracicaba, BR) com circulação de água nas temperaturas de 25 e 40 °C (± 2 °C). A calibração foi realizada a 20 °C com água destilada, cujo índice de refração é de 1,3330 nm.

II-2.5.2 Determinação da densidade e viscosidade dinâmica

Análises de densidade e viscosidade do óleo de amêndoa de babaçu foram realizadas em um densitômetro digital (DMA 4500 Anton-Paar Graz, AT). O densímetro digital fornece os dados de densidade com incerteza de 0,00005 g/cm³ e repetibilidade do desvio padrão de aproximadamente 0,00001 g/cm³. A injeção do óleo de amêndoa de babaçu no equipamento foi realizada com uma seringa de 5 mL, acoplada ao equipamento. Foram injetados 2 mL de óleo para cada amostra e as leituras de densidade foram medidas a 25 e 40 °C após estabilização do equipamento entre uma leitura e outra. Hexano (Êxodo, Hortolândia, SP, BR) foi utilizado como solvente de lavagem entre as leituras da amostra.

As análises dinâmicas de viscosidade do óleo foram também realizadas a temperaturas de 25 e 40 °C em um viscosímetro automático (AMVn, Anton Paar, Graz, AT). Este equipamento permite controlar a temperatura e determina a viscosidade de uma única amostra em diferentes ângulos de inclinação e suas repetições, proporcionando uma maior precisão nos resultados obtidos. As amostras foram acopladas em um tubo capilar de vidro calibrado de 1,8 mm. Esse capilar foi acoplado ao aparelho e as leituras foram realizadas em quadruplicata a cada temperatura, sob três ângulos distintos de deslocamento (50, 60 e 70°), totalizando 12 medidas por amostra.

O cálculo da viscosidade dinâmica foi realizado de acordo com a Eq. 3, em que V_d é a viscosidade dinâmica; V_c é a viscosidade cinemática e ρ é a densidade:

$$Vd = \frac{Vc}{\rho} \quad (3)$$

II-2.6 Perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis (TAG)

A avaliação do perfil de ácidos graxos foi realizada de acordo com a AOAC (método 991.39, 2005), com modificações. Colocou-se 50 mg de óleo de amêndoa de babaçu em um tubo falcon de 50 mL e adicionou-se 4 mL de solução de NaOH 0,5 N (Dinâmica, Diadema, BR). Essa mistura permaneceu em banho-maria (Marconi, Piracicaba, BR) a 90 °C por 4 min. Foram adicionados 4 mL do reagente de esterificação, BF₃ metanólico (Sigma Aldrich, St. Louis, US) e a solução foi agitada por 30 s em agitador tubular (Marconi, Piracicaba, BR). Depois, foi novamente aquecida a 90 °C durante 4 min. Deixou-se a mistura em repouso durante 1 min à temperatura ambiente e então foram adicionados 4 mL de solução saturada de NaCl (35,7 g NaCl/100 mL H₂O) (Dinâmica, Diadema, BR). A solução foi agitada durante 30 s em agitador de tubos.

Cinco mililitros de hexano (Panreac, Barcelona, ES) foram adicionados e novamente esta solução foi agitada durante 30 s num agitador de tubos. Após esse procedimento, a solução foi mantida em repouso até a completa separação das fases e, em seguida, a fase sobrenadante contendo ésteres metílicos de ácidos graxos foi seca com N₂ em um concentrador de amostras (Marconi, Piracicaba, BR). Os ésteres metílicos foram diluídos em hexano a uma concentração de 10 mg/mL.

Análises de ácidos graxos foram realizadas utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa (CG/MS), com injetor automático ((AOC-5000, Shimadzu, Tóquio, JP) e (QP, 2010 Plus, Shimadzu, Tóquio, JP)). Utilizou-se uma coluna capilar com fase estacionária de bis-cianopropil polissiloxano (100 m x 0,25 mm id 0,20 µm df, SP-2560 Supelco, Bellefonte, US) e hélio como gás carreador a uma velocidade interna de 28,8 cm/s.

A injeção foi realizada em modo *split* (taxa de 12,5) e o volume injetado foi de 1,0 µL de uma solução contendo ésteres metílicos em hexano. A temperatura do injetor e do detector era de 250 °C. A temperatura do forno foi ajustada de modo a obter-se uma rampa, começando a 100 °C durante 1 min, de 100 °C a 195 °C, a uma velocidade de 5 °C/min e depois de 195 °C a 250 °C, a uma taxa de 20 °C/min. Estas condições cromatográficas se basearam na AOAC (método 996.06, 2005). A identificação prévia dos picos foi feita comparando-se os espectros de massa das bibliotecas NIST 11 e NIST 11s acopladas ao equipamento. A quantificação foi feita utilizando-se a curva padrão de miristato de metila nas concentrações de 32, 160, 800, 4.000 e 12.500 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Ao analisar todos os TAGs com diferentes ácidos graxos ligados a um glicerol e seus respectivos tipos de isomerismo, o perfil de TAG pode incluir mais de 100 componentes.

Devido à dificuldade na realização da análise de TAG, o provável perfil de TAG do óleo de amêndoa de babaçu foi determinado utilizando o algoritmo estatístico sugerido por Antoniosi Filho, Mendes e Lanças (1995). Para cálculo de probabilidade, o MATLAB R2013a Inc. foi usado para determinar a composição dos TAGs, conforme descrito por Bessa et al. (2015), Cornelio-Santiago et al. (2017) e Hirata et al. (2013).

II-2.7 Quantificação de β -Sitosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A preparação das amostras foi baseada na metodologia proposta por Mazalli, Saldanha e Bragagnolo (2003) e Ortíz, Moya e Navarro (2006) com as seguintes etapas: saponificação a frio com 20 mL de solução de KOH a 15% (Exodo Científica, Hortolândia, BR) em etanol (Panreac, Barcelona, ES) por 12 horas; seguida pela adição de 10 mL de solução saturada de NaCl (Exodo Científica, Hortolândia, BR) e duas extrações com 5 mL de n-hexano sob agitação (Panreac, Barcelona, ES) por 5 min.

A quantificação de β -sitosterol foi baseada na metodologia de Mazalli, Saldanha e Bragagnolo (2003), utilizando um cromatógrafo líquido (SHIMADZU, Kyoto, JP) e detector de arranjo de diodo (SPD-M20A), com absorvância de 208 nm. A coluna analítica foi C18 de 100 x 4,6 mm x 4 μ m (Chromolith, Merck, Darmstadt, GE), temperatura 40 °C, fase móvel acetonitrila:isopropanol (85:15, v:v) (Panreac, Barcelona, ES); fluxo 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 μ L.

A identificação de β -sitosterol foi realizada comparando o tempo de retenção de cada amostra com o padrão e quantificação através de áreas de pico correspondentes por padronização externa em que o padrão puro de β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, US) foi diluído em etanol concentrações de 20 a 100 μ g/mL.

II-2.8 Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar o rendimento de extrato e o perfil de ácidos graxos em função das condições operacionais empregadas pelo software SAS Versão 8.0 (Statistical Graphics Corp., US). Diferenças significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$) foram realizadas pelo teste de Tukey.

II-3 Resultados e Discussão

II-3.1 Caracterização da matéria prima

A composição centesimal apresentou umidade em base seca de 4,37 ($\pm 0,06$) g/100g, teor de cinzas de 1,34 ($\pm 0,01$) g/100g, fibras de 23,47 ($\pm 0,43$) g/100g, lipídios de 62,14 ($\pm 0,41$) g/100g, proteínas de 8,26 ($\pm 0,26$) g/100g e carboidratos de 0,42 ($\pm 0,41$) g/100g. Amêndoas de babaçu, como outras amêndoas oleaginosas, possuem lipídios como fração predominante (62,14%) em relação aos demais componentes. Verificou-se também que esta semente é muito fibrosa.

O consumo de sementes ricas em fibras pode ajudar a reduzir os níveis de colesterol plasmático e reduzir o risco de desenvolvimento de câncer. As fibras têm a capacidade de reter substâncias tóxicas ingeridas e/ou produzidas no trato gastrointestinal, reduzem o tempo de contato destas substâncias no trato intestinal e também promovem aceleração na formação das fezes e, assim, favorecem a rápida eliminação dessas substâncias. Esta propriedade permite a redução do tempo de contato de substâncias mutagênicas e carcinogênicas com as paredes do intestino, promovendo ação protetora ao trato gastrointestinal (ANJO, 2004).

II-3.2 Densidade real e aparente e porosidade do leito fixo

A densidade real determinada foi de 0,54 g/cm³ e a densidade aparente do leito fixo de extração foi de 1,12 g/cm³. O diâmetro médio das partículas foi de 1,1 mm. O leito fixo contendo estas partículas gerou uma porosidade de 0,48. Esta característica proporcionou bons rendimentos, indicando bom contato soluto/solvente, o que promoveu uma boa taxa de transferência de massa, uma vez que o leito poroso promove aumento na difusividade e, assim, o solvente penetra nas partículas. Valores de porosidade menores que 1 permitem contato superficial entre o soluto e o solvente, o que favorece a migração do soluto da matriz para o solvente. No entanto, altas porosidades em um processo de extração contínua podem reduzir o contato entre o solvente e os compostos a serem extraídos, causando perda de eficiência do processo (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

De acordo com Oliveira et al. (2010), outro fator que interfere diretamente no rendimento da extração é o diâmetro da partícula. Isto é relevante para avaliar a resistência interna da transferência de massa. A fim de aumentar o rendimento global da extração, a redução do diâmetro da partícula é favorável, pois proporciona aumento na área da superfície com o solvente e isto diminui a distância que o soluto se move de dentro da partícula porosa para a superfície.

Se as partículas sólidas tiverem um tamanho extremamente pequeno, além do aumento dos custos de moagem, o fenômeno da "canalização" pode ocorrer devido ao efeito de adesão. Neste efeito, partículas sólidas e finas se unem e formam um aglomerado

e o fluido passa através dos leitos pelo lado exterior. Portanto, o contato entre duas fases é restrito e não é feito corretamente; assim, o rendimento da extração diminui. Além disso, quanto menores as partículas, maior a queda de pressão do fluido devido à menor porosidade. Se as partículas são grandes, a difusividade e acessibilidade do CO_2 supercrítico para o óleo dentro das partículas sólidas é difícil, devido à redução da superfície de contato entre duas fases e o aumento da resistência de transferência de massa (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

II-3.3 Extração supercrítica do óleo de amêndoa de babaçu

Curvas cinéticas de extração utilizando CO_2 supercrítico como solvente foram feitas com o intuito de confirmar a reprodutibilidade do equipamento e definir o tempo de extração necessário para que a matriz apresentasse maior esgotamento de óleo no processo.

Nestes experimentos preliminares, para as mesmas condições de pressão, temperatura e vazão, as curvas cinéticas foram geradas em triplicata (Figura 1) usando um tempo estático de 20 min e um tempo dinâmico de 140 min. A replicação dos pontos experimentais indica uma boa repetibilidade dos experimentos.

Figura 1 - Curvas cinéticas obtidas a 70 °C, 35 MPa e 10 g/min de CO_2 usando um extrator de leito fixo de 290 cm³ com 10 g de amêndoa de babaçu triturada

Fonte: Própria autoria, 2018.

As curvas cinéticas C1, C2 e C3 apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, a curva não linear apresenta características típicas com três regiões distintas. No tempo inicial, têm-se o período taxa de extração constante (de 0 a 40 min) com inclinação

constante, o que caracteriza o mecanismo dominante de transferência de massa por convecção do soluto na superfície das partículas para o solvente CO₂ supercrítico. Região de maior solubilidade do óleo em CO₂. No período de taxa de extração decrescente (de 50 a 70 min) ou inclinação da curva, não há mais solutos livres na superfície das partículas, o que indica a depleção do óleo na superfície das partículas. Assim, as restrições à transferência de massa do interior da matriz para a liberação dos solutos para a fase supercrítica começam a existir. Neste período (de 80 a 140 min), inicia-se a difusão de solutos a partir da matriz, onde a transferência de massa ocorre principalmente pela difusão controlada no interior da matriz (Figura 1).

A cinética de extração permitiu definir o tempo de extração com CO₂ supercrítico em 120 min, já que, a partir desse período, o incremento do rendimento de massa não foi significativo, após 20 min de equilíbrio estático. As condições de operação de pressão e temperatura (P e T) empregadas no processo foram escolhidas com base nas condições otimizadas por este grupo de pesquisa para obter óleos vegetais, então dois valores de pressão (P) (25 MPa e 35 MPa) para uma faixa de temperatura (T) (40, 50, 60, 70 e 80 °C) foram escolhidos. Para estas condições experimentais, o maior rendimento de extração global foi de 59,93%, obtido a 80 °C e 35 MPa (Tabela 1). Nessa condição, a recuperação do óleo extraído das amêndoas foi de 89,86% quando comparado ao extrato etéreo obtido com extração de percolação via Soxhlet, utilizando hexano como solvente.

Tabela 1 - Extração global e rendimento de recuperação de óleo de amêndoa de babaçu após 120 min de extração dinâmica

P (MPa)	T (°C)	ρ CO ₂ (kg/m ³)	Rendimento (%)	Recuperação de lipídeos (%)	β -sitosterol (mg/100g do óleo)
25	40	880,16	51,94 ^b	77,88	27,43
	50	834,80	50,31 ^b	75,43	16,19
	60	787,00	57,64 ^a	86,43	20,17
	70	737,26	57,71 ^a	86,53	19,47
	80	686,65	56,95 ^a	85,40	20,15
35	40	935,04	56,43 ^b	84,62	18,73
	50	899,45	53,65 ^c	80,45	18,61
	60	863,04	56,29 ^b	84,40	12,01
	70	826,01	56,75 ^b	85,10	18,38
	80	788,66	59,93 ^a	89,86	20,03

Valores seguidos de diferentes letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 95% pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria autoria, 2018.

À pressão de 25 MPa, o maior rendimento global de extração foi obtido a 70 °C (57,71%). Foi possível observar uma relação inversa com a densidade supercrítica de CO₂, ou seja, quanto maior a densidade, menores rendimentos globais de extração a 25 MPa e com temperatura variando de 50 a 70° C foram obtidos. Aos 35 MPa, o mesmo

comportamento foi observado ao longo da faixa de temperatura empregada (50 a 80 °C). Esta relação para 25 MPa em T de 40 e 80 °C e para 35 MPa na T de 40 °C (Tabela 1) não foi obtida.

Com exceção destes pontos, é observada influência positiva da temperatura sobre o rendimento do óleo, o que indica maior influência da pressão de vapor ou volatilização do óleo para a fase supercrítica, facilitando sua solubilização. Para ambos os valores de pressão, um comportamento de reversão foi observado com o aumento da temperatura para a condição entre 40 e 50 °C (Tabela 1). Nesse caso, existe um domínio de alto valor de densidade na solubilização do óleo, indicando que a 40 °C sua volatilização é insignificante. O óleo de amêndoa de babaçu obtido via extração supercrítica de CO₂ é um produto seguro para a saúde humana e para a aplicação de testes *in vivo*, pois o CO₂ supercrítico utilizado como solvente é completamente separado do óleo na despressurização do sistema, já que é um gás em condições ambientais. O óleo obtido é totalmente isento de resíduos de solventes orgânicos.

II-3.4 Influência do processo de extração na estrutura das partículas das amêndoas

Amostras de amêndoa de babaçu após extração supercrítica foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi possível observar nas micrografias que o processo de extração com CO₂ supercrítico (Figura 2, A e B) alterou a estrutura da amêndoa. Nestas imagens, observa-se a presença de partículas esbranquiçadas agregadas nas partículas antes e depois da extração, indicativo de minerais impregnados na estrutura da amêndoa, confirmado pela quantidade de minerais essenciais presentes na matéria-prima (Tabela 2). Os principais minerais são fósforo, potássio, sódio, zinco e manganês. A aglomeração de minerais na superfície da amêndoa de babaçu após a extração com CO₂ supercrítico é esperada, uma vez que o CO₂ não solubiliza os minerais (Figura 2B).

Figura 2 - Micrografias das amêndoas antes (A) e após (B) extração supercrítica a 70 °C e 35 MPa

Fonte: Própria autoria, 2018.

Outra variação na estrutura das partículas de amêndoa de babaçu após a extração indica que as marcas esféricas na superfície podem estar relacionadas às moléculas de óleo impregnadas e, ao contato com o CO₂ supercrítico, foram extraídas deixando esta conformação. As análises de microscopia eletrônica de varredura indicam que o CO₂ se difundiu através das partículas, especificamente ao longo do citoplasma e da parede celular, de modo que o solvente solubilizou o óleo alocado nos corpos lipídicos em torno da parede celular. No processo, se houver água na parede celular, a mesma pode atuar como fator redutor no rendimento global da extração, pois se trata de uma barreira para a difusão do CO₂ ao longo dos corpos lipídicos, assim como a difusão do óleo para fora da matriz de extração.

Tabela 2 - Perfil mineral da farinha do mesocarpo e amêndoas de babaçu¹

Mineral	Resultados (mg/kg da amêndoa)
Cobre, mg	10,4 (± 0,2)
Ferro, mg	14 (± 1,0)
Fósforo, mg	3.000 (± 200)
Manganês, mg	27,5 (± 0,1)
Potássio, mg	3.000 (± 200)
Selênio, mg	< LD (± 1,0)
Sódio, mg	110 (± 4,0)
Zinco, mg	28,5 (± 0,3)

¹Resultados expressos em média e desvio padrão de uma triplicada, LD = Limite de Detecção
Fonte: Própria autoria, 2018.

II-3.5 Propriedades físicas do óleo

A Comissão do *Codex Alimentarius* (2008) relata que os valores do índice de refração (IR) para óleos de amêndoa de babaçu extraídos por prensagem a quente variam entre 1,448 e 1,451 nm a 40 °C. Os extratos de óleo de amêndoa de babaçu extraídos via SFE mostraram valores muito semelhantes variando de 1,4520 a 1,4528 para a mesma

temperatura (Tabela 3). O índice de refração medido a 40 °C permaneceu o mesmo para quase todas as condições experimentais. O óleo obtido a 40 °C a 25 e 35 MPa apresentou valores significativamente diferentes dos demais (Tabela 3).

Na caracterização do óleo de amêndoa de babaçu extraído por CO₂ supercrítico, também foram determinados parâmetros como densidade e viscosidade; todas as medidas físicas foram realizadas a 25 e 40 °C, valores de temperatura em que estes dados são relatados.

A viscosidade pode estar relacionada com a natureza físico-química do líquido ou com a composição, temperatura e pressão do sistema. A viscosidade de um óleo é muito importante para correlacionar sua natureza física e composição (SCHRAMM, 2006). Além disso, tanto a densidade quanto a viscosidade são parâmetros fundamentais para a compreensão dos fenômenos de transporte em processos industriais (DE OLIVEIRA et al., 2014), ainda mais importantes para produtos cujas propriedades físicas são desconhecidas, como óleo de babaçu.

O óleo de amêndoa de babaçu teve densidade variando de 0,9141 a 0,9165 g/mL a 25 °C e de 0,9034 a 0,9164 g/mL a 40 °C (Tabela 3). Os valores obtidos a 25 °C são semelhantes aos relatados pela Comissão do *Codex Alimentarius* (2008) e Brasil (1995), que descrevem a faixa de densidade do óleo de babaçu variando de 0,914 a 0,917 g/mL a 25 °C. A densidade também é um parâmetro físico que indica a qualidade dos óleos refinados, por isso sua determinação é importante (CODEX, 2008).

Em relação à viscosidade, sabe-se que esta propriedade é definida e alterada pelo resultado de forças de atração entre moléculas quando elas estão relativamente próximas umas das outras. Consequentemente, quando a energia cinética aumenta devido ao aumento da temperatura, as moléculas tendem a se separar em um curto período de tempo, tornando as forças intermoleculares menos eficazes na diminuição da viscosidade (DE OLIVEIRA et al., 2014). Portanto, a viscosidade (η) diminui à medida que T aumenta (Tabela 3). A análise dos resultados indica que η não variou para os óleos obtidos em diferentes condições de temperatura a 35 MPa, porém não diferiu significativamente dos valores obtidos a 25 MPa para algumas temperaturas (Tabela 3).

Tabela 3 - Propriedades físicas do óleo de babaçu obtido via SFE

P (bar)	T (°C)	ρ^1 (25 °C)	ρ^1 (40 °C)	η^2 (25 °C)	η^2 (40 °C)	IR (25 °C)*	IR (40 °C)*
250	40	0,9170 ^a	0,9063 ^a	51,6854 ^{abc}	28,4596 ^a	1,4560 ^{ab}	1,4520 ^b
	50	0,9137 ^a	0,9021 ^a	52,2106 ^{ab}	28,7816 ^a	1,4563 ^a	1,4525 ^a
	60	0,9171 ^a	0,9064 ^a	52,1487 ^{ab}	28,6528 ^a	1,4560 ^{ab}	1,4528 ^a
	70	0,9170 ^a	0,9064 ^a	51,9188 ^{abc}	28,5529 ^a	1,4550 ^{cd}	1,4526 ^a
	80	0,9167 ^a	0,9063 ^a	51,5889 ^{bc}	28,4540 ^a	1,4549 ^{cd}	1,4520 ^b
350	40	0,9166 ^a	0,9060 ^a	51,9086 ^{abc}	28,8427 ^a	1,4555 ^{abc}	1,4520 ^b
	50	0,9167 ^a	0,9061 ^a	52,2843 ^a	28,8180 ^a	1,4555 ^{bcd}	1,4525 ^a
	60	0,9167 ^a	0,9060 ^a	51,3151 ^c	28,2786 ^a	1,4549 ^d	1,4528 ^a
	70	0,9169 ^a	0,9062 ^a	52,2147 ^{ab}	28,5232 ^a	1,4554 ^{bcd}	1,4525 ^a
	80	0,9168 ^a	0,9063 ^a	51,4867 ^c	28,3376 ^a	1,4553 ^{bcd}	1,4525 ^a

Os parâmetros físicos dos óleos seguidos pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 95% pelo teste de Tukey. ¹densidade, expressa em g.cm⁻³. ²viscosidade, expressa em mPa.s. *Índice de refração, parâmetro adimensional
 Fonte: Própria autoria, 2018.

II-3.6 Perfil de ácidos graxos, composição em triacilgliceróis (TGA) e concentração de β -sitosterol no óleo

A Tabela 4 mostra a porcentagem do perfil de ácidos graxos no óleo de amêndoa de babaçu extraído por CO₂ supercrítico nas condições de pressão de 25 e 35 MPa e nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C. É possível observar que o óleo de babaçu possui diversidade de ésteres metílicos de ácidos graxos e possui uma composição de 80% de ácidos graxos saturados (SFA), 18% monoinsaturados (AGM) e 3,5% de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI).

O perfil de ácidos graxos obtido do óleo de amêndoa de babaçu extraído por CO₂ supercrítico em diferentes condições de P e T mostra uma diferença na presença do ácido graxo caprílico C8:0. Em ensaios em condições de baixa temperatura, o C8:0 não pôde ser detectado, como também na condição de extração mais severa (35 MPa, 80 °C) (Tabela 4). Os principais ácidos graxos presentes neste óleo são o ácido láurico (C12:0), o ácido oleico (C18:1) e o ácido mirístico (C14:0) (Tabela 4). Segundo Soares et al. (2007), que também descrevem o perfil de ácidos graxos para o óleo comercial de amêndoa de babaçu, estes ácidos graxos foram descritos como majoritários. O óleo do mesmo lote de amêndoas tinha a mesma composição de ácidos graxos, indicando que diferentes processos de extração têm pouca influência sobre a composição de ácidos graxos deste óleo vegetal.

Na extração supercrítica, a composição de ácidos graxos variou muito pouco em função do processo de temperatura para ambas as pressões testadas, não sendo possível estabelecer uma correlação entre P, T e a concentração de ácidos graxos.

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos (% de massa) de óleos de amêndoa de babaçu obtidas via extração SFE

Pressão	25 MPa					35 MPa					SOARES * (35 MPa)
Ácido graxo (símbolo)	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	40 °C
C 8:0	-	-	1,7	1,3	2,8	-	0,0	0,1	0,2	-	5,75
C 10:0	4,1	4,5	5,3	5,3	5,7	4,1	4,5	4,3	4,8	4,5	5,24
C 12:0	33,3	34,5	34,9	35,1	34,3	36,1	34,5	34,9	35,8	34,0	43,1
C 14:0	19,2	19,6	18,6	18,7	18,6	19,4	19,6	19,4	19,0	18,8	16,3
C 16:0	13,2	13,0	11,9	12,0	12,0	12,3	13,0	12,6	12,2	12,6	9,10
C 18:0	5,6	5,5	5,7	5,7	5,8	5,8	5,5	6,2	5,8	6,3	3,77
C 18:1	20,8	19,6	19,0	18,9	18,1	19,4	19,6	19,5	19,2	19,9	14,3
C 18:2	3,7	3,3	2,9	2,9	2,7	2,8	3,3	3,1	3,0	3,7	2,39
SFA	75,5	77,0	78,1	78,2	79,2	77,7	94,6	77,5	77,9	76,6	72,27
AGM	20,8	19,6	19,0	18,9	18,1	19,4	4,6	19,5	19,2	20,2	16,69
AGPI	3,7	3,3	2,9	2,9	2,7	2,8	3,3	3,1	3,0	3,7	2,39

*SOARES et al., 2007

Fonte: Própria autoria, 2018.

Os ácidos láurico, oleico e mirístico possuem atividade anti-inflamatória e são amplamente utilizados no tratamento de feridas cutâneas, pois atuam na estimulação do processo cicatricial, da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e da epitelização e reparo tecidual (MENIS FERREIRA et al., 2012). O óleo de babaçu é rico nesses ácidos graxos; portanto, o óleo pode ser uma matéria-prima para o desenvolvimento de produtos cosméticos ou medicamentos para essa finalidade.

Com base na composição dos ácidos graxos, os TAGs de triacilgliceróis apresentados no óleo de amêndoa de babaçu em concentrações mais elevadas, com proporção superior a 5%, foram estatisticamente determinados. A Tabela 5 apresenta os perfis TAG para o óleo de amêndoa de babaçu extraído. Os maiores TAGs do óleo de amêndoa de babaçu, em ordem decrescente, foram LOL (ácido láurico, oleico e láurico), com aproximadamente 22%, LOM (láurico, oleico e mirístico), com aproximadamente 20%, LOP (láurico, oleico e palmítico), com 17% e MOP (mirístico, oleico e palmítico), com 11%.

Ao avaliar a concentração de β -sitosterol no óleo de amêndoa de babaçu obtido em diferentes condições de extração por CO_2 supercrítico, pôde-se observar que o conteúdo deste fitoesterol variou de 16,19 a 27,43 mg β -sitosterol/100g de óleo a 25 MPa e 12,01 a 20,03 mg de β -sitosterol/100g de óleo a 35 MPa nas diferentes temperaturas avaliadas. Quando a pressão aplicada no processo foi menor (25 MPa) na condição de temperatura mais baixa (40 °C), a concentração deste fitoesterol foi maior (27,43 mg β -sitosterol/100g de óleo). A segunda condição de extração com maior concentração (20,17 mg β -sitosterol/100g de óleo) ocorreu na mesma pressão, mas a 60 °C (Tabela 1).

Tabela 5 - Perfil de triacilgliceróis de óleo de babaçu extraídos por fluido supercrítico nas condições de 25 MPa e 70 °C e 35 MPa e 80 °C

Grupos	SFE 35 MPa 80 °C		Grupos	SFE 25 MPa 70 °C	
(x:y)	TAG	Massa (%)	(x:y)	TAG	Massa (%)
-	-	-	C38:1	CpOL	2,32
C40:1	COL	5,49	C40:1	COL	7,22
C42:1	LOL	21,34	C42:1	LOL	22,42
C44:1	LOM	20,44	C44:1	LOM	20,33
C46:1	LOP	17,10	C46:1	LOP	16,07
C48:1	MOP	11,24	C48:1	MOP	10,05
C50:1	MOS	4,52	C50:1	MOS	3,87
C52:1	POS	1,68	C52:1	POS	1,37
C40:2	CLiL	1,03	C40:2	CLiL	1,11
C42:2	LLiL	3,99	C42:2	LLiL	3,45
C44:2	LLiM	3,82	C44:2	LLiM	3,13
C46:2	LLiP	3,19	C46:2	LLiP	2,48
C48:2	MLiP	2,10	C48:2	MLiP	1,55
C50:2	MLiS	0,84	C50:2	MLiS	0,60
C54:3	OOO	2,07	C54:3	OOO	2,75
C54:4	OOLi	1,16	C54:4	OOLi	1,27

Fonte: Própria autoria, 2018.

Não foi possível estabelecer correlação entre as condições de extração e as variáveis do processo, pois a 35 MPa, a concentração de β -sitosterol no óleo foi de 20,78 mg/100g de óleo a 80 °C, e 20,03 mg de β -sitosterol/100g óleo a 40 °C (Tabela 1). Existem dados na literatura que mostram que a concentração de β -sitosterol no óleo de amêndoas de babaçu varia de 48,2 a 53,9 mg/kg (CODEX, 2008) e 380 mg/kg (BEZERRA; ANTONIOSI FILHO, 2014).

Sovová et al. (2010) sugeriram que uma parte do β -sitosterol está fortemente ligada à matriz de sementes oleaginosas e amêndoas, fazendo com que a extração desse fitosterol seja um processo complexo, a menos que condições de pressão acima de 25 MPa sejam aplicadas. No entanto, neste estudo, melhores rendimentos foram obtidos a 25 MPa.

Vale ressaltar que, como o β -sitosterol é um composto polar, a extração eficiente desse composto pelo CO₂ só foi possível devido à interação desse fitosterol com os lipídios das amêndoas.

II-4 Conclusões

O óleo de amêndoa de babaçu extraído com CO₂ supercrítico apresentou rendimentos de 51,94 a 57,71 g/100g para pressão de 25 MPa, enquanto a 35 MPa os rendimentos variaram de 53,65 a 59,93 g/100g. Estes resultados são promissores quando comparados com o hexano, solvente convencional utilizado na extração de óleo, uma vez que o conteúdo lipídico obtido via SFE representa de 75,43 a 89,86% do óleo presente nas sementes, respectivamente. O perfil de ácidos graxos do óleo de babaçu foi semelhante, independentemente da condição de pressão e temperatura, método ou condições utilizadas na extração. Independentemente do solvente, o óleo era rico em ácidos graxos essenciais. Os ácidos graxos em maior concentração foram os ácidos láurico, mirístico, oleico e palmítico. De acordo com a composição dos ácidos graxos, os principais triacilgliceróis presentes neste óleo foram LOL, LOM, LOP e MOP. Essas composições em ácidos graxos e triacilgliceróis são típicas do óleo de babaçu e não diferiram em relação às condições de extração. Além disso, quando outros processos de tecnologia verde usando álcoois pressurizados foram aplicados, esta composição também foi mantida. A concentração de β -sitosterol em óleos vegetais pode variar de 380 mg/kg em óleo de babaçu a 9.680 mg/kg em óleo de milho (BEZERRA; ANTONIOSI FILHO, 2014), conforme fatores como tais clima e tipo de solo, que interferem diretamente na concentração de fitoesteróis em diferentes matrizes vegetais. Especificamente no presente estudo, o óleo de babaçu apresentou uma variação de 160,19 mg/kg a 274,3 mg/kg (25 MPa) e 120 mg/kg a 200 mg/kg (35 MPa). Empregando a tecnologia de extração com CO₂ supercrítico, foi possível observar que as condições de pressão utilizadas não promoveram interações significativas na concentração

de β -sitosterol, uma vez que este fitosterol pode ser extraído com o CO₂ supercrítico, devido à interação das moléculas com os ácidos graxos. Vale ressaltar que a quantificação deste composto e a determinação do perfil de ácidos graxos são importantes dados para futuros estudos com o óleo da amêndoa de babaçu, no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de feridas cutâneas, tais como úlceras de pressão, comumente detectadas em pacientes em unidades de terapia intensiva, idosos e pacientes com alterações metabólicas.

II- Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processos nº 2016/13460-8 e nº 2015/04729-0 - pela bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processo nº 306317/2016-8.

II- Referências

ALBUQUERQUE, C. L. C. **Extração supercrítica de matrizes vegetais oleaginosas: rendimento global, cinética de extração, composição química e atividade antioxidante.** 2008. 120 f. Dissertação - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Journal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v. 3, p. 145-154, 2004.

ANTONIOSI FILHO, N. R.; MENDES, O. L.; LANÇAS, F. M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 40, p. 557-562, 1995.

AOAC. **Method 920.39.** Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2016.

_____. **Method 921.08.** Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, 1997.

_____. **Method 923.03.** Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2016.

_____. **Method 925.45b.** Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2016.

_____. **Method 991.39.** Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Gaithersburg, 2005.

_____. **Method 996.06.** Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Gaithersburg, 2005.

_____. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 18th ed. Arlington: AOAC, 2007.

ASAE. Method of determining and expressing fineness of feed. materials by sieving. S319.4 **American Society of Agricultural and Biological Engineers.** Saint Joseph, Michigan, 2008.

BESSA, L. C. et al. (Liquid+ liquid) equilibrium of systems involved in the stepwise ethanolysis of vegetable oils. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, London, v. 89, p. 148-158, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2015.04.036>.

BEZERRA, K. S.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Characterization and quantification by gas chromatography of free steroids in unsaponifiable matter of vegetable oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, p. 238-245, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130288>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 19, de 15 de março de 1995. Norma técnica para complemento nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 mar. 1995.

BROGLE, H. CO₂ in solvent extraction. **Chemistry and Industry**, Chichester, p. 385-390, 1982.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, London, v. 67, n. 1, p. 21-33, 2005.

CERIANI, R. et al. Densities and viscosities of vegetable oils of nutritional value. **Journal of Chemical and Engineering Data**, Washington, v. 53, p. 1846-1853, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex-Stan 210**: codex standard for named vegetable oils. Rome, 2008.

CONTADO, E. W. N. F. et al. Estudo dos métodos de extração de carotenóides em cenoura por fluido supercrítico (EFS) e convencional. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. spe, 2010.

CORNELIO-SANTIAGO, H. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 128, p. 386-394, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.030>.

DE OLIVEIRA, P. M. A. et al. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction—Characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 95, p. 137-145, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.08.016>.

DEL VALLE, J. M.; URREGO, F.A. Free solute content and solute-matrix interactions affect apparent solubility and apparent solute content in supercritical CO₂ extractions: A hypothesis paper. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 66, p. 157-175, 2012.

GONZÁLEZ, C. et al. Densities of mixtures containing n-alkanes with sunflower seed oil at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, Washington, v. 41, p. 796-798, 1996.

HIRATA, G. F. et al. J. Liquid–liquid equilibrium of fatty systems: A new approach for adjusting UNIFAC interaction parameters. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v. 360, p. 379-391, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.10.004>.

LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Morphological, thermal and mechanical properties of ramie crystallites–reinforced plasticized starch biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 63, n. 2, p. 198-204, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.027>.

MALAMAN, F. S. et al. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.124, n.1, 1/1/, p.85-92, 2011.

MAZALLI, M. R.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 1, p. 49-54, 2003.

MENDES, R. L. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 356, p. 328-334, 2003.

MENIS FERREIRA, A. et al. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 46, p. 752-760, 2012.

MUNSHI, P.; BHADURI, S. Supercritical CO₂: a twenty-first century solvent for the chemical industry. **Current Science**, Delran, v. 97, p. 63-72, 2009.

OLIVEIRA, A. L. et al. Modelling of high-pressure phase equilibrium in systems of interest in the food engineering field using the Peng-Robinson equation of state with two different mixing rules. **Journal of Food Process Engineering**, Hoboken, v. 33, p. 101-116, 2010.

ORTÍZ, C. M. L.; MOYA, M. S. P.; NAVARRO, V. B. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 19, n. 2-3, p. 141-149, 2006.

PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Composition of supercritical carbon dioxide extracts of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, Hoboken, v. 33, p. 848-860, 2010.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1163, p. 2-24, 2007.

POVILAITIS, D.; VENSKUTONIS, P.R. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of rye bran using response surface methodology and evaluation of extract properties. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 100, p. 194-200, 2015.

RAI, A.; BHARGAVA, R.; MOHANTY, B. Simulation of supercritical fluid extraction of essential oil from natural products. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Amsterdam, v. 5, p. 1-9, 2017.

REIPERT, E. C. D. A.; RODRIGUES, C. E. C.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibria study of systems composed of refined babassu oil, lauric acid, ethanol, and water at 303.2 K. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, London, v. 43, p. 1784-1790, 2011.

RIERA, E. et al. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 241-244, 2004.

RIZVI, S. S. H. et al. Supercritical fluid extraction: Fundamental principles and modelling methods. **Food Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 55-65, 1986.

SANDLER, S. I. **Chemical and engineering thermodynamics**. 2nd ed. New York: Wiley 1989. 622 p.

SANTOS, D. N. et al. Supercritical Extraction of Cobia (*Rachycentron canadum*) liver oil as a new source of squalene. **Food Public Health**, Rosemead, v. 6, p. 157-164, 2016.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. Artliber: São Paulo, 2006.

SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytica Chemistry**, Amsterdam, v. 76, p. 40-51, 2016.

SOARES, B. M. C. et al. Solubility of triacylglycerols in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 43, p. 25-31, 2007.

SOVOVÁ, H.; GALUSHKO, A.A.; STATEVA, R.P.; ROCHOVÁ, K.; SAJFRTOVÁ, M.; BÁRTLOVÁ, M. Supercritical fluid extraction of minor components of vegetable oils: β -Sitosterol. **Journal of Food Engineering**, London, v. 101, p. 201-209, 2010.

CAPÍTULO III: Otimização do processo de obtenção de extratos do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) utilizando tecnologia verde – Extração com etanol pressurizado

Naila Albertina de Oliveira^a, Heidge Fukumasu^b, Alessandra Lopes de Oliveira^{a*}

^aLTAPPN, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ^bFaculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: alelopes@usp.br. Telefone: +55 1935654268.

III- Resumo

A eficiência do processo de extração com líquido pressurizado (PLE) depende de variáveis como temperatura (T), tempo estático (St) (tempo de contato entre o solvente e a matriz durante cada ciclo ou batelada) e da interação $St \times T$. Neste estudo, a extração com líquido pressurizado (PLE) foi otimizada para obter extratos do mesocarpo de babaçu ricos em compostos fenólicos. Apenas a temperatura exerceu influência positiva no rendimento da extração com etanol pressurizado. O maior rendimento de extrato do mesocarpo de babaçu (2,95%) foi obtido a $T = 86^{\circ}\text{C}$ e $St = 3$ min. Para a concentração de fenólicos totais, esta condição operacional também apresentou maior resultado: 1.257,25 mgGAE/100g de pó de mesocarpo de babaçu. Os extratos mostraram alta atividade antioxidante, particularmente após a extração com etanol pressurizado a $T = 90^{\circ}\text{C}$ e $St = 6$ min. Este extrato também apresentou um alto teor de compostos fenólicos totais (1.168,54 mgGAE/100g de pó de mesocarpo de babaçu). O extrato PLE 3 apresentou maior atividade antimicrobiana na inibição da bactéria *Staphylococcus aureus*, evidenciando que melhores rendimentos de extração, atividade antioxidante e antimicrobiana foram obtidos para menores St e elevadas temperaturas.

Palavras-chave: Extração com solvente acelerado. Babaçu. Compostos fenólicos.

III-1 Introdução

O coco de babaçu é um fruto oriundo da palmeira de babaçu, que é considerada uma oleaginosa da família *Arecaceae*, com ampla utilização na indústria alimentícia e cosmética. O coco é composto pelo epicarpo, mesocarpo e o endocarpo em proporções de 13, 20 e 58 g/100 g, respectivamente. Por outro lado, as amêndoas constituem 9 g/100 g do peso seco do coco, apresentam uma coloração branca e são encontradas entre 3 a 4 unidades por unidade de coco (CARRAZZA; ÁVILA; SILVA, 2012; TEIXEIRA, 2008).

O babaçu é considerado um fruto nativo nos estados do Maranhão, Piauí, Pará, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Tocantins. Contudo, a maior produção nacional é proveniente do estado do Maranhão, o qual é localizado no extremo noroeste da Região Nordeste. A produção anual é de 120 mil toneladas (CARRAZA; ÁVILA; SILVA, 2012; IEPAGRO, 2010). O mesocarpo de babaçu é uma matéria prima rica em amido como componente majoritário – cerca de 64 a 71% de sua composição centesimal (EMBRAPA, 1984).

A pesquisa de novas técnicas de extração, como a extração com líquido pressurizado (PLE), visa à redução do tempo de extração, um menor consumo de solventes e, além disso, também pode ser utilizada com o intuito de evitar a degradação de compostos termolábeis quando se emprega baixa temperatura (SHUAI et al., 2015). Neste processo, o tempo de contato entre o solvente e os solutos na matriz (St) é relativamente inferior aos tempos de extração em processos dinâmicos. Por ser um processo rápido, a degradação de compostos termossensíveis é menor, mesmo quando elevadas temperaturas são usadas.

Deste modo, métodos alternativos para extrair substâncias com atividade biológica usando a PLE têm sido estudados. Esta técnica é considerada inovadora quando se trata da obtenção de extratos naturais de plantas ricos em compostos com atividade farmacêutica que combinam solventes a temperaturas e pressões elevadas, objetivando uma extração rápida e eficiente com uma ampla variedade de compostos polares, quando solventes polares são empregados (HOWARD; PANDJAITAN, 2008).

A PLE é comumente utilizada na extração de componentes presentes em baixas concentrações com características de fotossensibilidade e termossensibilidade, compostos com atividade biológica de diferentes matrizes vegetais, tais como grãos de café verde (BELANDRIA et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2018), sementes de pitanga (OLIVEIRA et al., 2014). Nas pesquisas realizadas por Alonso-Salces et al. (2001) e Santos, Veggi e Meireles (2012), os pesquisadores extraíram compostos fenólicos com alta seletividade a partir da casca de maçã e pele de jabuticaba usando água e etanol, respectivamente.

Especificamente na obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos e com alta atividade antioxidante, a PLE tem sido empregada em vários estudos, sendo a extração de lipídeos, carotenoides, flavonoides e catequinas, oriundos de matrizes vegetais e, atualmente, esta técnica de extração também tem sido empregada na determinação de resíduos de medicamentos em amostras biológicas (BELWAL et al., 2018; KAMALI et al., 2018).

Os compostos fenólicos derivados de plantas possuem diferentes atividades, pois além da atividade antioxidante, esta classe de compostos tem demonstrado atividade anti-inflamatória (BELWAL et al., 2018; LIU et al., 2018). Especificamente o chá verde, amplamente estudado e descrito na literatura científica, possui altas concentrações de catequina, flavonoide largamente encontrado em compostos vegetais. As catequinas têm sido utilizadas no tratamento da inflamação articular causada pela artrite reumatoide, haja vista que estes compostos atuam promovendo redução de monócitos e macrófagos, células produtoras de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina 1 β (FECHTNER et al., 2017).

Os processos convencionais de extração com solventes orgânicos podem gerar um impacto ambiental negativo, dependendo do tipo e da quantidade dos solventes utilizados. Embora o impacto ambiental global de um ciclo de extração industrial, como a extração sólido/líquido com correntes cruzadas, não seja facilmente estimado, é bem conhecido que os custos de energia são altos e os resíduos nem sempre são reciclados em todas as fases do processo (CHEMAT et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2018). No entanto, quando processos de extração PLE são utilizados, a quantidade de solvente usada é consideravelmente menor quando comparada a processos convencionais de extração. Esta vantagem é um aspecto importante a ser considerado e que evidencia o uso desta técnica em escala industrial (OLIVEIRA et al., 2014).

O transporte dos solutos da matriz para o solvente é fortemente influenciado pelas propriedades físico-químicas dos solventes usados, o que interfere nos parâmetros de extração. O uso de temperaturas elevadas tem como função mudar significativamente as propriedades dos solventes, permitindo a incorporação dos solventes nas matrizes e um uso de quantidades menores de solvente; assim como influenciar na ruptura das ligações entre a matriz e o analito, permitindo um aumento na taxa de difusão (VAZQUEZ-ROIG; PICÓ, 2015).

Na extração com líquido pressurizado em um processo em batelada ou ciclos, muitas são as variáveis a serem consideradas na otimização para que se possa obter um extrato rico em um soluto específico. Na extração com etanol pressurizado, os parâmetros de processo elencados foram o tempo estático de contato do solvente com a matriz em cada

batelada (St) e a temperatura (T). As demais variáveis do processo (pressão, número de ciclos e volume de solvente) foram mantidas constantes. Assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer a influência do St e da T no rendimento global de extração, na concentração de compostos fenólicos totais e na atividade antimicrobiana *in vitro*. Estas variáveis foram estudadas utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²) e análise de superfície de respostas (ASR).

III-2 Material e Métodos

III-2.1 Obtenção e caracterização física da matéria-prima

A farinha do mesocarpo de babaçu foi proveniente da cidade Teresina (latitude: 05° 05' 21" S, longitude: 42° 48' 07" W), no estado do Piauí, coletadas em junho de 2016 e fornecidas pela incubadora de empresas BABACOAL (Teresina, BR). Para análise da composição centesimal foram seguidas as metodologias estabelecidas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2007), tais como umidade (AOAC 925.45b, 2016), cinzas (AOAC 923.39, 2016), proteínas (AOAC 960.32, 2016) e lipídeos (AOAC 920.39, 2016).

No Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP), o mesocarpo de babaçu foi despolpado, triturado e seco em estufa de circulação de ar (Marconi, Piracicaba, BR) durante 48 h a 50 °C. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer vertical (Frost Free, Brastemp, BR), à temperatura de -22 °C.

III-2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia do mesocarpo de babaçu moído foi analisada a partir das imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura TM 3000 Tabletop (Hitachi, Tóquio, JP), no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA/FZEA/USP). Para obter as micrografias, a amostra foi espalhada sobre uma fita dupla-face de carbono aderida ao porta-amostras (Ted Pella, Inc, Redding, EUA) e seca em sílica gel por 24 h à temperatura ambiente (25 ± 2) °C. As amostras foram examinadas em voltagem de 15 kV de acordo com Lu, Weng e Cao (2006) e um aumento de 100 vezes. Foram obtidas imagens do mesocarpo antes e após o processo de extração.

III-2.3 Perfil de minerais

A determinação dos minerais cobre, ferro, fósforo, manganês, potássio, selênio, sódio e zinco presentes no mesocarpo de babaçu foi efetuada por meio de digestão ácida da amostra em forno de micro-ondas (Brastemp, São Bernardo do Campo, BR). As soluções foram analisadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer – Optima 8300, Waltham, EUA). A quantificação de minerais foi possível por meio de curvas analíticas construídas a partir de soluções padrão (cobre, ferro, fósforo, manganês, potássio, selênio, sódio e zinco) (Merk, Darmstadt, GR). A análise foi realizada na Central Analítica, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

III-2.4 Densidade real, aparente e porosidade do leito fixo

Os tamanhos das partículas do mesocarpo após serem trituradas no moinho de facas (Marconi, Piracicaba, BR) foram analisados utilizando um analisador de tamanho de partícula por difração a laser (SALD-201V, Shimadzu, Kyoto, JP). Foram utilizados etanol, água e vaselina como solventes para dispersar o material sob agitação magnética. Essas determinações foram realizadas em triplicata para os três solventes.

A determinação da densidade real das partículas do mesocarpo de babaçu trituradas foi feita pela Central Analítica do Instituto de Química de Campinas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por picnometria de gás hélio, em picnômetro automático (Quantachrome Ultrapyc 1200e, Flórida, EUA). A análise foi realizada de acordo com o Instruction Manual Multivolume Pycnometer Micromeritics (1987). A picnometria de gás hélio permite obter o volume de um sólido pela redução do fluxo de gás em uma câmara de medida, que é causada pela presença de um sólido.

A densidade aparente foi determinada empiricamente pela relação entre a massa total das partículas de mesocarpo de babaçu moídas acondicionados no extrator com volume de 32,65 cm³. A massa das partículas de mesocarpo de babaçu empacotada no extrator foi pesada dez vezes em uma balança analítica (SHIMADZU AUY220, Tóquio, JP).

A porosidade do leito do extrator foi calculada pela relação entre a densidade real e a densidade aparente, e a densidade real pela Eq. (1).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (1)$$

em que ε é a porosidade do leito, ρ_a é a densidade aparente e ρ_r é a densidade real.

III-2.5 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

A obtenção dos extratos do mesocarpo de babaçu através da técnica com líquido pressurizado foi realizada em equipamento ASE[®] 150, Dionex (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, EUA). Como solvente foi utilizado etanol (99,8%) (Panreac, Barcelona, ES), pois se considerou o emprego de um solvente verde ou seguro para a saúde (Geralmente Reconhecido como Seguro - GRAS).

No estudo da influência das variáveis de processo, St e T, empregou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²), cujos níveis são apresentados na Tabela 1. Foram mantidos constantes o volume de solvente de 100%, a pressão de 10,34 MPa e o número de ciclos (3). A célula de extração utilizada apresentava um volume de 32,65 cm³.

Tabela 1 - Níveis dos dois fatores (T e St) do DCCR no estudo da otimização do rendimento do extrato de mesocarpo de babaçu

Parâmetros do processo de extração com etanol pressurizado					
Níveis					
Variáveis independentes	- α	-1	0	1	+ α
St (min)	2	3*	6	9*	10
T (°C)	60	64*	75	86*	90

$\alpha = 1,41$. *Valores ajustados para o equipamento.

Fonte: Própria autoria, 2018.

A escolha de T e St como fatores a serem estudados na otimização do processo com etanol pressurizado foi baseada em um estudo prévio deste grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2014), no qual se demonstrou que estas variáveis apresentaram influência significativa na obtenção de extratos de uma matriz vegetal.

O mesocarpo de babaçu triturado (15 g) foi empacotado no extrator de leito fixo. Juntamente com as amostras, pérolas de vidro com 0,3 mm de diâmetro foram acondicionadas no extrator, com o intuito de evitar compactação em função do pequeno diâmetro de partículas do mesocarpo de babaçu. O uso das pérolas de vidro misturadas à matriz possibilitou uma melhor dispersão do solvente e, por consequência, melhor extração.

III-2.6 Fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi analisado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência, de acordo com a metodologia estabelecida por Correia et al. (2011), com algumas modificações. Em tubos de ensaio foram pipetadas diluições do extrato em meio aquoso, adicionados 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:9), agitado e mantido por 5 min para reagir. Depois,

foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio (6,5%) e novamente agitados os tubos, que foram mantidos por 30 min em ausência de luz para reagir. Em seguida, foi feita a leitura a 765 nm (Biospectro, SP-22, Curitiba, BR). A amostra branco foi preparada de forma semelhante, com 1 mL de metanol substituindo o extrato. A curva de ácido gálico (10, 20, 40, 60 e 80 µg/g) foi preparado em metanol e a concentração de fenólicos totais (TPC) foi expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100g de pó do mesocarpo.

III-2.7 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão de disco

As determinações da atividade antimicrobiana utilizaram as cepas *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC 15442), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 4677) e *Salmonella* (ATCC 13076). Contudo, os extratos de babaçu apresentaram atividade antimicrobiana apenas para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

O perfil de suscetibilidade foi determinado pelo NCCLS (2003) baseado na difusão de discos de antimicrobianos em brain-heart infusion. Os discos impregnados com 20 µL de extrato etanólico do mesocarpo de babaçu, diluídos em etanol na proporção de 200 mg/ML, foram depositados sobre uma placa inoculada com microrganismo de interesse com o auxílio de uma pinça estéril. Em todas as placas igualmente foram adicionados controle positivo (disco contendo antibiótico ou antifúngico) e controle negativo (disco contendo 20µL de etanol, solvente no qual o extrato do mesocarpo de babaçu foi diluído).

Após o período de incubação em estufa bacteriológica por 24 h, a 37 °C, o diâmetro do halo de inibição foi medido e comparado com o diâmetro do halo de inibição dos controles positivos e negativos.

III-2.8 Análise estatística

Como as condições operacionais de extração de alguns extratos são definidas segundo um DCCR, as respostas são apresentadas por meio de análise de superfícies de respostas (ASR) com suas respectivas análises de variância (ANOVA), análise de efeitos principais das variáveis controladas no processo de extração e modelos preditivos de primeira e segunda ordem. Todo tratamento estatístico foi realizado com o auxílio do software Statistic 12.1 (Tibco, software, Califórnia, USA).

III-3 Resultados e Discussão

III-3.1 Caracterização da matéria-prima

O mesocarpo do babaçu tem uma composição majoritária de carboidratos $80,66 \pm 1,33$ g/100g de amostra, possui ainda uma quantidade representativa de proteína bruta $2,74 \pm 0,42$ g/100g de amostra e teor de fibra bruta $2,08 \pm 0,01$ g/100 g de amostra. Na literatura, são encontrados valores de carboidratos na farinha do mesocarpo de babaçu por volta de 52 g/100g (PAVLACK et al., 2007), inferior ao que foi encontrado neste estudo. A variação da composição centesimal é relacionada à matéria-prima e aos fatores de cultivo, extração, maturação, tipo e características do solo; portanto, estas variações são esperadas. Os polissacarídeos são os carboidratos de maior predominância no mesocarpo do babaçu e são amplamente utilizados na alimentação. A inserção da farinha do mesocarpo de babaçu na dieta humana ocorre de forma efetiva devido ao alto teor de carboidratos. Maniglia e Tápia-Blacido (2016) também avaliaram o mesocarpo de babaçu em solução aquosa e sua composição centesimal e obtiveram valores de $1,38 \pm 0,01$ g/100g de amostra e $1,72 \pm 0,15$ g/100g de amostra para proteína e fibra, respectivamente. Os valores obtidos pelos pesquisadores também são inferiores quando comparados ao presente estudo (Tabela 2). No entanto, ao comparar os valores do teor de cinza, aqueles obtidos por Maniglia e Tápia-Blacido (2016) são superiores ($1,13 \pm 0,12$ g/100 g de amostra) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados das análises de composição centesimal do mesocarpo de babaçu

Análises	Mesocarpo de babaçu (%)
Umidade	13,34
Cinzas	$1,10 \pm 0,01$
Fibra bruta	$2,08 \pm 0,01$
Lipídios	$0,08 \pm 0,02$
Proteína	$2,74 \pm 0,42$
Carboidratos	$80,66 \pm 0,40$

Os resultados foram obtidos em base seca.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Silva (2011) obteve teores de cinzas de $0,780 \pm 0,031$ g, proteínas de $7,36 \pm 0,11$ g/100 g, carboidratos de $72,20 \pm 1,05$ g/100g e fibra bruta de $2,820 \pm 0,061$ g, sendo os valores de cinzas e carboidratos inferiores aos encontrados neste estudo. O mesocarpo de babaçu utilizado neste trabalho apresentou umidade de 13,34%, valor inferior ao descrito na tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), a qual reporta o valor de 15,8%.

III-3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 1 é possível observar grânulos de amido entre outros componentes como fibras, proteínas e lipídeos, os quais formam aglomerados (ressaltados por círculos em vermelho). Pode-se avaliar em aspectos gerais que os grânulos de amido do mesocarpo de babaçu possuem uma forma oval sem ranhuras na sua estrutura, e, com isso, pode-se inferir que as microscopias obtidas neste estudo apresentam grande semelhança com as reportadas por Maniglia e Tapia-Blácido (2016), que descrevem uma estrutura dos amidos constituintes da farinha do mesocarpo de babaçu de aparência ovalada com componentes aglomerados.

Figura 1 - Micrografias eletrônicas de varredura do mesocarpo de babaçu

Fonte: Própria autoria, 2018.

Figura 2 - Micrografias do mesocarpo de babaçu pós extração PLE

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na Figura 2(A) (mesocarpo de babaçu após a PLE, ensaio 3, Tabela 4), é possível observar grânulos de amido com ranhuras e/ou seccionados, assim como uma estrutura em formato globular. Isto pode ter ocorrido devido à interação da matriz com o solvente a 86 °C – nesta temperatura provavelmente ocorreu o rompimento da estrutura fibrosa, permitindo assim a saída do amido. Do mesmo modo, a ruptura da parede celular das fibras pelo uso de altas temperaturas promoveu também a liberação dos compostos fenólicos presentes na amostra, o que pode estar relacionado ao alto rendimento global de extração em função de

temperaturas acima de 75 °C. A faixa de temperatura estudada possui condições que estão acima da faixa de gelatinização do amido (67 a 85 °C), descrita por Maniglia e Tápia-Blácido (2016). No presente estudo, evidenciou-se a gelatinização do amido na extração PLE quando a água foi utilizada como solvente, pois pode ser observada a formação de um gel, impossibilitando assim a extração acima de 70 °C.

Os resultados obtidos na análise da morfologia das partículas do mesocarpo de babaçu permitem inferir que, no processo de extração com etanol pressurizado à condição otimizada (PLE 3), a variável temperatura pode ter influenciado diretamente no rompimento da parede celular das fibras. Assim, foram disponibilizados o amido e o complexo amilose/amilopectina, favorecendo a formação de uma camada semelhante a um gel na extração com água pressurizada.

Na Figura 2(B) (mesocarpo do Babaçu após a PLE, ensaio 5, Tabela 4), também se pode observar nas micrografias que ocorreu o rompimento da estrutura fibrosa e a desnaturalização dos grânulos de amido.

Ao analisar as micrografias da Figura 2(C) (mesocarpo do Babaçu após a PLE, ensaio 11, Tabela 4), pode-se observar uma aglomeração de grânulos de amido envoltos com prováveis componentes, como estruturas fibrosas rompidas ou lipídios, o que evidencia que o processo de extração a elevadas temperaturas pode influenciar diretamente na aglomeração das partículas, pois quanto maior a estrutura das partículas e mais aglomeradas elas estiverem, maior será a energia necessária para a clivagem da estrutura (PÉREZ-PACHECO et al., 2014).

Em consequência das observações experimentais sobre a gelatinização da matéria-prima (torta) após a extração com etanol pressurizado devido à temperatura empregada, pode-se sugerir que este material, em decorrência da sua constituição ($\approx$ 80% de amido), tenha alto potencial de utilização no desenvolvimento de filmes (MANIGLIA; TÁPIA-BLÁCIDO, 2016).

III-3.3 Perfil de minerais

A constituição do perfil de minerais do mesocarpo de babaçu é escassa na literatura científica. Com isso, a avaliação completa da constituição em minerais desta matéria-prima irá contribuir também para o levantamento de dados que a possam caracterizar, auxiliando, assim, na produção de dados sobre uma matriz importante na alimentação humana e animal.

Tabela 3 - Perfil de Minerais da Farinha do Mesocarpo de Babaçu¹

Mineral	Resultados (mg/kg de farinha)
Cobre, mg	4,8 ($\pm$ 0,1)
Ferro, mg	7,6 ($\pm$ 0,4)
Fósforo, mg	274 ($\pm$ 1,0)
Manganês, mg	< 0,8
Potássio, mg	3.170 ($\pm$ 20)
Selênio, mg	< 1,6
Sódio, mg	9 ($\pm$ 2,0)
Zinco, mg	1,9 ($\pm$ 0,1)

¹Resultados expressos como média e desvio médio de uma duplicata.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na avaliação mineral, os elementos potássio, fósforo, sódio e ferro foram encontrados como os minerais majoritários na composição do mesocarpo de babaçu (Tabela 3), corroborando com o estudo de Naozuka et al. (2011).

Os minerais são essenciais para o correto funcionamento do corpo humano; deste modo, os valores de referência para sua ingestão são estabelecidos e periodicamente revisados a partir de novas descobertas. De acordo com esses parâmetros, os valores diários para adultos (homens e mulheres, de 19 a 70 anos) dos minerais avaliados são: Mn: 1,8 a 2,3 mg/dia; Zn: 8 a 11 mg/dia; Cu: 0,9 mg/dia; Fe: 8 a 18 mg/dia; Mg: 310 a 400 g/dia; Na: 1300 a 1500 mg/dia; e P: 700 mg/dia (BERTO et al., 2015). A partir destes parâmetros, pode-se inferir que o consumo da farinha do mesocarpo de babaçu pode gerar efeitos benéficos, já que esta matéria-prima pode ser considerada uma rica fonte de suplementação de minerais.

Vale ressaltar que o incentivo do consumo da farinha do mesocarpo de babaçu rica de minerais tais como Fe, Mn, Zn, Na, P e K, pode tornar-se uma ferramenta útil e de grande viabilidade para a redução da desnutrição e do desperdício de resíduos orgânicos com alto valor nutricional, no nordeste brasileiro (BERTO et al., 2015).

III-3.4 Densidade real, aparente e porosidade do leito

No processo de extração sólido-líquido, a caracterização do leito é fundamental na descrição do processo, pois em função do diâmetro das partículas, da densidade e da porosidade do leito, a transferência de massa ocorre. Neste processo, a distribuição do diâmetro médio das partículas do mesocarpo de babaçu dissolvidas em água resultou em partículas com diâmetro de $1,46 \mu\text{m} \pm 0,20$, como mostra a Figura 3. Neste tipo de análise, o material no qual a amostra será dispersa influencia os resultados, por isso, as partículas também foram avaliadas dissolvidas em etanol e vaselina. Na distribuição do tamanho de partículas dissolvidas em etanol, a média apresentou o valor de $9,326 \mu\text{m} (\pm 0,190)$, e nas partículas de mesocarpo de babaçu diluídas em vaselina, o valor médio foi de $7,756 \mu\text{m} (\pm$

0,190). Essa diferença pode ter ocorrido devido ao mesocarpo apresentar uma granulometria muito fina, inferindo assim uma tendência a aglomerar-se de maneiras diferentes em função do meio dispersante.

Segundo Oliveira et al. (2010), o diâmetro das partículas é relevante na avaliação da resistência interna da transferência de massa. Para aumentar o rendimento global da extração, a redução do diâmetro médio de partícula é favorável, pois proporciona um aumento na área superficial em contato com o solvente, o que diminui a distância que o soluto percorre do interior da partícula porosa para a superfície.

Figura 3 - Gráfico de dispersão de partículas do mesocarpo de babaçu

Fonte: Própria autoria, 2018.

A densidade real, aparente e a porosidade do leito de extração são $1,52 \pm 0,01$ g/cm³, $0,62 \pm 0,01$ g/cm³ e 0,41, respectivamente. A porosidade do leito para o mesocarpo de babaçu triturado mostrou que a relação entre a densidade aparente e real se mantém. Silva, Rocha-Santos e Duarte (2016) relataram que a alta porosidade do leito de extração reduz o contato entre o solvente e os compostos a serem extraídos, causando perda de eficiência do processo. No presente estudo foi verificado que a porosidade baixa promove um bom contato soluto/solvente, o que culmina em uma boa taxa de transferência de massa.

III-3.5 Rendimento da extração e otimização do processo

Os dados experimentais do rendimento dos extratos do mesocarpo de babaçu obtidos pelo emprego de etanol pressurizado estão apresentados na Tabela 4. Os rendimentos obtidos variaram de 0,79 a 2,95%.

O processo de extração com líquido pressurizado (PLE) foi otimizado em função de duas variáveis de processo, a temperatura (T) e o tempo de contato do solvente com a matriz em cada ciclo (St). Mantiveram-se como variáveis constantes o número de ciclos (C = 3) e o volume de solvente (SV = 100%). Foi estudada a influência destas duas variáveis no rendimento dos extratos e nas concentrações de fenólicos totais.

Ao avaliar estatisticamente os efeitos principais das variáveis T e St no rendimento dos extratos do mesocarpo, constatou-se que apenas a variável T teve influência sobre esta resposta. Pode-se observar que a variável St não apresentou influência significativa, mas a interação T × St foi significativa (Figura 4). Neste estudo, o etanol foi definido como solvente de extração, pois mesmo com baixos rendimentos, os extratos obtidos com etanol pressurizado apresentam altas concentrações de fenólicos totais (Tabela 4).

Tabela 4 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que mostra as variáveis (reais e codificadas) e sua influência no rendimento do extrato e na concentração de compostos fenólicos do mesocarpo de babaçu obtido com etanol pressurizado

Variáveis codificadas		Variáveis reais		Y (%)	CFT mgGAE/100g de mesocarpo de babaçu	
Ensaio	St	T	St (min)	T (°C)		
1	-1	-1	3	64	0,794	185,53
2	1	-1	9	64	1,255	326,56
3	-1	1	3	86	2,954	1.257,25
4	1	1	9	86	1,899	885,64
5*	0	0	6	75	1,943	949,79
6*	0	0	6	75	1,739	834,00
7*	0	0	6	75	1,799	851,67
8	-1,41	0	2	75	0,864	373,76
9	1,41	0	10	75	1,603	848,97
10	0	-1,41	6	60	0,882	482,28
11	0	1,41	6	90	1,850	1.168,64

*Pontos centrais do DCCR.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Os dados da análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem que descreve a influência de T e St para os extratos do mesocarpo de babaçu estão apresentados na Tabela 5. Mediante ao teste F, verifica-se que o modelo linear (Eq. 2) para o rendimento dos extratos de mesocarpo de babaçu foi significativo e preditivo, haja vista que o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior que F_{tabelado} (Tabela 5). Portanto, o modelo linear gerado é capaz de explicar 95% da variação dos dados. Além disso, o modelo apresenta um coeficiente de determinação $R^2 = 0,98$. O coeficiente significativo do modelo linear foi aquele

relacionado com a temperatura (T) e a interação de T × St. Pode-se observar também que a variável temperatura exerceu influência positiva no rendimento da extração; já a interação T × St apresentou uma interação baixa e negativa (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e St no rendimento do extrato do mesocarpio de babaçu obtido via PLE

Fonte: Própria autoria, 2018.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático ou de segunda ordem indicou que este modelo não foi significativo, visto que apresentou $F_{\text{calculado}}$ menor que o F_{tabelado} ; além disso, apresentou baixo coeficiente determinação $R^2 = 0,77$ (Tabela 5).

$$R = 52,0223^* + 2,0506St^* - 0,9610St^{2^*} - 0,1016T^* - 0,5260T^2 + 0,8575St \times T^* \quad (2)$$

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) dos modelos de primeira e segunda ordem para rendimento do extrato de mesocarpio de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	R^2
Modelo Linear						
Regressão	2,72	3	0,91			
Resíduo	0,06	3	0,02	44,92	9,28	0,98
Total	2,79	6	-			
Modelo Quadrático						
Regressão	3,10	5	0,62			
Resíduo	0,95	5	0,19	3,26	5,05	0,77
Total	4,05	10	-			

Coeficiente de determinação (R^2) = SQR/SQT; $F_{\text{cal}} = \text{QMR/QMr}$; *Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$.
Fonte: Própria autoria, 2018.

Os maiores rendimentos dos extratos do mesocarpo de babaçu foram obtidos a temperaturas elevadas, o que pode ser confirmado na análise da superfície de resposta gerada pelo modelo linear que evidencia a influência desta variável no rendimento. Nota-se, também, que o pico do rendimento foi obtido para baixos valores de St, o que se justifica pelo valor negativo da influência da interação entre elas ($T \times St$) (Figura 5).

Figura 5 - Superfície de resposta do modelo de primeira ordem para rendimento do extrato de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto

Fonte: Própria autoria, 2018.

Normalmente, quanto maior o tempo de contato entre o solvente e a matriz maior é o rendimento, mas para esta matéria-prima, o comportamento foi diferente. Provavelmente, o fato de o amido se gelatinizar em função da temperatura elevada dificulta a transferência de massa em virtude da compactação da farinha do mesocarpo de babaçu rico em amido, assim, menores tempos de contato entre o solvente e a matriz diminuem esta compactação e consequentemente a barreira à transferência de massa.

III-3.6 Compostos Fenólicos Totais (CFT) nos extratos da farinha do mesocarpo de babaçu

Os compostos fenólicos totais do mesocarpo de babaçu foram expressos em mgGAE/100g de amostra, e variaram de 185,53 a 1.257,25 mgGAE/100mg de extrato (Tabela 4). Estes valores são relativamente superiores ao encontrado por Vieira, Sousa e Lima (2011), que identificaram uma CFT de $98,31 \pm 2,3$ mgGAE/100mg de extrato etanólico. Estes resultados indicam a eficiência deste método de extração frente ao convencional, o que já era esperado, considerando os vários estudos recentes com chá verde (*Camellia sinensis*) e semente de noz (*Juglans regia* L.) (FECHTNER et al., 2018; KAMALI et al.,

2018), que empregam PLE na extração eficiente de compostos fenólicos de matrizes vegetais.

Sabe-se que muito da atividade antioxidante de fontes vegetais é derivada de seus compostos fenólicos e esta mesma relação pode ser atribuída ao mesocarpo do babaçu. Esta atividade será testada, em complementação a este trabalho, pelas análises da atividade anti-inflamatória deste extrato na avaliação *in vivo*, descritas no Capítulo VI.

Figura 6 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e St na concentração de fenólicos totais do extrato do mesocarpo de babaçu obtido via PLE

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na análise dos efeitos principais das variáveis T (°C) e St (min) na CFT expressa em mgGAE/100mg de extrato (Figura 6), pode-se observar que a variável T apresentou influência significativa e positiva, o que significa que para maiores valores de T no processo de extração PLE, maiores concentrações de compostos fenólicos serão obtidas. Os efeitos significativos do modelo linear são apresentados na Eq. 3 e avaliados pela ANOVA (Tabela 6), dados que sugerem que o modelo não pode ser considerado preditivo já que $F_{\text{calculado}}$ é menor que F_{tabelado} .

$$R = 51,2143^* + 4,0750St^* - 0,7650T + 1,7150St \times T \quad (3)$$

Na análise estatística do modelo de segunda ordem, constata-se também via ANOVA (Tabela 6) que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} . No entanto, o coeficiente de

determinação de $R^2 = 0,86$ pode ser considerado baixo, o que sugere que o modelo quadrático não possui um bom ajuste dos dados experimentais.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira e segunda ordem para a concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Modelo Linear						
Regressão	743870,00	3	247956,67			
Resíduo	86830,50	3	28943,50	8,57	9,28	0,90
Total	830700,50	6	-			
Modelo Quadrático						
Regressão	1059199,0	5	211839,8			
Resíduo	169342	5	33868,4	6,25	5,05	0,86
Total	1228541	10	-			
Coeficiente de determinação (R^2) = SQR/SQT; F _{cal} = QMR/QMr; *Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$. Fonte: Própria autoria, 2018.						

Embora nenhum dos modelos seja preditivo, os resultados (Tabela 4) indicam que elevadas temperaturas e baixos valores de St (tempo de contato do solvente com a amostra) apresentaram bons resultados e alta concentração de compostos fenólicos totais. Tais resultados foram confirmados pela análise de identificação e quantificação dos flavonoides da condição de maior rendimento e compostos fenólicos totais, PLE 3 (86 °C e 3 min), através das análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Confirma-se assim a presença dos compostos catequina, epicatecatequina e quercetina, descritas no Capítulo VI.

III-3.7 Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana dos extratos de mesocarpo de babaçu

No presente trabalho, a atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foi avaliada nas amostras de extratos de mesocarpo de babaçu para os 11 ensaios extraídos com etanol pressurizado (Tabela 7).

A ação antimicrobiana foi avaliada pela zona de inibição provocada pela adição do extrato do mesocarpo de babaçu nos discos que foram colocados sobre placas inoculadas com os diferentes micro-organismos, os quais foram testados. Esta avaliação e identificação da atividade antimicrobiana nos extratos do mesocarpo de babaçu, embora qualitativa, pode indicar sua futura utilização para este fim. É de grande importância para o Sistema Único de Saúde (SUS) e para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a produção de dados relacionados ao babaçu, pois há interesse desta planta na atenção primária à saúde, haja vista que os extratos, a farinha e demais componentes do coco de babaçu já são

amplamente utilizados na medicina popular sem registros de estudos científicos de caracterização desta planta, mecanismo de ação, toxicidade, letalidade, mortalidade, toxicidade reprodutiva e doses terapêuticas recomendadas.

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana medida pelo halo de inibição dos extratos do mesocarpo de babaçu extraídos via PLE

Micro-organismo	Ensaio	Halo Inibição (cm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Antibiótico cloranfenicol	2,50
	1	0,8
	2	-
	3	1,2
	4	0,7
	5	0,6
	6	0,6
	7	0,9
	8	0,9
	9	0,7
	10	0,8
	11	1,0
Micro-organismo	Ensaio	Halo Inibição (cm)
<i>Bacillus cereus</i>	Antibiótico cloranfenicol	2,20
	1	1,2
	2	-
	3	1,2
	4	0,8
	5	0,8
	6	0,6
	7	-
	8	0,8
	9	1,0
	10	0,9
	11	1,2

Fonte: Própria autoria, 2018.

Os extratos de mesocarpo de babaçu extraídos via PLE apresentaram capacidade de inibição apenas para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, como mostrado na Tabela 7. Para *Staphylococcus aureus* e para *Bacillus cereus*, o extrato obtido no ensaio 3 apresentou a maior zona de inibição, identificada pelo diâmetro do halo de inibição; esse extrato também apresentou o maior rendimento de extração (2,95%). Já a inibição do *Bacillus cereus* foi maior para os extratos oriundos dos ensaios 1, 3 e 11 (Tabela 7).

Os extratos de mesocarpo de babaçu não apresentaram efeito inibitório contra os micro-organismos *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella*. Os resultados obtidos na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana dos extratos do mesocarpo de babaçu, assim como no rendimento e na concentração de fenólicos totais, evidenciaram a influência de elevadas temperaturas e baixos valores de St (tempo de contato do solvente com a amostra) na atividade antimicrobiana, pois os extratos que apresentaram os maiores rendimentos também apresentam esse comportamento nesta

análise. No entanto, para confirmar e determinar a atividade antimicrobiana, mais estudos são necessários.

Na análise dos efeitos principais das variáveis T ($^{\circ}\text{C}$) e St (min) na atividade antimicrobiana expressa em halo de inibição (cm) de extrato para *Staphylococcus aureus* (Figura 7), pode-se observar que a variável St apresentou influência significativa e positiva, o que indica que para menores valores de St no processo de extração PLE, maiores halos de inibição para *Staphylococcus aureus* foram obtidos. Os efeitos significativos do modelo linear são apresentados na Eq. 4 e avaliados pela ANOVA (Tabela 8), dados que sugerem que o modelo pode ser considerado preditivo já que $F_{\text{calculado}}$ é maior que F_{tabelado} . Portanto, o modelo linear gerado é capaz de explicar 95% da variação dos dados. Além disso, o modelo apresenta um coeficiente de determinação $R^2 = 0,92$. O coeficiente significativo do modelo linear foi aquele relacionado com o St , a temperatura (T) e a interação entre as variáveis $T \times St$. Pode-se observar também que as variáveis St e T exerceram influência positiva na inibição do *Staphylococcus aureus*.

$$R = 0,6857^* - 0,6500St^* + 0,5500T^* + 0,1500St \times T \quad (4)$$

Figura 7 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e St na atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* do extrato do mesocarpo de babaçu obtido via PLE

Fonte: Própria autoria, 2018.

Os dados da análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem que descreve a influência de T e St para os extratos do mesocarpo de babaçu estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para a atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* dos extratos de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Modelo Linear						
Regressão	0,75	3	0,25			
Resíduo	0,06	3	0,02	12,50	9,28	0,92
Total	0,81	6	-			
Modelo Quadrático						
Regressão	0,60	5	0,12			
Resíduo	0,33	5	0,06	2,00	5,05	0,64
Total	0,93	10	-			

Coefficiente de determinação (R²) = SQR/SQT; F_{cal} = QMR/QMr; *Valores de F tabelado a p ≤ 0,05.

Fonte: Própria autoria, 2018.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático ou de segunda ordem (Eq. 5) indica que não foi significativo, visto que apresentou F_{calculado} menor que F_{tabelado} e baixo coeficiente determinação R² = 0,64 (Tabela 8).

$$R = 0,7006^* - 0,3966St^* - 0,01114St + 0,1016T^* + 0,3465T^2 + 0,1500St \times T^* \quad (5)$$

Os maiores halos de inibição para o microrganismo *Staphylococcus aureus* dos extratos do mesocarpo de babaçu foram obtidos quando menores valores de St (tempo de contato do solvente com a amostra) foram aplicados, o que pode ser confirmado na análise da superfície de resposta gerada pelo modelo linear que evidencia a influência desta variável no rendimento (Figura 8).

Figura 8 - Superfície de resposta do modelo de primeira ordem para atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* do extrato de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto

Fonte: Própria autoria, 2018.

A atividade antimicrobiana do mesocarpo do babaçu é resultante da presença de compostos fenólicos totais (CFT), pois ao avaliar a atividade dos extratos para os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, pode ser observado que a atividade antimicrobiana apresentou melhores resultados nos extratos que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos totais. Com isso, é possível afirmar que os extratos etanólicos de mesocarpo de babaçu possuem atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, considerando que, de acordo com Kamrani et al. (2007) e Yakoub et al. (2018), as bactérias gram-positivas são ligeiramente mais sensíveis aos extratos etanólicos de extratos de semente de noz (*Juglans regia* L.), o que também foi observado neste trabalho, pois os extratos de mesocarpo de babaçu apresentaram atividade antimicrobiana apenas para bactérias gram-positivas.

Na análise dos efeitos principais das variáveis T (°C) e St (min) na atividade antimicrobiana expressa por halo de inibição de extrato para *Bacillus cereus* (Figura 9), pode-se observar que a variável St apresentou influência negativa, o que significa que para maiores valores de St no processo de extração PLE, menor será a atividade antimicrobiana obtida.

Os efeitos significativos do modelo linear são apresentados na Eq. 6 e avaliados pela ANOVA (Tabela 9), dados que sugerem que o modelo não pode ser considerado preditivo já que $F_{\text{calculado}}$ é menor que F_{tabelado} e o coeficiente de regressão é 0,78.

$$R = 0,6571^* - 0,8000St + 0,4000T^2 + 0,4000St \times T \quad (6)$$

Figura 9 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e St na atividade antimicrobiana para *Bacillus cereus* do extrato do mesocarpo de babaçu obtido via PLE

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira e segunda ordem para a atividade antimicrobiana para *Bacillus cereus* dos extratos de mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol absoluto

Estatística						
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Modelo Linear						
Regressão	1,16	3	0,39	3,54	9,28	0,78
Resíduo	0,34	3	0,11			
Total	1,50	6	-			
Modelo Quadrático						
Regressão	0,98	5	0,20	1,17	5,05	0,53
Resíduo	0,86	5	0,17			
Total	1,84	10	-			

Coeficiente de determinação (R^2) = SQR/SQT ; $F_{\text{cal}} = QMR/QMr$; *Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na análise estatística do modelo de segunda ordem, constata-se via ANOVA (Tabela 9) que o $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o F_{tabelado} . O coeficiente de determinação também evidencia que o modelo quadrático não é preditivo, pois o valor de $R^2 = 0,53$ considerado baixo sugere que o modelo quadrático não possui um bom ajuste dos dados experimentais.

III-4 Conclusões

As extrações PLE em batelada ou ciclos, que operam a alta pressão e temperatura, podem proporcionar rendimentos elevados e extratos de alta qualidade quando comparados aos métodos tradicionais.

Ao avaliar os efeitos principais das variáveis de processo (St e T e a interação entre elas, St $\times$ T) no rendimento das extrações do mesocarpo de babaçu via extração com etanol pressurizado, foi observado que a variável T exerceu influência positiva neste parâmetro, contribuindo para maiores rendimentos e maior concentração de compostos fenólicos nos extratos. Pode-se observar também que, embora a variável St não tenha apresentado influência no processo, a interação T $\times$ St foi significativa no rendimento dos extratos. Para o rendimento da extração, o modelo linear gerado conseguiu prever o comportamento do processo em função da T, e os maiores rendimentos dos extratos do mesocarpo de babaçu foram obtidos a temperaturas elevadas.

A concentração de compostos fenólicos nestes extratos foi bastante elevada, principalmente quando comparada ao mesmo extrato obtido via método convencional. Compostos fenólicos possuem atividade antioxidante e, por isso, os extratos do mesocarpo de babaçu tem alto potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos, já que compostos fenólicos têm sido empregados na indústria cosmética e farmacêutica. Outra propriedade refere-se à ação anti-inflamatória também descrita em literatura como uma ação dos flavonoides (catequinas), que foi confirmada pelo experimento de atividade anti-inflamatória em modelo murino. O estudo preliminar qualitativo sobre a atividade antimicrobiana dos extratos indicou uma provável ação contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Este resultado evidencia que os extratos do mesocarpo de babaçu produzidos via etanol pressurizado são ricos em atividades biológicas.

III- Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processos nº 2016/13460-8 e nº 2015/04729-0 - pela bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processo nº 306317/2016-8.

IV- Referências

- ALONSO-SALCES, R. M. et al. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 933, n. 1-2, p. 37-43, 2001.
- AOAC. **Method 920.39**. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2016.
- _____. **Method 923.39**. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2016.
- _____. **Method 925.45b**. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, 2016.
- _____. **Method 960.32**. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Gaithersburg, 2016.
- _____. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. AOAC, Arlington, 2007.
- BELANDRIA, V. et al. Pressurized-fluid extraction of cafestol and kahweol diterpenes from green coffee. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 37, p. 145-152, 2016.
- BELWAL, T. et al. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 100, p.82-102, 2018.
- BERTO, A. et al. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. **Food Research International**, Kidlington, v. 77, p. 441-449, 2015.
- CARRAZZA, L. R.; ÁVILA, J. C. C.; SILVA, M. L. **Manual tecnológico de aproveitamento integral de fruto e da folha do babaçu**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2012.
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 7, p. 8615-8627, 2012.
- CORREIA, A. A. S. et al. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 609-615, 2011.
- DE OLIVEIRA, N. A. et al. Green coffee extracts rich in diterpenes—Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. **Journal of Food Engineering**, London, v. 224, p. 148-155, 2018.
- DE OLIVEIRA, P. A. A. et al. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction—Characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 95, p. 137-145, 2014.
- EMBRAPA. Departamento de fusão de tecnologia. **Babaçu, Programa nacional de pesquisa**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1984. v. 1, 89 p.

FECHTNER, S. et al. Molecular insights into the differences in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL-1 β signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Maryland Heights, v. 329, p. 112-120, 2017.

HOWARD, L.; PANDJAITAN, N. Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 73, n. 3, p. C151-157, 2008.

INSTITUTO DE ESTUDOS E PESQUISAS AGROAMBIENTAIS E ORGANIZAÇÕES SUSTENTÁVEIS - IEPAGRO. **Programa de ações a jusante do médio e baixo rio madeira: unidade de processamento do coco de babaçu**. Rondoniense: Instituto de Estudos e Pesquisa do Agronegócio, 2010. p. 1-24.

KAMALI, H. et al. A comparison between pressurized hot water and pressurized liquid extraction for optimizing phenolic and antioxidants capacity of the wooden layer between of walnut seed. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 133, p. 535-541, 2018.

KAMRANI, Y. Y. et al. Inhibitory effects of a flavonoid-rich extract of *Pistacia vera* hull on growth and acid production of bacteria involved in dental plaque. **International Journal of Pharmacology**, Faisalabad, v. 3, n. 3, p. 219-226, 2007.

LIU, J. et al. Two new farnesyl phenolic compounds with anti-inflammatory activities from *Ganoderma duripora*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 263, p. 155-162, 2018.

LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Morphological, thermal and mechanical properties of ramie crystallites–reinforced plasticized starch biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 63, n. 2, p. 198-204, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.027>.

MANIGLIA, B. C.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 55, p. 47-55, 2016.

NAOZUKA, J. et al. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 1667-1672, 2011.

OLIVEIRA, A. L. et al. Modelling of high-pressure phase equilibrium in systems of interest in the food engineering field using the Peng-Robinson equation of state with two different mixing rules. **Journal of Food Process Engineering**, Hoboken v. 33, n. s1, p. 101-116, 2010.

_____. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora*). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 145, p. 522-529, 2014.

PAVLACK, M. C. M. et al. Aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 1, p. 7-24, 2007.

PÉREZ-PACHECO, E. et al. Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swarts Seeds. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 101, p. 920-927, 2014.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, London, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.

SHUAI, H. E. et al. Extraction of resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* by supercritical CO₂ with different solubilizers. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Victoria Island, v. 9, n. 1, p. 12-18, 2015.

SILVA, A. P. S. **Caracterização físico-química e toxicológica do pó de mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart):** subsídio para o desenvolvimento de produtos. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 76, p. 40-51, 2016.

TEIXEIRA, M. A. Babaçu - A new approach for an ancient Brazilian. **Biomass and Bioenergy**, Kidlington, v. 32, n. 9, p. 857-864, 2008.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** – TACO. 2. ed. Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.

VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 71, p. 55-64, 2015.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; LIMA, A. Compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato etanólico do mesocarpo do coco babaçu (*Orbignya speciosa*). **Nutrire**, Viçosa, v. 36, n. supl., p. 167-167, 2011.

YAKOUB, A. R. B. et al. Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 118, p. 206-213, 2018.

CAPÍTULO IV: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda (28 dias) em ratos do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico enriquecido em beta-sitosterol

Naila Albertina de Oliveira¹, Thaisa Meira Sandini², Elaine Cristina Lanzoni Martinelli³, Claudia Madalena Cabrera Mori³, Maria Martha Bernardi^{3,5}, Alessandra Lopes de Oliveira¹ Heidge Fukumasu^{4*}

¹LTAPPN, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

²Departamento de fisiologia, Universidade Saskatchewan, Saskatoon, Canadá. ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia, Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX), Pirassununga, São Paulo, Brasil. ⁴Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ⁵Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: fukumasu@usp.br. Telefone: +55 1935656864.

IV- Resumo

O óleo de amêndoas de babaçu é rico em β -sitosterol e neste trabalho tal óleo foi obtido por extração com fluido supercrítico (SFE) com dióxido de carbono (CO_2) como solvente. A meta aqui foi avaliar a segurança e possíveis efeitos tóxicos em ratos da exposição aguda e subaguda ao óleo de amêndoas de babaçu. A administração oral aguda de dose única deste óleo (2.000 mg/kg) não resultou em quaisquer sinais de toxicidade ou mortalidade em ratos de ambos os sexos. Para o estudo subagudo (28 dias), 40 ratos foram utilizados, os quais receberam diferentes doses de extrato de óleo das amêndoas de babaçu (1, 3 e 5 mg/kg). Avaliou-se a variação de peso, consumo de alimento, atividade geral em labirinto em cruz elevada, peso dos órgãos e análises histológicas. Nos estudos referentes às três diferentes doses supracitadas, os resultados mostraram diminuição no peso corporal no grupo de 5 mg/kg e um aumento no consumo de ração. Na avaliação bioquímica, houve redução nos níveis de albumina no grupo tratado com 1 mg/kg e aumento nos níveis de ureia no grupo tratado com 3 mg/kg do óleo. Não houve alterações com significado biológico nas avaliações hematológicas e histológicas nos estudos agudo e subagudo. Os resultados obtidos sugerem que o óleo das amêndoas de babaçu pode ser utilizado no desenvolvimento de um fitoterápico para o tratamento da obesidade e/ou como suplemento alimentar.

Palavras-chave: Toxicidade Efeitos tóxicos. *Orbignya phalerata*. Fitoesterol.

IV-1 Introdução

A palmeira do babaçu é nativa do Brasil e pode ser encontrada principalmente no estado do Maranhão. Estima-se que essas espécies tenham maior incidência na região de Cocais, naquele estado. Os frutos produzidos pelas palmeiras são constituídos por epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa. O óleo de babaçu provém da amêndoa, a qual representa mais de 60% de matéria oleaginosa (BARBOSA et al., 2012). O óleo de babaçu é rico em triacilgliceróis, fosfolípidos, esteróis, tocoferóis e fitoesteróis. Os principais ácidos graxos são: ácido láurico (44%), ácido oleico (17%), ácido mirístico (17%), ácido palmítico (8%), ácido cáprico (6%), ácido caprílico (5%), ácido esteárico (4,5%) e ácido linoleico (2%) (BARBOSA et al., 2012).

No que diz respeito ao uso terapêutico, o óleo das amêndoas de babaçu é também usado por via oral ou mesmo sob a forma de banhos de acento para o tratamento de vulvovaginite. A aplicação tópica de produtos do babaçu (óleo) também é comum para o tratamento de fase I e fase II de feridas cutâneas (DE SOUSA et al., 2013). Sabe-se que o óleo das amêndoas de babaçu possui baixas concentrações de compostos fenólicos e tocoferóis; dessa forma, o efeito anti-inflamatório é atribuído à presença de ácido láurico e laurato de glicerol (REIS et al., 2017). Os ácidos graxos presentes no óleo das amêndoas de babaçu apresentam além da atividade anti-inflamatória, a capacidade de estimular a angiogênese, e, por isso, é utilizado no processo de cicatrização de feridas (REIS et al., 2017).

Segundo Cornelio-Santiago et al. (2017), a técnica de extração com fluido supercrítico é amplamente utilizada em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, para a extração de compostos oriundos de plantas medicinais com nutrientes, antioxidantes, anticancerígenos e propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Além disso, é utilizado na extração de produtos como aromas, descafeinação e extração de ativos farmacêuticos (LANG; WAI, 2001; SAHENA et al., 2009; SIHVONEN et al., 1999). A extração com CO₂ supercrítico oferece várias vantagens operacionais em relação aos métodos de extração convencionais, pois utiliza solventes supercríticos, com propriedades físico-químicas diferentes, como densidade, difusividade, viscosidade e constante dielétrica (HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006).

Protocolos de avaliação de toxicidade aguda e subaguda são utilizados para avaliar, classificar e rotular corretamente substâncias a partir do potencial tóxico ou letalidade de um composto (VALADARES, 2006).

Ao avaliar um possível candidato a medicamento proveniente de um ativo sintético ou um fitoterápico, etapas importantes são indispensáveis para garantir o uso seguro em seres humanos (CAVALCANTE et al., 2007), tais como uma avaliação botânica,

caracterização de compostos ativos, estudo farmacêutico, ensaios pré-clínicos conduzidos em animais de laboratório (camundongos, ratos, coelhos, cães, porcos e/ou primatas). Posteriormente, ensaios clínicos em humanos são necessários para definir o mecanismo de ação e atividade farmacêutica a ser atribuída ao composto de interesse. No entanto, esta fase de avaliação por meio de ensaios clínicos deve ser realizada apenas se existirem evidências e indicações de estudos de segurança e eficácia bem definidos. É imprescindível avaliar os riscos por testes toxicológicos visando definir o uso do produto, bem como a possível via de administração, dose letal, sinais de toxicidade e dose terapêutica (LAPA et al., 2007).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda e subaguda do óleo de babaçu extraído com CO₂ supercrítico em ratos, com o intuito de verificar a segurança deste óleo e seu potencial como fitoterápico.

IV-2 Material e métodos

IV-2.1 Animais

Foram utilizados 52 ratos Wistar, machos (N = 46) e fêmeas (N = 6), com 60 dias de idade no início dos experimentos, provenientes do biotério do Centro de Toxicologia Veterinária (CEPTOX), Pirassununga/SP, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas, em que a fase clara foi iniciada diariamente às 6 h da manhã. As condições de temperatura (20 ± 4 °C) foram controladas por meio de ar condicionado (LG®, São Paulo, BR) e a umidade relativa ($55 \pm 10\%$) foi controlada por meio de termo-higrômetro (Incoterm®, São Paulo, BR). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (41 × 34 × 16 cm), com tampas de inox (Beiramar® - São Paulo, BR), mantidas em estantes ventiladas (Alesco® - Campinas, BR), em sala climatizada, com controle de temperatura e umidade. Foram alocados 2 animais por gaiola, favorecendo assim o contato visual entre eles devido à divisão metálica alocada nas caixas. A alimentação dos animais consistiu em peletes de ração (Nuvilab CR-1, fornecidos pela Nuvilab Londrina, BR) comercial autoclavada para roedores e água filtrada, em condições *ad libitum* durante todo o experimento. O grupo de tratamento recebeu 2.000 mg/kg de óleo de amêndoas de babaçu; para a administração do óleo. O volume foi calculado a partir do peso de cada animal, sendo 1 mL/100g de peso do animal. A habituação às condições do biotério dos animais foi realizada durante um período de 20 dias anteriores ao início da administração do óleo das amêndoas de babaçu. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com as orientações éticas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FZEA/USP,

representado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (CEUA/FZEA), sob a aprovação do protocolo nº 2679030216 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP, representado pela CEUA/FMVZ, sob aprovação do protocolo nº 6703030217, seguindo as diretrizes internacionais (NRC, 2010).

O óleo das amêndoas de babaçu (86,6 mg β -sitosterol/100 g de óleo) utilizado no presente estudo foi obtido via extração com CO₂ supercrítico nas condições de 25 MPa e 40 °C.

IV-2.2 Teste de Toxicidade Oral Aguda

A toxicidade oral aguda foi realizada de acordo com as diretrizes da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico 423 (OECD, 2001a). Para este experimento, foram utilizadas ratas, nulíparas e não gestantes, pois, em geral, são mais sensíveis que os machos (LIPNICK et al., 1995) e ratos machos adultos. Seis ratas e seis ratos saudáveis foram alocados em dois grupos de 3 animais cada. O grupo de tratamento recebeu 2.000 mg/kg de óleo de amêndoa de babaçu, sendo a dose calculada de acordo com o peso do animal. O volume administrado foi de 1 mL/100g de peso corporal. Por outro lado, o grupo controle recebeu óleo de milho por gavagem com volume de 1 mL/100g de peso corporal (PC). Antes da administração, os animais tiveram livre acesso à água e à comida. As observações após o tratamento avaliaram a mortalidade, mudanças no comportamento, pele, olhos, pelos e atividade somatomotora. O peso corporal individual foi mensurado diariamente durante o período de observação (14 dias).

Os animais foram observados e avaliados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos após a administração do óleo das amêndoas de babaçu e periodicamente (duas vezes ao dia) durante as primeiras 24 horas, a fim de identificar os possíveis sinais toxicológicos, tais como, pieloreção, alterações de comportamento, porfirina e vômito. Pelo menos duas vezes ao dia, todos os animais foram inspecionados em busca de sinais de morbidade e mortalidade. Ao final do período de observação (14 dias), foi realizada a eutanásia e antes deste procedimento, os ratos foram anestesiados com dose intraperitoneal de cloridrato de quetamina (Rhobifarma, Hortolândia, BR) (0,9 mL/kg PC) e xilazina (Bayer, São Paulo, BR) (0,5 mL/kg PC). Antes da superdosagem de anestésicos, foram coletadas amostras de sangue para as análises bioquímicas (creatinina, ureia, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (AP), lactato desidrogenase (LD), albumina, glicose, triglicerídeos, proteínas totais, colesterol total e lipoproteína de alta densidade (HDL) (Item IV-2.5), as quais foram realizadas em todos os animais. Foram também realizadas análises

macroscópicas e, em seguida, a necropsia do coração, fígado, pulmões, rins, baço e timo, bem como o cálculo do peso relativo (peso do órgão g/PC x 100). Fragmentos representativos dos órgãos citados acima foram fixados em formol (Dinâmica Química, Diadema, BR) e embebidos em parafina para análise histopatológica com corte de 0,5 µm.

IV-2.3 Toxicidade Subaguda (28 dias)

O estudo da dose repetida de toxicidade oral aos 28 dias foi realizado de acordo com as diretrizes da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico 407 (OECD, 2008). Ratos Wistar machos foram distribuídos em quatro grupos de 10 animais. Um grupo foi designado como controle e recebeu óleo de milho, e ratos de outros grupos receberam doses diferentes (1, 3 e 5 mg/kg de PC) do óleo das amêndoas de babaçu. Os ratos foram tratados diariamente às 7 da manhã por gavagem durante 28 dias. Os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos após os tratamentos e pelo menos duas vezes ao dia durante o período experimental, a fim de identificar possíveis sinais de toxicidade, sinais de morbidade e mortalidade. O volume administrado de óleo das amêndoas de babaçu foi de 1 mL/100g de PC. O consumo de ração foi mesurado a cada 3 dias, assim como o peso corporal, para a melhor condição de volume de tratamento. No final do tratamento, todos os animais foram anestesiados como mencionado acima (Item IV-2.2). Amostras de sangue foram coletadas para análise hematológica e bioquímica. O coração, o fígado, os pulmões, os rins, o baço e o timo foram removidos e os pesos relativos (peso do órgão g/PC x 100) foram calculados.

IV-2.4 Procedimentos comportamentais

A avaliação de comportamento foi realizada em todos os animais dos experimentos de toxicidade aguda e do estudo de doses repetidas. Os estudos comportamentais em roedores são importantes para avaliar o desenvolvimento de comportamentos aversivos, agressivos, estresse e ansiedade nestes animais (BELZUNG; CRUSIO; GERLAI, 1999; LISTER, 1990; MOSAFERI et al., 2015; SANDINI, 2012), podendo expressar sinais de neurotoxicidade.

IV-2.4.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto é amplamente utilizado em roedores para avaliar comportamentos ligados à emocionalidade (BERNARDI; SOUZA; PALERMO-NETO, 1981; ARCHER, 1973), exploração (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1979), atividade motora e

ansiedade do animal (MOSAFERI et al., 2015; PRUT; BELZUNG, 2003; TREMML et al., 1998; WALSH; CUMMINS, 1976).

O aparato utilizado nos experimentos foi uma arena circular de madeira (diâmetro de 97 cm x 27 cm de altura) com fundo dividido em 25 áreas de tamanhos semelhantes. Tais partes foram dispostas em três círculos concêntricos, divididas por 16 segmentos de reta.

Na análise de campo aberto, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena entre 7 e 11 h no período da manhã. Cada sessão teve duração de 5 min, observando-se simultaneamente os seguintes parâmetros:

- 1) Frequência de locomoção: uma unidade de medida corresponde à colocação das quatro patas dentro do espaço delimitado pelas quatro linhas que compõem uma subdivisão do chão da arena;
- 2) Frequência de levantar: uma unidade de medida corresponde ao movimento do animal apoiar-se nas patas posteriores, com a cabeça dirigida para cima e com o corpo perpendicular em relação ao chão da arena, apoiando-se ou não nas paredes do campo aberto;
- 3) Duração de imobilidade: nesta análise, a duração em segundos da ausência total de movimentos foi registrada;
- 4) Defecação: ao final dos cinco minutos de observação foi contado o número de bolos fecais;
- 5) Micção: ao final dos cinco minutos de observação foi contado o número de poças de urina.

Os registros das frequências de locomoção, de levantar e da imobilidade foram feitos por um cronômetro. Entre um animal e outro, a arena foi limpa com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior.

IV-2.4.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado é um dos modelos mais usados para detectar atividade ansiolítica de drogas (HOGG, 1996). Este teste baseia-se na aversão natural de roedores aos espaços abertos e foi validado tanto em ratos (PELLOW et al., 1985), como em camundongos (LISTER, 1987; STEPHENS et al., 1986).

O labirinto é constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 x 40 cm), arrançados de forma que os braços de mesmo tipo fiquem em oposição entre si, ligados por uma área central (10 x 10 cm). O aparato é feito de madeira, o piso dos braços pintado em cinza escuro fosco revestido de acrílico lavável com altura de 50 cm do chão.

Os ratos foram colocados, individualmente, no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e durante 5 min foram observados o número de entradas nos braços abertos (EBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TBA). Também foi avaliado o número de entradas nos braços fechados (EBF), o tempo de permanência nos braços fechados (TBF), a frequência em que o animal apresenta o comportamento de esticar a cabeça para fora dos limites da plataforma dos braços abertos (comportamento de risco), a mobilidade e o tempo de centro.

O registro de entradas nos braços abertos e fechados foi realizado por intermédio de contador manual e o tempo de permanência nos braços do labirinto cronometrado. Entre as observações de cada animal, o labirinto foi limpo com solução de álcool a 5%.

IV-2.5 Análise hematológica e bioquímica sérica

Os animais foram submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca, a qual foi efetuada com seringas (BD, Plastipak, Curitiba, BR) e agulhas (BD, Plastipak, Curitiba, BR), ambas descartáveis.

A análise de hemograma foi realizada com uma alíquota de sangue com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (BD, Plastipak, Curitiba, BR); essa alíquota foi analisada no aparelho automático Horiba®ABX (ABC vet equipamento de contagem de célula, Montpellier, FR) para a emissão dos valores de cada componente analisado da amostra.

O número total de células do sangue circulante foi quantificado com o auxílio da câmara de Neubauer. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço, os quais foram fixados em lâminas, coradas com corante de Rosenfeld (Dinâmica Química, Diadema, BR). Durante o procedimento de coloração para a contagem de células, as lâminas foram colocadas em um suporte de coloração e recobertas com 20 gotas do corante Rosenfeld. Após 3 minutos, foram adicionadas 20 gotas de água destilada e, em seguida, a mistura (água/corante) foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 3 min; subsequentemente, a lâmina foi lavada com água corrente e seca em posição vertical. Os esfregaços foram analisados em microscópio de luz (objetiva de 100x).

As análises bioquímicas foram realizadas com outra alíquota de sangue, que foi mantida em temperatura ambiente por 45 min para que ocorresse a coagulação. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min e armazenado em microtubos (Eppendorf, São Paulo, BR), a uma temperatura de 4 °C em refrigerador (Brastemp, Flex, São Paulo, BR) até a realização das dosagens. As amostras foram lidas no equipamento em um período de até 48 h após a coleta.

A atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamil transferase (GGT), e os níveis de ureia,

creatinina, glicose, colesterol total, triglicérides, proteína total (PT), albumina (Bioclin, Belo Horizonte, BR) dos animais controle e experimentais foram dosados pelo sistema automatizado de bioquímica CELM SBA 200 (CELM, Barueri, BR) do laboratório do CEPTOX.

IV-2.6 Necropsia e histopatologia

Todos os animais do estudo foram submetidos à necropsia completa e detalhada, incluindo exame cuidadoso dos tecidos corporais. O fígado, os rins, o timo, o baço, os pulmões e o coração de todos os animais foram coletados e pesados, sendo calculados os pesos relativos. Todos os tecidos foram preservados em formalina a 10% tamponada neutra (Dinâmica, Química, Diadema, BR) e, após 24 h, as amostras foram transferidas para etanol a 70% (Dinâmica, Química, Diadema, BR). Em seguida, os tecidos foram embebidos em parafina, processados, cortados em cortes de 5 µm e corados com hematoxilina (Leica, Wetzlar, GE) e eosina (Leica, Wetzlar, GE) para posterior exame histopatológico.

IV-2.7 Análise estatística

Para análise estatística, foi empregado o programa estatístico GraphPad Prism 7.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados foi utilizado o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via ou, quando existiram dois fatores (tempo e tratamento) para serem avaliados, foi empregada a RAMANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Para as análises de consumo de ração e ganho de peso, foram analisadas pela ANOVA de 3 vias (gênero, tratamento e dias de observação) seguida do pós-teste de Tukey. Para análise não paramétrica, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn. Em todas as análises efetuadas, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

IV-3 Resultados

IV-3.1 Toxicidade oral aguda

A administração de uma dose oral única de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu em fêmeas e machos não resultou em nenhum sinal clínico de toxicidade, tais como pielooereção e morte, nos animais durante o período de observação (14 dias) (OECD, 2001b).

Para testar a hipótese de que o óleo poderia afetar diferentemente o consumo de ração nos dois sexos, foi utilizada a ANOVA de três vias (gênero, tratamento e dias de avaliação como fatores) em machos e fêmeas. Considerando os resultados do consumo de ração, a ANOVA de três vias revelou interações significantes entre gênero e tratamento ($p = 0,0016$), dias de observação ($p < 0,0001$) e tratamento ($p < 0,0009$) e interação entre os demais fatores. Ao avaliar o consumo de ração entre machos e fêmeas, pode-se observar diferença de consumo entre gênero e tratamento.

No ganho de peso, a ANOVA de três vias não revelou interações significantes entre gênero ($p = 0,2416$), assim como também não foram observadas interações significantes nos parâmetros isolados, tais como dias de observação ($p = 0,061$), tratamento ($p = 0,9076$); bem como nenhum efeito entre os fatores dias x gênero ($0,3171$), nem nos fatores dias x tratamento ($p = 0,2399$); além disso, nenhum efeito foi identificado entre os fatores gênero x tratamento e entre os fatores dias x gênero x tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da análise estatística da variação do consumo de ração entre ratas e ratos após administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu

Variação de ratos machos e fêmeas	Consumo de ração			Ganho de peso		
	dF	F (DFn, DFd)	p	dF	F (DFn, DFd)	p
Dias	4	F (4, 4) = 40,95	$p < 0,0001^{****}$	3	F (3, 3) = 2,704	$p = 0,0618$
Gênero	1	F (1, 4) = 306,7	$p < 0,0001^{****}$	1	F (1, 3) = 1,424	$p = 0,2416$
Tratamento	1	F (1, 4) = 12,91	$p = 0,0009^{***}$	1	F (1, 3) = 0,01368	$p = 0,9076$
Dias x Gênero	4	F (4, 4) = 0,3479	$p = 0,8439$	3	F (3, 3) = 1,224	$p = 0,3171$
Dias x Tratamento	4	F (4, 4) = 2,487	$p = 0,0587$	3	F (3, 3) = 1,475	$p = 0,2399$
Gênero x Tratamento	1	F (1, 4) = 11,33	$p = 0,0017^{**}$	1	F (1, 3) = 0,0005473	$p = 0,9815$
Dias x Gênero x Tratamento	4	F (4, 4) = 2,37	$p = 0,0686$	3	F (3, 3) = 1,383	$p = 0,2658$
Residual	40	-	-	32	-	-
Total	-	-	-	-	-	-

ANOVA de três fatores (gênero, tratamento, dias), seguida pelo pós-teste de Tukey. dF = graus de liberdade; F = Relação de F; p = probabilidade; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na Tabela 1 podem ser observados os resultados da ANOVA de três vias, mostrando as diferenças entre os fatores, gênero (machos e fêmeas), tratamento e dias de observação, bem como a interação entre os mesmos.

A Figura 1 ilustra os parâmetros avaliados no campo aberto em ratos machos e fêmeas que receberam 2.000 mg/kg de óleo das amêndoas de babaçu. Com relação à frequência de locomoção (Figura 1A), a RAMANOVA de duas vias apontou diferenças significantes quanto ao tratamento ($p = 0,0309$) e o gênero dos animais ($p = 0,0040$), mas sem interação entre os fatores. O pós-teste de Bonferroni apontou aumento da frequência de locomoção nas fêmeas tratadas com 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu ($p < 0,05$) em relação grupo controle (Figura 1).

Figura 1 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO₂ supercrítico em ratos e ratas no comportamento observado no campo aberto

(A) Frequência de locomoção, (B) Bolo Fecal, (C) Micção, (D) Frequência de levantar. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão; $n = 03$ ratos por grupo. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Bonferroni; * $p < 0,05$ em relação aos ratos machos
Fonte: Própria autoria, 2018.

Ao analisar a frequência de defecação (Figura 1B), a ANOVA de duas vias não apontou diferenças significantes quanto ao tratamento ($p = 0,3706$), havendo diferença significativa entre o gênero dos animais ($p < 0,0015$), sem interação entre os fatores ($p = 0,1525$) (Figura 1B). O pós-teste de Bonferroni apontou aumento no número de bolos fecais nos machos tratados com 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

As frequências de levantar (Figura 1D) e micção (Figura 1C) não apresentaram diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os grupos, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de atividade geral (em frequência) observados em ratas e ratos no campo aberto, no 12º dia após a exposição ou não (grupo controle) dos animais após administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu

Parâmetros	Sexo	Grupo controle (n = 3)	2.000 mg/kg (n = 3)
Bolo fecal (unidade)	♀	0,33 ± 0,57	0,68 ± 1,15
	♂	3,68 ± 1,15	2,33 ± 0,57**
Micção (unidade)	♀	13,33 ± 7,23	11,00 ± 2,64
	♂	9,68 ± 5,51	14,33 ± 3,21
Tempo de Locomoção (s)	♀	258,33 ± 16,16	239,33 ± 12,42
	♂	219,33 ± 36,70	162,00 ± 28,16*
Frequência de levantar	♀	26,66 ± 7,23	27,66 ± 13,01
	♂	28,33 ± 8,38	30,00 ± 5,29

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle); ^aKruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn (para dados não paramétricos %): *p < 0,05, **p < 0,01 *versus* grupo controle; n = número de animais por grupo

Fonte: Própria autoria, 2018.

Os parâmetros observados no labirinto em cruz elevado em ratos machos e fêmeas da mesma idade são mostrados na Figura 2. A análise de variância (ANOVA) de duas vias aplicada aos resultados mostrou que não houve diferença significativa quando se avaliou a EBF (número de entrada nos braços fechados quanto ao tratamento (Figura 2C); p = 0,8356). Porém, foi possível observar diferença significativa entre os gêneros (p = 0,0170), sem interação entre os fatores (p = 0,5380) (Figura 2).

Figura 2 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO₂ supercrítico em ratos e ratas no teste do labirinto em cruz elevada

(A) Entrada nos braços abertos (% EBA), (B) Tempo de braços abertos (%TBA), (C) Entrada nos braços fechados (EBF), (D) Número de cruzamentos centro (BA+BF). Os dados são expressos como média ± erro padrão; n = 03 ratos por grupo. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Bonferroni; *p < 0,05 em relação aos ratos machos

Fonte: Própria autoria, 2018.

Parâmetros tais como % EBA, % TBA, Tempo de B.A, Tempo de B.F, número de cruzamentos no centro (B.A.+ B.F.) (Figura 2 D) e comportamento de risco não apresentaram diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado, de ratas e ratos no 13º dia após a exposição ou não (grupo controle) dos animais após administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu

Parâmetros	Sexo	Grupo controle (n = 3)	2.000 mg/kg (n = 3)
% Entrada BA ^{a 1}	♂	15,47 ± 20,02	22,10 ± 3,64
	♀	16,19 ± 14,66	16,66 ± 14,34
% Tempo BA ^{a 2}	♂	14,40 ± 21,03	33,40 ± 21,47
	♀	8,46 ± 9,83	8,70 ± 7,98
Tempo (s) BA	♂	28,00 ± 40,15	105,00 ± 96,77
	♀	18,66 ± 20,74	21,66 ± 18,87
Frequência de entrada BF	♂	11,33 ± 1,52	12,66 ± 1,15*
	♀	7,66 ± 2,52	7,00 ± 4,35
Tempo (s) BF	♂	180,00 ± 54,02	179,00 ± 37,32
	♀	219,00 ± 42,88	246,00 ± 49,50
Número de cruzamentos centro (BA + BF) ³	♂	3,00 ± 2,00	7,66 ± 2,51
	♀	4,33 ± 3,78	3,00 ± 3,46
Comportamento de risco	♂	3,00 ± 2,00	2,33 ± 0,57
	♀	1,00 ± 1,00	1,00 ± 0,00

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ *versus* grupo controle); ^aKruskal- Wallis seguida do pós-teste de Dunn (para dados não paramétricos %): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *versus* grupo controle; n = número de animais por grupo; BA = braços abertos; BF = braços fechados; ¹ % EBA = % de entradas nos braços abertos; ² % TBA = % de tempo nos braços abertos; ³ número total de cruzamentos entre braços abertos e fechados

Fonte: Própria autoria, 2018.

Ao avaliar os animais de ambos os gêneros tratados com a dose única de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu no comportamento observado no campo aberto, foi possível identificar uma diminuição significativa na duração da frequência de locomoção, para ratos machos e fêmeas, quando comparados com o grupo controle. No entanto, dentre os animais tratados com o óleo, os ratos do sexo masculino apresentaram uma maior redução deste parâmetro quando comparados às fêmeas.

No presente experimento, a análise estatística mostrou diferenças significativas na defecação entre os grupos controle e experimental e entre machos e fêmeas, em que machos apresentaram redução neste parâmetro comparado às fêmeas.

Com relação aos parâmetros hematológicos (Tabelas 3 e 4), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Além disso, foram analisados diferentes parâmetros bioquímicos que englobam avaliação de toxicidade em diferentes sistemas como renal, hepático, pulmonar e cardíaco. Apesar de haver algumas diferenças estatísticas entre os grupos em parâmetros isolados, como aumento de glicose em fêmeas ($p < 0,05$) e machos ($p < 0,05$) (Tabela 5), não houve sinais evidentes de toxicidade. Foi observado

também um aumento de AST ($p < 0,05$) nas fêmeas tratadas com 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu.

Tabela 3 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO₂ supercrítico em ratas e ratos nos parâmetros hematológicos (série vermelha)

Parâmetros hematológicos	Sexo	Controle (n = 3)	2.000 mg/kg (n = 3)	Lima et al., 2014*
Leucócitos (10 ³ /μL)	♀	3,23 ± 0,33	2,93 ± 0,35	2,30 - 9,90
	♂	4,23 ± 0,75	4,40 ± 0,20	3,41 - 13,70
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	♀	6,32 ± 0,24	6,05 ± 0,31	8,20 [#]
	♂	7,34 ± 0,13	7,13 ± 0,90	8,16 [#]
Hemoglobina (g/dL)	♀	12,97 ± 0,12	12,64 ± 0,26	11,10 - 17,10
	♂	13,90 ± 0,11	13,93 ± 0,05	10,20 - 17,80
Hematócrito (%)	♀	34,57 ± 1,23	33,27 ± 1,49	27,20 - 48,50
	♂	34,57 ± 1,23	33,27 ± 1,49	23,80 - 51,90
Plaquetas (10 ³ /μL)	♀	624,70 ± 71,75	602,00 ± 36,23	760 - 1313
	♂	623,70 ± 14,25	616,00 ± 32,47	727 - 1351
VCM (μm ³)	♀	55,00 ± 0,57	55,00 ± 0,57	45,00 - 56,70
	♂	52,00 ± 0,00	52,67 ± 0,33	43,60 - 52,60
HCM (pg)	♀	20,60 ± 0,58	21,03 ± 0,71	16,20 - 22,80
	♂	18,87 ± 0,43	19,40 ± 0,25	15,90 - 17,00
CHCM (g/dL)	♀	37,63 ± 0,93	38,23 ± 1,07	30,40 - 43,90
	♂	36,23 ± 0,76	37,07 ± 0,64	31,60 - 37,80

N= número de animais; ♀ = fêmeas e ♂ = machos. Dados expressos como média ± erro médio. Teste t de *Student* ($p < 0,05$). Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM), Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

*LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

[#]TACONIC, 2005.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda de 2.000 mg/kg do óleo da amêndoa de babaçu extraído com CO₂ supercrítico em ratas e ratos nos parâmetros hematológicos (série branca)

Parâmetros hematológicos	Sexo	Grupo controle (n = 3)	2.000 mg/kg (n = 3)	Lima et al., 2014*
Monócito	♀	00,00 ± 00,00	1,00 ± 0,57	1,00 - 13,50
	♂	2,00 ± 1,00	1,66 ± 1,66	1,00 - 15,20
Linfócito	♀	86,67 ± 1,76	82,00 ± 2,64	30,10 - 95,00
	♂	82,67 ± 2,40	80,00 ± 4,35	43,10 - 93,70
Neutrófilos	♀	13,33 ± 1,76	17,33 ± 2,18	3,00 - 46,20
	♂	15,33 ± 2,84	18,33 ± 3,18	4,00 - 49,90

N= número de animais; ♀=fêmeas e ♂=machos. Dados expressos como média ± erro médio. Teste t de *Student* ($p < 0,05$)

*LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 5 - Efeitos da administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico nos parâmetros bioquímicos de ♀=fêmeas e ♂=machos

Parâmetros bioquímicos	Controle (n = 3) ♀	2.000 mg/kg (n = 3)	Controle (n = 3) ♂	2.000 mg/kg (n = 3)	Lima et al., 2014*
Aspartato aminotransferase (U/L)	166,70 ± 4,05	214 ± 50,5*	196,30 ± 25,62	229,70 ± 13,64	54 - 192 ^{&}
Alanina aminotransferase (U/L)	83,00 ± 5,85	103,00 ± 20,26	63,67 ± 7,12	69,33 ± 3,66	51 - 116
Gama glutamiltransferase (U/L)	1,00 ± 0,57	3,80 ± 1,09	1,00 ± 0,57	3,80 ± 1,09	2 - 5
Fosfatase alcalina (U/L)	83,00 ± 5,86	103,00 ± 20,26	70,33 ± 7,31	128,70 ± 14,25	51 - 116
Lactato desidrogenase (LDH) (U/L)	1740,00 ± 238,80	1590,00 ± 221,70	2668,00 ± 206,20	2774 ± 92,73	-
Proteínas totais (g/dL)	6,83 ± 0,14	6,30 ± 0,20	6,06 ± 0,20	6,33 ± 0,23	5,0 - 7,7
Albumina (g/dL)	4,46 ± 0,15	3,90 ± 0,26	3,42 ± 0,12	3,34 ± 0,09	1,3 - 3,8
Globulina (g/dL)	0,83 ± 0,06	0,77 ± 0,14	0,83 ± 0,06	0,77 ± 0,14	2,1 - 5,9
Glicose (mmol/L)	163,70 ± 9,82	300,30 ± 113,40*	177,00 ± 30,00	173,30 ± 0,88**	53 - 257 [@]
Triacilgliceróis (mmol/L)	87,33 ± 15,90	96,00 ± 18,52	120,00 ± 24,17	104,70 ± 18,76	23 - 138
Colesterol (mg/dL)	106,70 ± 19,20	241,30 ± 75,36	86,00 ± 21,39	96,33 ± 3,38*	54 - 96
Colesterol HDL (mg/dL)	45,00 ± 4,58	36,13 ± 3,83	45,00 ± 4,58	36,13 ± 3,83	-
Ureia (mg/dl)	54,00 ± 2,64	62,00 ± 5,85	60,67 ± 2,40	58,33 ± 2,33	24 - 49
Creatinina (mg/dL)	0,61 ± 0,03	0,70 ± 0,11	0,62 ± 0,04	0,62 ± 0,01	0,28 - 1,10

Dados expressos como média ± erro padrão da média. Teste t de *Student*; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle

*LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

& MORAILLON, R.; LEGEAY, Y.; BOUSSARIE, D.; SÉNÉCAT, O. **Manual Elsevier de Medicina Veterinária**. Elsevier Brasil: Rio de Janeiro, 2013.

@GIKNIS, M. L. A. **Clinical laboratory parameters for Crl:WI(Han)**. Wilmington: Charles River, 2008.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Ao fim dos 14 dias, foi realizada necropsia em todos os animais e não houve achados dignos de nota em nenhum animal. O tratamento também não mostrou efeito sobre o peso relativo dos órgãos timo ($p > 0,05$), coração ($p > 0,05$), pulmão ($p > 0,05$), rins ($p > 0,05$), baço e fígado em machos e fêmeas (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeitos da administração aguda da dose de 2.000 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico no peso relativo dos órgãos

Peso relativo dos órgãos	Sexo	Controle (n = 3)	2000 mg/kg (n = 3)	Taconic, 2005 [#]
Fígado (g)	♀	3,81 ± 0,10	4,01 ± 0,28	2,9
	♂	3,55 ± 0,10	3,31 ± 0,07	2,75
Coração (g)	♀	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,00	0,31
	♂	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,00	0,31
Baço (g)	♀	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,22
	♂	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,17
Rins (g)	♀	0,64 ± 0,02	0,71 ± 0,03	0,75
	♂	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,00	0,79
Pulmões (g)	♀	0,54 ± 0,01	0,59 ± 0,09	0,51
	♂	0,44 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,44
Timo (g)	♀	0,13 ± 0,00	0,12 ± 0,01	-
	♂	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,01	-

N= número de animais; ♀=fêmeas e ♂=machos. Peso relativo de órgão = (peso do órgão/peso do animal) × 100. N= número de animais por grupo = 3 ratos. Dados expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA seguida do teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

[#] Taconic, 2005.

Fonte: Própria autoria, 2018.

IV-3.2 Toxicidade subaguda (28 dias) em ratos machos

Quando analisado o consumo de ração (Figura 3A) dos animais tratados com o óleo das amêndoas de babaçu durante 28 dias, a RAMANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,0001$) e nos dias de observação ($p < 0,0001$), contudo sem interação entre os grupos e os tratamentos ($p = 0,1165$). O consumo de ração (g) diminuiu no 3º dia ($p < 0,05$) apenas nos animais do grupo que recebeu 5 mg/kg. Pode-se observar também que o consumo aumentou no 6º ($p < 0,0001$), 9º ($p < 0,001$), 12º ($p < 0,0001$), 15º ($p < 0,0001$), 18º ($p < 0,0001$), 21º ($p < 0,001$), 24º ($p < 0,0001$) e 28º ($p < 0,0001$) dias de tratamento em ratos que receberam 1 mg/kg. Ratos que receberam 3 mg/kg apresentaram aumento significativo do consumo de ração nos dias 6 ($p < 0,001$), 9 ($p < 0,01$), 12 ($p < 0,001$), 15 ($p < 0,01$), 18 ($p < 0,01$) e 28 ($p < 0,01$) de tratamento, quando comparados ao grupo controle (Figura 3A).

Figura 3 - Efeitos da administração subaguda (repetida) das doses de 1, 3 e 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico sobre o consumo de ração e a variação de peso corpóreo em ratos expostos ao óleo durante 28 dias de tratamento comparados ao grupo controle

(A) Consumo de ração, (B) Ganho de peso. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão; $n = 08$ ratos por grupo; RAMANOVA (fatores: tratamento e dia de exposição) seguidos pelo teste post hoc de Bonferroni; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus grupo controle

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na análise do ganho de peso corporal (g) (Figura 3B), a RAMANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa com relação aos tratamentos ($p = 0,8220$), porém houve diferença significativa nos dias de tratamento ($p < 0,0001$), sem interação entre os grupos e o tratamento ($p = 0,6218$). O pós-teste de Bonferroni apontou diminuição no peso corporal nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 28 ($p < 0,05$), nos ratos tratados com 5 mg/kg de óleo da amêndoa de babaçu, bem como também ocorreu redução no 24º dia ($p < 0,05$) nos animais dos grupos tratados com 1 e 3 mg/kg (Figura 3).

A Tabela 7 mostra os parâmetros avaliados no teste do Campo Aberto dos animais expostos ao óleo das amêndoas de babaçu por 28 dias. O teste de Kruskal Wallis apontou diferença significativa na frequência de locomoção ($p = 0,0287$); o pós-teste de Dunn mostrou aumento deste parâmetro nas doses de 1 e 3 mg/kg ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Além disso, também houve diferenças significantes na frequência de levantar ($p < 0,0230$); o pós-teste de Dunnett mostrou aumento deste parâmetro nas doses de 1 e 3 mg/kg ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Os

demais parâmetros, tais como bolo fecal, micção, tempo de centro e tempo de locomoção não apresentaram diferenças significantes.

Tabela 7 - Parâmetros de atividade geral (em frequência) de ratos observados no campo aberto, no 26º dia após administração das doses de 1, 3 e 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico durante 28 dias ou não (grupo controle)

Parâmetros	Controle (n = 12)	1 mg/kg (n = 12)	3 mg/kg (n = 10)	5 mg/kg (n = 10)
Bolo fecal (unidade)	3,10 ± 0,90	2,70 ± 0,83	3,50 ± 0,90	2,40 ± 0,54
Micção (unidade)	4,20 ± 1,44	4,75 ± 1,71	5,30 ± 1,29	5,90 ± 1,11
Tempo de Centro (s)	8,00 ± 1,43	9,66 ± 2,86	5,66 ± 1,11	5,55 ± 1,11
Tempo de Locomoção (s)	84,40 ± 12,45	94,33 ± 14,26	106,70 ± 14,29	111,90 ± 13,15
Frequência de levantar	17,80 ± 2,53	29,56 ± 2,52*	27,80 ± 3,27*	24,90 ± 2,44
Tempo de imobilidade (s)	162,10 ± 19,16	137,00 ± 12,11	118,50 ± 17,11	128,80 ± 18,38

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle). n = número de animais por grupo

Fonte: Própria autoria, 2018.

Os parâmetros observados no labirinto em cruz elevado dos animais expostos ao óleo das amêndoas de babaçu por 28 dias são mostrados na Tabela 7.1. O teste de Kruskal Wallis apontou diferenças significantes entre os grupos quando se avaliou a frequência de entrada nos braços fechados (p < 0,0459); o pós-teste de Dunn mostrou aumento desse parâmetro nos animais do grupo que recebeu 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu (p < 0,05) com relação ao grupo controle.

Tabela 7.1 - Parâmetros de atividade geral (em frequência) observados em ratos no labirinto em cruz elevado, no 27º dia após administração das doses de 1, 3 e 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico durante 28 dias ou não (controle)

Parâmetros	Controle (n = 12)	1 mg/kg (n = 12)	3 mg/kg (n = 10)	5 mg/kg (n = 10)
% Entrada BA ¹ (EBA)	22,84 ± 6,96	23,74 ± 6,95	15,20 ± 5,15	28,67 ± 3,34
% Tempo BA ² (TBA) ^a	13,86 ± 4,98	8,80 ± 2,42	9,33 ± 4,92	19,72 ± 7,52
Frequência de entrada BA	1,00 ± 0,38	1,66 ± 0,50	1,20 ± 0,48	2,55 ± 0,55
Tempo (s) BA	35,60 ± 15,03	24,78 ± 7,11	22,90 ± 11,60	49,78 ± 19,41
Frequência de entrada BF	3,63 ± 0,78	6,44 ± 1,15	6,00 ± 0,81	7,55 ± 1,09*
Tempo (s) BF	242,00 ± 15,21	237,10 ± 10,68	233,10 ± 15,19	208,40 ± 22,57
Frequência de levantar ^a	17,80 ± 2,53	29,50 ± 2,86*	32,91 ± 5,90*	24,60 ± 3,17
Comportamento de risco ^a	1,81 ± 0,69	2,77 ± 0,70	2,00 ± 0,78	4,22 ± 0,95

Os dados expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle). ^aKruskal- Wallis seguida do pós-teste de Dunn (para dados não paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01 *versus* grupo controle). n = número de animais por grupo; BA = braços abertos; BF = braços fechados; ¹ % EBA = % de entradas nos braços abertos; ² % TBA = % de tempo nos braços abertos

Fonte: Própria autoria, 2018.

Nos parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade subaguda durante 28 dias do óleo das amêndoas de babaçu, houve diferença significativa nos níveis de leucócitos ($p = 0,0097$); o pós-teste de Dunnett apontou redução nos níveis de leucócitos em ratos que receberam a dose de 3 mg/kg ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (Tabela 8, série vermelha e Tabela 9, série branca). No entanto, esse parâmetro permaneceu dentro dos limites normais para ratos nessa faixa etária (8 a 16 semanas) (GIKNIS, 2008).

Tabela 8 - Parâmetros hematológicos (série vermelha) de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1,3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias

Parâmetros hematológicos	Controle (n = 12)	1 mg/kg (n = 12)	3 mg/kg (n = 10)	5 mg/kg (n = 10)	Lima et al., 2014
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$6,20 \pm 0,31$	$6,00 \pm 0,38$	$5,04 \pm 0,25^*$	$6,58 \pm 0,27$	3,41 - 13,70
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	$8,12 \pm 0,15$	$7,87 \pm 0,19$	$8,22 \pm 0,11$	$7,96 \pm 0,10$	8,16 [#]
Hemoglobina (g/dL)	$14,72 \pm 0,18$	$12,84 \pm 1,45$	$15,02 \pm 0,20$	$14,62 \pm 0,16$	10,20 - 17,80
Hematócrito (%)	$43,14 \pm 0,71$	$42,33 \pm 0,90$	$45,47 \pm 1,55$	$42,51 \pm 0,49$	23,80 - 51,90
Plaquetas ^a ($10^3/\mu\text{L}$)	$653,00 \pm 30,83$	$642,00 \pm 11,07$	$608,80 \pm 12,33^*$	$666,90 \pm 19,54$	727 - 1351
VCM (μm^3)	$58,18 \pm 0,22$	$53,71 \pm 0,35$	$53,90 \pm 0,23$	$53,50 \pm 0,34$	43,60 - 52,60
HCM (pg)	$18,15 \pm 0,17$	$16,67 \pm 1,37$	$55,08 \pm 24,38$	$18,36 \pm 0,12$	15,90 - 17,00
CHCM (g/dL)	$34,16 \pm 0,18$	$33,63 \pm 0,15$	$33,95 \pm 0,21$	$34,41 \pm 0,16$	31,60 - 37,80

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM), Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). N= número de animais por grupo = 8 ratos machos. ANOVA de uma via ($p < 0,05$) e pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. ^aKruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus grupo controle

*LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

[#]TACONIC, 2005.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 9 - Parâmetros hematológicos (série branca) de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1, 3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias

Parâmetros hematológicos	Controle (n = 12)	1 mg/kg (n = 12)	3 mg/kg (n = 10)	5 mg/kg (n = 10)	Lima et al., 2014*
Monócito	$0,63 \pm 0,20$	$0,00 \pm 0,00$	$1,22 \pm 0,52$	$1,10 \pm 0,43$	1,00 - 15,20
Linfócito	$83,64 \pm 1,24$	$77,38 \pm 3,47$	$80,67 \pm 2,76$	$80,80 \pm 1,67$	43,10 - 93,7
Basófilo	$00,00 \pm 00,00$	$0,12 \pm 0,12$	$0,14 \pm 0,14$	$00,00 \pm 00,00$	0,00 - 0,10
Neutrófilos	$15,09 \pm 1,22$	$20,63 \pm 2,82$	$17,56 \pm 2,35$	$17,80 \pm 1,58$	4,00 - 49,90
Eusínófilo	$0,63 \pm 0,20$	$0,75 \pm 0,49$	$0,55 \pm 0,33$	$0,30 \pm 0,21$	0,00 - 3,60

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. N= número de animais por grupo = 8 ratos machos. ANOVA de uma via ($p < 0,05$) e pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

*LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, a análise estatística ANOVA apontou diferenças significantes na albumina sérica ($p = 0,0074$). O pós-teste de Dunnett apontou redução nos níveis de albumina em ratos que receberam a dose de 1 mg/kg ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle.

Na avaliação da ureia em níveis séricos, a análise de variância (ANOVA) demonstrou diferenças significantes ($p < 0,001$). O pós-teste de Dunnett apontou aumento deste parâmetro nos animais que receberam a dose de 3 mg/kg, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados podem evidenciar um possível efeito de hormese nos animais tratados com o óleo das amêndoas de babaçu. Os resultados mostraram redução nos níveis de proteína total em ratos que receberam a dose mais alta, além da diminuição nos níveis séricos de albumina e globulina de ratos tratados com 1 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (Tabela 10).

A avaliação dos parâmetros bioquímicos, tais como AST, ALT, GGT, FA, LDH, glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, ureia e creatinina não mostraram diferenças significantes entre os grupos na análise estatística (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros bioquímicos de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1, 3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias

Parâmetros bioquímicos	Controle (n = 12)	1 mg/kg (n = 12)	3 mg/kg (n = 10)	5 mg/kg (n = 10)	Giknis, 2008*
Aspartato aminotransferase (U/L)	144,70 ± 2,11	149,60 ± 3,02	149,60 ± 4,03	145,50 ± 4,53	63 - 175
Alanina aminotransferase (U/L)	54,90 ± 1,68	57,89 ± 3,75	49,20 ± 2,48	66,40 ± 7,94	19 - 48
Gama glutamiltransferase (U/L)	1,09 ± 0,36	2,00 ± 0,37	1,10 ± 0,34	1,50 ± 0,30	1 - 6 ^s
Fosfatase alcalina (U/L)	156,80 ± 12,86	153,30 ± 22,37	134,00 ± 15,63	114,70 ± 8,05	36 - 131
Lactato desidrogenase (LDH) (U/L)	1738,00 ± 37,44	1635,00 ± 32,84	1664,00 ± 27,01	1649,00 ± 40,87	272 - 1961
Proteínas totais (g/dL)	6,43 ± 0,17	7,00 ± 0,18	7,04 ± 0,22	6,41 ± 0,21	5,6 - 7,6
Albumina (g/dL)	1,268 ± 0,02	1,170 ± 0,03*	1,286 ± 0,03	1,174 ± 0,02	3,6 - 4,7
Globulina (g/dL)	5,16 ± 0,18	5,83 ± 0,20	5,75 ± 0,23	5,27 ± 0,22	1,8 - 2,5
Glicose (mmol/L)	175,00 ± 9,92	172,60 ± 15,88	156,40 ± 10,15	174,30 ± 10,13	106 - 184
Triacilgliceróis (mmol/L)	88,91 ± 11,75	68,44 ± 10,21	106,90 ± 11,52	74,30 ± 9,19	27 - 160
Colesterol (mg/dL)	68,45 ± 6,33	57,11 ± 8,12	71,20 ± 8,85	76,10 ± 8,96	35 - 95
Colesterol HDL (mg/dL)	45,56 ± 5,17	45,13 ± 4,19	47,67 ± 3,87	44,11 ± 4,15	-
Ureia (mg/dl)	39,18 ± 1,77	45,00 ± 2,37	48,30 ± 1,70*	36,60 ± 1,05	10,7 - 20
Creatinina (mg/dL)	0,62 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,54 ± 0,05	0,3 - 0,6

Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. N= número de animais por grupo = 8 ratos. ANOVA de uma via (p < 0,05) e pós-teste de Dunnet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001

*GIKNIS, M. L. A. **Clinical laboratory parameters for Crl:WI(Han)**. Wilmington: Charles River, 2008.

^sLIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 11 - Peso relativo dos órgãos (fígado, coração, baço, rins, pulmões e timo) de ratos expostos a diferentes doses de óleo de amêndoas de babaçu (1, 3 e 5 mg/kg) comparados com o grupo controle durante 28 dias

Peso relativo dos órgãos	Controle (n = 8)	1 mg/kg (n = 8)	3 mg/kg (n = 8)	5 mg/kg (n = 8)	Taconic, 2005*
Fígado	3,18 ± 0,05	3,21 ± 0,20	3,19 ± 0,07	3,14 ± 0,08	2,75 ± 0,00
Coração	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,007	0,30 ± 0,00
Baço	0,22 ± 0,009	0,22 ± 0,009	0,21 ± 0,005	0,22 ± 0,006	0,17 ± 0,00
Rins	0,60 ± 0,01	0,64 ± 0,02	0,61 ± 0,01	0,59 ± 0,01	0,65 ± 0,00
Pulmões	0,53 ± 0,05	0,50 ± 0,04	0,46 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,44 ± 0,00
Timo	0,075 ± 0,004	0,084 ± 0,007	0,071 ± 0,004	0,087 ± 0,007	-

Os dados foram expressos em média ± erro médio. N=número de animais por grupo = 8 ratos machos. Estes dados foram analisados pela ANOVA de uma via ($p < 0,05$) e pós-teste de Bonferroni,

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

*TACONIC, 2005.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Em relação ao peso relativo dos órgãos (g/100g PC), a análise estatística não mostrou diferenças significantes no peso do fígado, coração, baço, rins, pulmão e timo em comparação com o grupo controle (Tabela 11).

IV-4 Discussão

O óleo das amêndoas de babaçu é amplamente utilizado em cosméticos e na medicina popular. Este trabalho constatou a ausência de toxicidade em 2.000 mg/kg e possíveis efeitos tais como a aceleração do metabolismo celular destes animais, haja vista que os animais tratados com 3 doses (1, 3 e 5 mg/kg do óleo das amêndoas de babaçu) durante 28 dias apresentaram redução de peso e aumento no consumo de ração.

Não foram observadas mortes ou tampouco alterações clínicas que pudessem sugerir um quadro de intoxicação aguda. De fato, a análise do ganho de peso e consumo de ração não indicou diferenças significantes no ganho de peso dentro dos grupos de machos e de fêmeas, porém, diferenças relativas ao sexo foram detectadas. É fato conhecido que machos, por terem maior massa muscular, apresentam maior peso quando comparados às fêmeas.

Verificou-se aumento na frequência de locomoção de fêmeas tratadas com o óleo em relação ao grupo controle. A atividade geral é um índice para avaliar alterações comportamentais nos animais, não só por fisiológica e genética, mas também por interferências toxicológicas (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003). De acordo com Broadhurst (1957), este efeito observado pode estar relacionado à diferença de gêneros, considerando que as fêmeas são menos emotivas e tem um comportamento exploratório maior quando comparadas aos ratos machos. Logo, este comportamento da fêmea é

utilizado em estudos de toxicidade de substâncias com potencial tóxico e no desenvolvimento de novos medicamentos devido aos hormônios femininos (estrógeno e progesterona), que impedem o sistema de metabolização de medicamentos no retículo endoplasmático liso. Como consequência, quantidades mais altas da substância permanecem no organismo, aumentando assim o potencial tóxico de tais substâncias.

A defecação é uma ferramenta útil para avaliar o nível de emocionalidade de um animal (DENENBERG, 1969). Uma vez que ratos machos tem maior índice de emocionalidade que fêmeas, poderia se explicar este aumento de defecação nos machos por esta diferença (MASUR; SCHUTZ; BOERNGEN, 1980). Além disso, em experimentos de toxicidade, substâncias de potencial farmacológico, como o óleo de babaçu, podem produzir alterações na mobilidade intestinal dos animais e/ou taxas de defecação de animais (RAMOS; MORMÈDE, 2006). Essas evidências podem explicar o aumento de bolos fecais em machos. Contudo, não é possível afirmar que este efeito no comportamento dos machos está diretamente relacionado à administração do óleo das amêndoas de babaçu. Sugere-se que o β -sitosterol possa ter causado uma redução dos níveis de testosterona nos machos; porém, mais estudos são necessários para confirmar e correlacionar este efeito ao óleo.

Assim, o dimorfismo sexual observado neste experimento é um parâmetro importante em estudos de toxicologia. Perante o aumento da frequência de locomoção nas fêmeas e menor defecação dos machos, evidenciou-se que as ratas apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com óleo de babaçu.

O teste do labirinto em cruz elevado foi descrito a partir de estudos realizados na década de 50; sua proposta inicial é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, evidenciando um conflito de aproximação/esquiva (MONTGOMERY, 1952). Posteriormente, Pellow et al. (1985) afeiçoaram o modelo para ratos, sendo este amplamente utilizado. Experimentos farmacológicos apontaram que a administração de agentes ansiolíticos produz aumento na exploração dos braços abertos, indicando diminuição dos níveis de ansiedade do animal (PELLOW et al., 1985). No presente estudo, foi possível observar nas fêmeas um aumento significativo do número de entradas nos braços fechados do labirinto, embora os parâmetros % EBA e % TBA não tenham apresentado diferença estatística.

Também foi possível observar que as fêmeas apresentaram um aumento na atividade exploratória quando comparadas com os machos, indicando, assim, redução nos níveis de ansiedade e, dessa forma, corroborando o resultado encontrado no teste do campo aberto.

Embora o óleo de babaçu não tenha modificado o comportamento de ratos e ratas submetidos ao teste de labirinto em cruz elevada, pode-se observar uma tendência de maior tempo de permanência dos machos nos braços fechados do aparato, quando comparados às fêmeas. Estas diferenças também podem ser explicadas pelo fato de que fêmeas

apresentam menor ansiedade que machos, penetrando e permanecendo mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevada que machos (JOHNSTON; FILE, 1991).

Tomando-se em conjunto os dados comportamentais, pode-se concluir que o óleo de babaçu não produziu efeitos neurotóxicos, evidenciando-se apenas efeitos relativos ao gênero, em que fêmeas foram mais susceptíveis que machos.

A atividade locomotora dos animais machos e fêmeas foi também avaliada no campo aberto. Durante tal avaliação, pode-se observar que tanto machos como fêmeas mostraram preferência pela zona periférica, uma vez que permaneceram a maior parte do tempo da análise comportamental nesta área do aparato. Este comportamento é considerado normal, pois ambientes abertos são naturalmente aversivos para os roedores. Assim, os animais têm preferência pela zona periférica do campo aberto (PRUT; BELZUNG, 2003). Os resultados obtidos no presente estudo também não mostraram diferenças significantes na frequência de levantar, descartando, assim, qualquer deficiência motora entre os animais avaliados quando comparados com o grupo controle.

Na análise da necropsia, para peso dos órgãos e histologia não foram detectadas diferenças entre os grupos controles e experimentais. Estes resultados apontam que o tratamento com a dose testada de óleo de babaçu não mostrou achados macroscópicos no peso dos órgãos e comportamento. Assim, pode-se propor que, na dose testada de 2.000 mg/kg, o óleo de babaçu não apresentou efeitos sobre o peso corpóreo dos animais, sugerindo ausência de toxicidade na dose estudada.

Os resultados referentes ao estudo subagudo mostraram redução no ganho de peso corpóreo do 3º ao 28º dia após a administração do óleo nos animais do grupo de 5 mg/kg de óleo. Porém, ressalta-se que o consumo diário normal para um rato adulto pode variar de 18 a 35 g de ração por dia (MORAILLON et al., 2013). Essa variação pode ter ocorrido devido ao pequeno número de animais utilizado neste experimento e a variabilidade individual.

O sistema hematopoiético é um dos parâmetros mais sensíveis para avaliar a toxicidade de drogas em humanos e animais (RAHMAN, 2007). Embora o presente estudo tenha apontado alterações na avaliação das plaquetas e dos leucócitos, estes parâmetros hematológicos e os demais parâmetros avaliados de todos os animais tratados com o óleo também não apresentaram alterações que diferissem da faixa de normalidade estabelecida por Giknis (2008), Lima et al. (2014), Moraillon et al. (2013) e Taconic (2005) para a faixa etária utilizada nos experimentos (8-16 semanas).

Na avaliação bioquímica do estudo de toxicidade aguda, foi possível observar uma redução de glicose e um aumento do colesterol em níveis séricos em ratos machos. No entanto, o valor de normalidade da glicose para um roedor compreende de a faixa de 106-184 mmol/L (GIKNIS, 2008), e os animais apresentaram 173,80 mmol/L, mantendo a glicose

e o colesterol em concentrações plasmáticas dentro do limite máximo aceitável para roedores.

Ao avaliar a glicose sérica, fêmeas apresentaram aumento deste parâmetro nos experimentos de toxicidade aguda. Porém, a alteração deste parâmetro bioquímico não foi observada no estudo de 28 dias. No entanto, o nível de glicose sérica em fêmeas apresentou alteração significativa e acima do valor de normalidade, 300 mg/dL, sendo que a faixa normal deste parâmetro em fêmeas entre 8-16 semanas é de 76 a 175 mg/dL. Sabe-se que o fígado é o local de degradação do colesterol, síntese de glicose e gera glicose livre, que passa para o sangue a partir dos estoques de glicogênio hepático (KAPLAN et al., 1995). Altos níveis de glicose (300 mg/dL) podem ter ocorrido devido a alguns distúrbios no metabolismo de carboidratos que exigem maior exploração e estudo. Na avaliação de toxicidade aguda, em que foram utilizadas fêmeas, não foi possível correlacionar esta alteração com o óleo das amêndoas de babaçu, uma vez que o número de animais é insuficiente para afirmar que esta alteração esteja diretamente relacionada ao óleo e não à alteração individual de cada animal. Para confirmar este resultado e relacioná-lo ao óleo, mais estudos são necessários.

Segundo Saha et al. (2005), anestésicos, tais como xilazina e quetamina, e/ou jejum prolongado também podem causar hiperglicemia. Como estes anestésicos foram utilizados nos experimentos, a alteração dos níveis de glicose pode estar associada ao protocolo anestésico.

Este estudo constatou que, na dose aguda testada (2.000 mg/kg) nos 6 animais (3 fêmeas e 3 machos) expostos ao óleo de amêndoa de babaçu, não houve sinais clínicos de toxicidade (pieloereção, vômitos, diarreia, náuseas, alterações comportamentais) ou mortalidade nas primeiras 24 h após a exposição nem durante todo o período de acompanhamento (14 dias).

A necropsia não evidenciou nenhuma alteração macroscópica dos órgãos-alvo avaliados (coração, baço, timo, rins, fígado e pulmão). Ao se avaliar o peso relativo destes órgãos, também não foram observadas alterações significativas para estes parâmetros. Com os dados obtidos, é possível evidenciar que a dose de 2.000 mg/kg de óleo de babaçu não promoveu alterações de toxicidade sistêmica.

Nos grupos tratados com óleo das amêndoas de babaçu nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg, foi possível observar que a administração subaguda deste óleo provavelmente tem um efeito mínimo nas células sanguíneas circulantes ou na sua produção. Sabe-se que qualquer dano ao fígado resulta em elevações de ALT e AST no sangue. Além disso, quando a ALT é encontrada no soro, é considerada como o primeiro sinal de dano celular e hepático (RAHMAN, 2007; EL HILALY et al., 2004). A creatinina é conhecida por ser um bom indicador da função renal, com o resultado de que o aumento na creatinina significa

que não há danos evidentes aos néfrons funcionais (RAHMAN, 2007). No presente estudo, não houve diferenças estatísticas significantes na AST, ALT, GGT, fostatase alcalina, LDH, glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL em animais tratados com o óleo das amêndoas de babaçu, em comparação com o grupo controle, o que evidencia a ausência de efeitos tóxicos relacionados à administração do óleo. Contudo, houve diferenças estatisticamente significantes na albumina e ureia a nível sérico entre os animais tratados quando comparados ao grupo controle. No entanto, estes achados encontram-se dentro dos limites normais, de acordo com Giknis (2008), Lima et al. (2014), Moraillon et al. (2013) e Taconic (2005).

Entretanto, pode-se observar que, embora tenha ocorrido uma redução de leucócitos e plaquetas na avaliação hematológica e uma diminuição nos níveis séricos de albumina e ureia, provavelmente o óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico foi seguro nas doses testadas.

Ao avaliar os efeitos do óleo das amêndoas de babaçu nos animais expostos a dose aguda (2.000 mg/kg) e as doses subagudas (1, 3 e 5 mg/kg), foi possível evidenciar um provável efeito de hormeses. Este efeito é definido por um tipo específico de dose – resposta não monotônica, sem continuidade, como pode ser observado nos achados dos experimentos de toxicidade aguda e subaguda. A hormese é utilizada principalmente em estudos de avaliação de risco e de toxicologia (COOK; CALABRESE, 2007).

A sobrecompensação homeostática contra estressores químicos leves a moderados tem sido proposta como o mecanismo do fenômeno hormético (CALABRESE, 2001). Após a exposição perturbadora da homeostase em decorrência de produtos químicos sintéticos, o organismo tem uma tendência a compensar excessivamente a sua tentativa de regressar aos pontos de referência homeostáticos, reforçando assim as funções homeostáticas normais.

Segundo Kim et al. (2018), a hormese é caracterizada principalmente pela super compensação de várias respostas adaptativas ocasionadas pelo estresse celular, o que torna a hormese um possível mecanismo que acarreta a não linearidade de efeitos tóxicos e/ou adaptativos. Ao discutir a hormese, é importante descrever também o efeito de Mitohormesis, que se caracteriza pela resposta do organismo a substâncias sintéticas, medicamentos ou fitoquímicos, através da manifestação de alterações metabólicas em resistência ao estresse oxidativo, com o intuito de prevenir quadros de toxicidade (KIM et al., 2018; MERRY; RISTOW, 2016).

Fitoquímicos e fitoesteróis possuem diversos efeitos benéficos, como a redução de radicais livres e atuação como pró-oxidantes e propriedades diretas de eliminação de radicais livres em altas concentrações. As propriedades pró-oxidantes ativam vias de resposta celular adaptativas semelhantes à hormese sintética, induzidas por substâncias

como poluentes (KIM et al., 2018; MERRY; RISTOW, 2016; SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008; SURH, 2011).

Os fitoquímicos indutores de xenohormese incluem diversos compostos químicos com diversidade estrutural. Flavonoides como a quercetina, galato de epigalocatequina, isoflavonas, antocianinas, curcumina e ácido cafeico são importantes para proteção celular contra danos ocasionados por substâncias sintéticas e compostos ativos oriundos de plantas (SON; CAMANDOLA; MATTSON, 2008; SURH, 2011).

Segundo Kurano et al. (2018), a manutenção de altas concentrações de sitosteróis a nível plasmático podem promover propriedades anti-obesidade e anti-inflamatória, uma vez que estas substâncias são capazes de promover inibição da absorção de colesterol. Estas substâncias podem atuar reduzindo a formação de gordura visceral, prevenindo o desenvolvimento da obesidade e da inflamação crônica.

Embora na literatura não tenham estudos da atividade biológica de fitoesteróis presentes no óleo das amêndoas de babaçu, no presente estudo foi possível evidenciar que o β -sitosterol possui um efeito direto no metabolismo celular dos animais expostos ao composto durante 28 dias (toxicidade subaguda), efeito o qual pode ter promovido a perda de peso corporal e o aumento no consumo de ração ao longo do tratamento com o óleo. Estes resultados elucidam um provável efeito deste fitoquímico a nível celular nos animais tratados com o óleo. Porém, mais estudos são necessários para definir o mecanismo de ação do β -sitosterol e sua correlação com a perda de peso e alteração metabólica, via de ação e quais alterações de células pró-inflamatórias este composto pode induzir – efeito estimulante ou interferência direta na perda de peso.

Humanos e animais são expostos a fitoquímicos como o β -sitosterol através da dieta diariamente durante o ciclo de vida, portanto, as doses destas substâncias tendem a permanecer dentro de faixas horméticas. Outro fator a ser considerado é que a meia vida destas substâncias e a farmacocinética são curtas, o que impede o desenvolvimento de efeitos que caracterizem toxicidade (KIM et al., 2018).

Com isso, pode-se evidenciar que no presente estudo ocorreu um efeito semelhante ao descrito na discussão dos resultados – um efeito adaptativo –, pois os animais expostos ao óleo das amêndoas de babaçu contendo o fitoesterol β -sitosterol tiveram alterações que caracterizam um processo de alteração do metabolismo celular. Sendo assim, foi possível evidenciar a ocorrência do processo de hormeses relacionado à administração do óleo nestes animais e, com isso, inferir que nas doses testadas não há evidências que caracterizem toxicidade.

IV-5 Conclusão

Em conclusão, este estudo demonstrou que a administração oral de óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico em dose única de 2.000 mg/kg, bem como as três doses utilizadas no teste subagudo (1, 3 e 5 mg/kg), não mostraram efeitos tóxicos ou neurotóxicos em ratos. Este estudo mostrou que o óleo pode alterar o metabolismo celular de gordura dos animais, efeito visto após o tratamento subagudo (28 dias). Nesse sentido, evidencia-se a possibilidade de utilização do óleo das amêndoas de babaçu no desenvolvimento clínico de novo agente no tratamento da obesidade, haja vista que este óleo possui concentrações de β -sitosterol, um fitoesterol que pode ter ação direta na redução de peso corporal e, conseqüentemente, na redução da formação de adipócitos. No entanto, estudos adicionais são necessários para demonstrar a segurança do consumo humano do óleo das amêndoas de babaçu como suplemento dietético.

IV- Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processos nº 2016/13460-8 e nº 2015/04729-0 - pela bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processo nº 306317/2016-8.

IV- Referências

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, London, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

BARBOSA, M. C. et al. Effects of babassu nut oil on ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion and macromolecular leakage in the microcirculation: Observation in the hamster cheek pouch. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 11, n. 1, p. 158, 2012.

BELZUNG, C. Measuring rodent exploratory behavior. **Techniques in the Behavioral and Neural Sciences**, Amsterdam, v. 13, p. 738-749, 1999.

BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 73, n. 2, p. 171-175, 1981.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 65, n. 3, p. 247-250, 1979.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in rat. **British Journal of Psychology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 1-12, 1957.

CALABRESE, E. J. Overcompensation stimulation: a mechanism for hermetic effects. **Critical Reviews in Toxicology**, Philadelphia, v. 31, n. 4-5, p. 425-470, 2001.

CAVALCANTE, W. L. G. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 112, p. 490-497, 2007.

COOK, R.; CALABRESE, E. J. The importance of hormesis to public health. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 955-963, 2007.

CORNELIO-SANTIAGO, H. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 128, p. 386-394, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.030>.

DE SOUSA, V. P. et al. Nanostructured systems containing babassu (*Orbignya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 8, p. 3129, 2013.

DENENBERG, V. H. Open-field behavior in the rat: what DOES it mean? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 159, n. 1, p. 852-859, 1969.

EL HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga reptans* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 91, n. 1, p. 43-50, 2004.

GIKNIS, M. L. A. **Clinical laboratory parameters for Crl:WI(Han)**. Wilmington: Charles River, 2008.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Philadelphia, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 2, p. 245-250, 1991.

KAPLAN, A. et al. **Clinical chemistry interpretation and techniques**. 4th ed. USA: Williams & Wilkins, 1995. p. 155-333.

KARL, T.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Muechen, v. 55, n. 1, p. 69-83, 2003.

KIM, S. et al. Evolutionarily adapted hormesis-inducing stressors can be a practical solution to mitigate harmful effects of chronic exposure to low dose chemical mixtures. **Environmental Pollution**, Kidlington, v. 233, p. 725-734, 2018.

KURANO, M. et al. Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1863, n. 2, p. 191-198, 2018.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review. **Talanta**, Amsterdam, v. 53, n. 4, p. 771-782, 2001.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, Itabaiana, v. 10, n. 3, 2014.

LIPNICK, R. L. et al. Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 33, p. 223-231, 1995.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, Philadelphia, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.

_____. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

MASUR, J.; SCHUTZ, M. T.; BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. **Developmental Psychobiology**, Hoboken, v. 13, n. 2, p. 107-110, 1980.

MERRY, T. L.; RISTOW, M. Mitohormesis in exercise training. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 98, p. 123-130, 2016.

MONTGOMERY, K. C. Exploratory behavior and its relation to spontaneous alternation in a series of maze exposures. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, Washington, v. 45, p. 50-57, 1952.

MORAILLON, R. et al. **Manual elsevier de medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2013.

MOSAFERI, B. et al. Post-weaning environmental enrichment improves BDNF response of adult male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Kidlington, v. 46, p. 108-114, 2015.

NATIONAL RESERCHA COUNCIL - NRC. US National Research Council. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington, DC: National Academies Press, 2010.

OECD. **Guideline for testing of chemicals: repeated dose 28-day oral toxicity in rodents**. Test No. 407, adopted in 1981, and revised method adopted 3rd October 2008. OECD, Paris, 2008.

_____. **Guidelines for testing of chemicals: Acute oral toxicity-Acute toxic class method**. Test No. 423, adopted 22nd March 1996, and revised method adopted 17th December 2001. OECD, Paris, 2001a.

_____. **Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures**. Chapter 2.1, adopted 14th August 2001. OECD, Paris, 2001b.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 149-167, 1985.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, Auckland, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. **Neurobehavioral Genetics: methods and applications**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 291.

REIS, M. Y. F. A. et al. Anti-Inflammatory activity of Babassu oil and development of a microemulsion system for topical delivery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, p. 3647801, 2017.

SAHA, J. K. et al. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental Biology and Medicine**, London, v. 230, n. 10, p. 777-784, 2005.

SAHENA, F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 95, n. 2, p. 240-253, 2009.

SANDINI, T.M.; UDO, M.S.B.; SPINOSA, H.S. *Senecio Brasiliensis* e alcalóides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Revista Biotemas**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 83-92, 2013.

SIHVONEN, M. et al. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 10, n. 6-7, p. 217-222, 1999.

SON, T. G.; CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Hormetic dietary phytochemicals. **Neuromolecular Medicine**, Heidelberg, v. 10, n. 4, p. 236, 2008.

STEPHENS, D. N. et al. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 90, n. 2, p. 166-169, 1986.

SURH, Y. Xenohormesis mechanisms underlying chemopreventive effects of some dietary phytochemicals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1229, n. 1, p. 1-6, 2011.

TACONIC. **Control data of BrlHan: WIST@Tac(GALAS) Rat**. Taconic Bioscience Inc., 2005.

TREMML, P. et al. Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified β -amyloid precursor protein gene. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 65-76, 1998.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, Washington, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

CAPÍTULO V: Avaliação da toxicidade subaguda (28 dias) da farinha do mesocarpo de babaçu em ratos

Naila Albertina de Oliveira¹, Thaisa Meira Sandini², Elaine Cristina Lanzoni Martinelli³, Paulo Cesar Raspantini³, Maria Martha Bernardi^{3,5}, Alessandra Lopes de Oliveira¹, Heidge Fukumasu^{4*}

¹LTAPPN, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

²Departamento de fisiologia, Universidade Saskatchewan, Saskatoon, Canadá. ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia, Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX), Pirassununga, São Paulo, Brasil. ⁴Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ⁵Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: fukumasu@usp.br. Telefone: +55 1935656864.

V- Resumo

Além de diferentes usos na medicina popular bem como alimento, o mesocarpo do babaçu apresenta efeito antitrombótico, inibição da proliferação e indução de apoptose em células de hiperplasia prostática benigna. O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos da exposição subaguda (28 dias) da farinha do mesocarpo de babaçu por meio da exposição oral de ratos Wistar a diferentes concentrações da farinha adicionada na ração (5%, 10% e 15%). Para este estudo subagudo foram utilizados 50 ratos. Avaliou-se a variação de peso, consumo de ração, atividade geral pelo campo aberto e labirinto em cruz elevada, peso dos órgãos e avaliação histológica. A administração oral subaguda da farinha do mesocarpo de babaçu em ratos machos não resultou em quaisquer sinais de toxicidade ou mortalidade. Os resultados mostraram aumento no consumo de ração no grupo *pair feeding* durante os 28 dias de experimento e manutenção no consumo de ração nas 3 concentrações (5%, 10% e 15%) da farinha de babaçu. Ocorreu também aumento significativo do ganho de peso apenas nos animais do grupo *pair feeding*. Na avaliação bioquímica, houve aumento nos níveis de glicose no grupo tratado com 15% e no grupo *pair feeding*. Embora tenha sido observado aumento nos níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL, essas alterações estavam dentro da faixa de normalidade para ratos Wistar. As alterações hematológicas, redução dos leucócitos, também estavam dentro dos parâmetros normais. Não foram observadas alterações histológicas no estudo de toxicidade subagudo. Os resultados obtidos sugerem que a farinha de babaçu pode ser utilizada como suplemento alimentar devido à presença de minerais e/ou como suplemento no controle da obesidade.

Palavras-chave: Toxicidade subaguda. *Orbignya phalerata*. Suplemento alimentar.

V-1 Introdução

O babaçu (*Orbignya phalerata*) é um fruto nativo das regiões Norte e Nordeste do Brasil e pode ser encontrado principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Mata Grosso. A palmeira de babaçu, apesar de não ser cultivada, é abundante na natureza. O fruto dessa palmeira é constituído por epicarpo (11-13%), mesocarpo (20-23%), endocarpo (57-63%) e amêndoas (7-9%) (VINHAL; LIMA; BARBOSA, 2014).

A avaliação pré-clínica dos efeitos terapêuticos do mesocarpo do babaçu demonstrou que este fruto possui atividades antitumorais, anti-inflamatórias e propriedades antimicrobianas (BARROQUEIRO et al., 2011). O mesocarpo do babaçu também é utilizado na medicina popular para o tratamento de dismenorreia, reumatismo, tumores, tais como leucemia, e doenças venosas, úlceras, doenças inflamatórias relacionadas, tais como a colite e artrite e, finalmente, doenças infecciosas (BARROQUEIRO et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

O mesocarpo do babaçu também apresenta atividades biológicas, tais como o efeito antitrombótico (AZEVEDO et al., 2007), inibição da proliferação e indução de apoptose em células de hiperplasia prostática benigna (SOUZA et al., 2011), efeito antinociceptivo (PINHEIRO; BOYLAN; FERNANDES, 2012) e atividade antimicrobiana no tratamento de sepse por *Stafilococcus aureus* (BARROQUEIRO et al., 2016).

A farinha do mesocarpo tem sido utilizada como alimento, através da produção do mingau (água e farinha) em populações rurais. Nesse sentido, estudos que explorem as propriedades farmacológicas da farinha de babaçu têm ganhado destaque. Dessa forma, Maniglia e Tapia-Blácido (2016) demonstraram que a farinha do mesocarpo de babaçu apresenta atividade antioxidante pela presença de compostos fenólicos. O mesocarpo de babaçu é um subproduto da extração de óleo de babaçu, sendo gerado durante a separação do núcleo de babaçu. A secagem e moagem do mesocarpo de babaçu dão origem à farinha, produto amplamente comercializado no estado do Maranhão (Brasil). Como substituto da farinha de mandioca, a farinha do mesocarpo de babaçu serve como alimento para humanos e animais (CARNEIRO et al., 2009). Esta farinha contém aproximadamente de 60-80% de amido, mas sua composição varia em função de sua origem (CINELLI et al., 2014). Apesar do uso tradicional do mesocarpo de babaçu como farinha, as propriedades deste amido permanecem pouco exploradas.

O amido é um polissacarídeo vegetal que constitui um recurso altamente disponível e de baixo custo com propriedades físico-químicas de interesse tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade (YULIANA et al., 2012). Por estas razões, o amido além de ser usado na indústria alimentícia, também tem sido utilizado nas indústrias farmacêutica, biomédica e de polímeros (AFOLABI et al., 2012).

Atualmente, a cultura popular do uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedades terapêuticas tem crescente valorização pela sociedade brasileira, bem como mundial. Com isso, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos se tornou uma prática comum no Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro, resultante da busca por hábitos mais saudáveis, qualidade de vida e pelo crescente aumento da resistência microbiana (BUGNO et al., 2005; DE SMET, 2004; GIVEON et al., 2004; ROCHA; SOARES; CORRÊA, 2004). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo principal contribuir para a formação de evidências científicas do babaçu (*Orbignya phalerata*), amplamente utilizado na medicina popular e descrito na relação nacional de plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS). Para isto, foi avaliada a toxicidade subaguda da farinha do mesocarpo de babaçu através da adição desta na ração de ratos Wistar.

V-2 Material e Métodos

V-2.1 Animais

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos, com idade a partir de 60 dias, provenientes do biotério do Centro de Toxicologia Veterinária (CEPTOX), Pirassununga/SP, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas; a fase clara foi iniciada diariamente às 6 h da manhã. As condições de temperatura (20 ± 4 °C) foram controladas, assim como a umidade relativa ($55 \pm 10\%$). Os animais foram mantidos em gaiolas abertas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), com tampas de inox altas (Beiramar®, - São Paulo, BR), mantidas em estantes ventiladas (Alesco® – Campinas, BR), em sala climatizada, com controle de temperatura e umidade. Foram alojados 2 animais por gaiola, favorecendo assim o contato visual entre eles devido à divisão metálica alocada nas caixas. A alimentação dos animais consistiu em peletes de ração (Nuvilab CR-1 fornecida pela Nuvilab Londrina, BR) comercial para roedores e água filtrada, em condições *ad libitum* durante todo o experimento. A habituação dos animais às condições experimentais foi realizada durante um período de 20 dias anteriores ao início da administração da farinha do mesocarpo de babaçu. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com as orientações éticas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FZEA/USP, representado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (CEUA/FZEA), sob a aprovação do protocolo nº 2679030216 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP, representado pela CEUA/FMVZ, sob aprovação do protocolo nº 6703030217, seguindo as diretrizes internacionais (NRC, 2010).

V-2.2 Adição da farinha do mesocarpo de babaçu

O mesocarpo de babaçu foi doado pela BABACOAL (Universidade Federal do Piauí), localizada na cidade de Teresina, Piauí. A farinha foi seca em estufa de circulação de ar (Marconi, Piracicaba, BR) durante 48h a 50 °C, e posteriormente embalada a vácuo e armazenada em freezer -20 °C (Brastemp, São Bernardo do Campo, BR). Para a realização do experimento, o mesocarpo foi moído em moinho de facas em pequenas quantidades, com o intuito de evitar o aquecimento.

O mesocarpo de babaçu triturado (farinha) foi incorporado à ração comercial (Nuvilab CR-1 fornecida pela Nuvilab Londrina, BR), que foi esfarelada. Esta mistura foi homogeneizada em misturador (Marconi, Piracicaba, BR) e imediatamente peletizada. Foram preparadas e incorporadas à ração três concentrações diferentes da farinha de mesocarpo, 5%, 10% e 15%. Para o grupo controle e *pair feeding*, a ração comercial foi esfarelada e repeletizada, sem adição da farinha do mesocarpo de babaçu.

O cálculo para adição da farinha na ração foi estimado baseado no consumo diário humano de 100 g de farinha de mesocarpo de babaçu, conforme descrito na Tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos) (UNICAMP, 2006).

V-2.3 Composição centesimal

Para a caracterização do mesocarpo de babaçu, foram realizadas as análises de composição centesimal, na qual se avaliou a umidade, teor de cinzas, extrato etéreo (lipídeos), fibra bruta, determinação de nitrogênio total e proteína bruta, sendo todas as análises realizadas em triplicata. Para a realização das análises, as amostras foram previamente secas em estufa de convecção de ar forçado (Marconi, Piracicaba, BR) a 105 °C, até obtenção do peso constante.

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, que considera a perda de massa da amostra por meio da dessecação até que o peso permaneça constante (ZANEBON, PASQUET; TIGLE, 2008).

A Eq. 1 relaciona massa úmida e seca e, com isso, fornece em porcentagem a umidade da amostra.

$$Umidade(\%) = \frac{m_u - m_s}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

em que m_u é a massa (em gramas) da amostra úmida e m_s é a massa (em gramas) da amostra seca.

O teor de cinzas foi determinado através da perda de peso que o material apresentou quando submetido ao aquecimento à temperatura de 600 °C (sem ultrapassar esse patamar), até que ocorra a queima da amostra, durante 4h ou até que ocorra a combustão total da matéria orgânica (AOAC, 1990). Para a análise de cinzas, foram pesados 2 g de amostra de amêndoa e de mesocarpo de babaçu em uma balança analítica (Shimadzu au220, Tóquio, JP). Posteriormente, as amostras foram transferidas para cadinhos identificados e alocados em estufa de circulação de ar a 105 °C por 2h. Após esse período, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em um dessecador para esfriar e não absorver umidade. Em seguida, as amostras foram pesadas, e a massa de cada cadinho foi devidamente anotada, para posterior cálculo da matéria seca. Por conseguinte, os cadinhos com as amostras de amêndoa e mesocarpo de babaçu foram colocados no forno mufla, a 600 °C por 4h, para o cálculo do teor de cinzas das amostras das amêndoas e do mesocarpo de babaçu (Eq. 2).

$$\%Cinzas = \left(\frac{C3-C1}{C2-C1} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde C1 é massa do cadinho utilizado vazio; C2 é massa do cadinho com amostra antes do processo de secagem e C3, a massa do cadinho com amostra depois do processo de secagem.

As análises de extrato etéreo e fibra bruta foram feitas conforme metodologia adotada pelo Instituto Adolfo Lutz (ZANEBON, PASQUET; TIGLE, 2008). A determinação lipídica foi realizada via Soxhlet, com hexano como solvente (Synth, Diadema, BR). Já na análise de fibra bruta foram pesados $\pm$ 1g de mesocarpo de babaçu triturado e seco. As amostras pesadas foram alocadas em béqueres e foram adicionados 100 mL de ácido sulfúrico 1,25% (Synth, Diadema, BR); posteriormente, os béqueres foram levados ao aparelho determinador de fibra bruta, permanecendo 30 min após o início da ebulição. As amostras de mesocarpo de babaçu foram filtradas em cadinhos de vidro poroso, e lavadas com água destilada quente até que a reação neutra ocorresse. Após esse procedimento, os cadinhos foram mantidos em estufa de circulação de ar durante 4 h. Após a secagem das amostras, elas foram alocadas em um dessecador e pesadas. Posteriormente, as amostras foram colocadas em forno mufla a 500 °C por 2h, esfriadas em dessecador e novamente pesadas.

A determinação de proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl, utilizando um aparelho micro-Kjedahl para determinação de nitrogênio. Essa análise consiste em digestão das amostras do mesocarpo de babaçu em ácido sulfúrico com catalisador, o que resulta na conversão do nitrogênio em amônia e, posteriormente, a destilação da amônia em

uma solução receptora; em seguida, a quantificação foi realizada por titulação com ácido clorídrico 0,02N (Synth, Diadema, BR) de fator conhecido (6,25). Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrogênio total na amostra (AOAC, 1990).

V-2.4 Toxicidade Subaguda (28 dias)

A determinação da dose repetida de toxicidade oral aos 28 dias foi realizada de acordo com as diretrizes da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico 407 (OECD, 2008). Ratos Wistar machos foram distribuídos em cinco grupos de 10 animais. Um grupo foi designado como controle e recebeu ração comercial (Nuvilab CR-1 fornecida pela Nuvilab Londrina, BR) esfarelada e repeletizada, sem adição da farinha do mesocarpo de babaçu.

Os grupos experimentais receberam diferentes concentrações da farinha do mesocarpo de babaçu incorporadas na ração (5%, 10% e 15%). O grupo designado *pair feeding* recebeu a mesma quantidade de ração que o grupo de 15% consumiu. Os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante o período experimental, uma vez por dia, com o intuito de detectar possíveis sinais gerais de toxicidade (pioloreção, *grooming*, ptose, hiperatividade e tremores); duas vezes ao dia, todos os animais foram inspecionados em busca de sinais de morbidade e mortalidade. O consumo de ração e o ganho de peso corporal foram mensurados a cada 3 dias. Ao final do período experimental, todos os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina (Bayer, BR) (5 e 50 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal); posteriormente, a coleta de sangue foi realizada através da técnica de punção cardíaca. Amostras de sangue foram coletadas para análise hematológica e bioquímica. O coração, o fígado, os rins, o baço e o timo foram removidos e os pesos relativos (peso do órgão g/PC x 100) foram calculados.

V-2.5 Avaliação de comportamento

A avaliação de comportamento foi realizada em todos os animais dos experimentos de toxicidade aguda e do estudo de doses repetidas. Os estudos comportamentais em roedores são importantes para avaliar o desenvolvimento de comportamentos aversivos, agressivos, estresse e ansiedade em roedores (BELZUNG, 1999; CRUSIO; GERLAI, 1999; LISTER, 1990; MOSAFERI et al., 2015; SANDINI; UDO; SPINOSA, 2013), podendo expressar sinais de neurotoxicidade.

V-2.5.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto (open-field) é amplamente utilizado em roedores para avaliar comportamentos ligados à emocionalidade (ARCHER, 1973; BERNARDI; SOUZA; PALERMO-NETO, 1981), exploração (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1979), atividade motora e ansiedade do animal (BELZUNG, 2003; MOSAFERI et al., 2015; PRUT; TREMML et al., 1998; WALSH; CUMMINS; BUDTZ-OLSEN, 1973).

O aparato utilizado nos experimentos foi uma arena circular de madeira (diâmetro de 97 cm x 27 cm de altura), cujo fundo foi dividido em 25 áreas de tamanhos semelhantes. Tais partes foram dispostas em três círculos concêntricos, divididas por 16 segmentos de reta.

Na análise de campo aberto, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena entre 7 e 11 h no período da manhã. Cada sessão teve duração de 5 min, observando-se simultaneamente os seguintes parâmetros:

- 1) Frequência de locomoção: uma unidade de medida corresponde à colocação das quatro patas dentro do espaço delimitado pelas quatro linhas que compõem uma subdivisão do chão da arena;
- 2) Frequência de levantar: uma unidade de medida corresponde ao movimento do animal apoiar-se nas patas posteriores, com a cabeça dirigida para cima e com o corpo perpendicular em relação ao chão da arena, apoiando-se ou não nas paredes do campo aberto;
- 3) Duração de imobilidade: nesta análise, a duração em segundos da ausência total de movimentos foi registrada;
- 4) Defecação: ao final dos cinco minutos de observação foi contado o número de bolos fecais;
- 5) Micção: ao final dos cinco minutos de observação foi contado o número de poças de urina.

Os registros das frequências de locomoção, de levantar e da imobilidade foram feitos por um cronômetro. Entre um animal e outro, a arena foi limpa com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior.

V-2.5.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado é um dos modelos mais usados para detectar atividade ansiolítica de drogas (HOGG, 1996). Este teste baseia-se na aversão natural de roedores aos espaços abertos e foi validado tanto em ratos (PELLOW et al., 1985), como em camundongos (LISTER, 1987; STEPHENS et al., 1986).

O labirinto é constituído de dois braços abertos (50 × 10 cm) e dois fechados (50 × 10 × 40 cm), arrançados de forma que os braços de mesmo tipo fiquem em oposição entre si, ligados por uma área central (10 × 10 cm). O aparato é feito de madeira, o piso dos braços pintado em cinza escuro fosco revestido de acrílico lavável com altura de 50 cm do chão.

Os ratos foram colocados, individualmente, no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e durante 5 min foram observados o número de entradas nos braços abertos (EBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TBA). Também foi avaliado o número de entradas nos braços fechados (EBF), o tempo de permanência nos braços fechados (TBF), a frequência em que o animal apresenta o comportamento de estirar a cabeça para fora dos limites da plataforma dos braços abertos (comportamento de risco), a mobilidade e o tempo de centro.

O registro de entradas nos braços abertos e fechados foi realizado por intermédio de contador manual e o tempo de permanência nos braços do labirinto cronometrado. Entre as observações de cada animal, o labirinto foi limpo com solução de álcool a 5%.

V-2.6 Análise de hematologia e bioquímica sérica

Os animais foram submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca, a qual foi efetuada com seringas (BD, Plastipak, Curitiba, BR) e agulhas (BD, Plastipak, Curitiba, BR), ambas descartáveis.

A análise de hemograma foi realizada com uma alíquota de sangue com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (BD, Plastipak, Curitiba, BR); essa alíquota foi analisada no aparelho automático Horiba®ABX (ABC vet equipamento de contagem de célula, Montpellier, FR) para a emissão dos valores de cada componente analisado da amostra.

O número total de células do sangue circulante, foi quantificado com o auxílio da câmara de Neubauer. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço, os quais foram fixados em lâminas, coradas com corante de Rosenfeld (Dinâmica Química, Diadema, BR). Durante o procedimento de coloração para a contagem de células, as lâminas foram colocadas em um suporte de coloração e recobertas com 20 gotas do corante Rosenfeld. Após 3 minutos, foram adicionadas 20 gotas de água destilada, e, em seguida, a mistura (água/corante) foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 3 min; na sequência, a lâmina foi lavada com água corrente e seca em posição vertical. Os esfregaços foram analisados em microscópio de luz (objetiva de 100x).

As análises bioquímicas foram realizadas com outra alíquota de sangue, que foi mantida em temperatura ambiente por 45 min para que ocorresse a coagulação. Em seguida à coagulação, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min e, logo após esse

procedimento, o sangue coletado foi mantido a uma temperatura de 4 °C no refrigerador (Brastemp, Flex, São Paulo, BR) até a realização das dosagens. As amostras foram lidas no equipamento em um período de até 48 h após a coleta.

A atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamil transferase (GGT), e os níveis de ureia, creatinina, glicose, colesterol total, triglicérides, proteína total (PT), albumina, (Bioclin, Belo Horizonte, BR) dos animais, controle e experimentais, foram dosados pelo sistema automatizado de bioquímica CELM SBA 200 (CELM, Barueri, BR) do laboratório do CEPTOX.

V-2.7 Necropsia e histopatologia

Todos os animais do estudo foram submetidos a uma necropsia completa e detalhada, que incluiu exame cuidadoso dos tecidos corporais. O fígado, os rins, o timo, o baço, os pulmões e o coração de todos os animais foram coletados. Todos os tecidos foram preservados em formalina a 10% tamponada neutra (Dinâmica, Química, Diadema, BR) e, após 24 h, as amostras foram transferidas para etanol a 70% (Dinâmica, Química, Diadema, BR). Em seguida, os tecidos foram embebidos em parafina, processados, cortados em cortes de 5 µm e corados com hematoxilina (Leica, Wetzlar, GE) e eosina (Leica, Wetzlar, GE) para posterior exame histopatológico.

V-2.8 Análise estatística

Para análise de dados coletados para identificar toxicidade, nos experimentos com animais foi empregado o programa estatístico GraphPad Prism 7.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) para a realização das análises estatísticas. Para verificar a homocedasticidade dos dados, foi utilizado o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, ou duas vias, quando existirem dois fatores (tempo e tratamento) para serem avaliados. Foi empregada a RAMANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, para medidas repetidas, tais como ganho de peso e consumo de ração. Para análise não paramétrica, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunns. Em todas as análises efetuadas, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

V-3 Resultados

V-3.1 Composição da Farinha do mesocarpo de babaçu

A farinha do mesocarpo de babaçu apresentou composição majoritária de carboidratos ($80,66 \pm 1,33\%$), bem como uma quantidade representativa de proteína bruta ($2,74 \pm 0,42\%$) e teor de fibra bruta ($2,08 \pm 0,01$). Na literatura, encontram-se valores de carboidratos na farinha do mesocarpo de babaçu por volta de 52% (PAVLACK et al., 2007), inferior ao que foi encontrado neste estudo. A variação da composição centesimal é relacionada à matéria-prima e aos fatores de cultivo, extração, maturação e, por isso, variações são esperadas. O mesocarpo de babaçu é constituído por polissacarídeos amplamente utilizados na alimentação. Sua inserção na dieta humana ocorre de forma efetiva devido ao alto teor de carboidratos. Maniglia e Tápia-Blacido (2016) também avaliaram o mesocarpo de babaçu em solução aquosa e sua composição centesimal, e obtiveram valores de proteína ($1,38 \pm 0,01$) e fibra ($1,72 \pm 0,15$) inferiores quando comparados ao presente estudo (Tabela 1). No entanto, ao comparar os valores do teor de cinzas do presente estudo aos valores obtidos por Maniglia e Tápia-Blacido (2016), os valores obtidos neste trabalho foram superiores ($1,13 \pm 0,12$) (Tabela 1). Segundo Silva (2011), a composição centesimal do mesocarpo de babaçu em base seca oriundo do estado do Piauí apresentou teor de cinzas de $0,78 \pm 0,03\%$, teor de proteínas de $7,36 \pm 0,11\%$, teor de carboidratos de $72,20 \pm 1,05\%$ e teor de fibra bruta de $2,82 \pm 0,06\%$, sendo que os valores de cinzas e carboidratos foram inferiores aos encontrados no presente estudo, embora a matéria-prima utilizada nesta pesquisa seja também oriunda do estado do Piauí.

A matéria-prima utilizada neste trabalho apresentou umidade de 13,34%, valor inferior ao descrito na tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos) (UNICAMP, 2007), a qual reporta o valor de 15,8%.

Ao avaliar a ração com adição da farinha do mesocarpo de babaçu nas porcentagens de 5%, 10% e 15%, pode-se observar uma alteração apenas na composição de carboidratos; a ração com adição de 15% de farinha de mesocarpo de babaçu apresentou um aumento 5,18% no teor de carboidratos quando comparada à ração controle. Ao analisar a ração com adição de 5% de farinha de mesocarpo de babaçu, comparando com a ração

com adição de 15% da farinha, pode-se observar uma redução de 26,5% no teor de carboidratos. Comparando a composição de ambas as rações com adição de farinha de mesocarpo (10% e 15%), também se pode observar uma redução de 22% no teor de carboidratos. Assim, a alteração da composição de carboidratos pode ser uma evidência à qual a perda de peso dos animais pode estar associada; no entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa relação.

Tabela 1 - Resultados das análises de composição centesimal do mesocarpo de babaçu

Análises	Mesocarpo de babaçu (%)	Ração 5% de mesocarpo de babaçu	Ração 10% de mesocarpo de babaçu	Ração 15% de mesocarpo de babaçu	Ração controle
Umidade	13,34	-	-	-	-
Cinzas	1,10 ± 0,01	6,89 ± 0,01	6,42 ± 0,14	6,01 ± 0,06	7,02 ± 0,04
Fibra bruta	2,08 ± 0,01	4,44 ± 0,78	3,82 ± 0,41	4,09 ± 0,09	3,73 ± 0,07
Lipídios	0,08 ± 0,02	5,40 ± 0,10	4,90 ± 0,28	4,62 ± 0,09	5,38 ± 0,37
Proteína	2,74 ± 0,42	25,03 ± 0,05	22,06 ± 0,11	21,63 ± 0,04	25,40 ± 0,02
Carboidratos	80,66 ± 0,40	37,20 ± 0,10	41,75 ± 0,01	63,65 ± 0,06	58,47 ± 0,22

Os resultados foram obtidos em base seca.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Em relação à concentração dos elementos do perfil de minerais do mesocarpo de babaçu (metodologia descrita no item. III-2.3 do Capítulo III), foram encontrados 3.170 mg de potássio, 274 mg de fósforo, 9 mg de sódio, 7,6 mg de ferro, 4,8 mg de cobre, 1,9 mg de zinco, aproximadamente 1,6 mg de selênio e < 0,8 mg de manganês. Dessa forma, os elementos potássio, fósforo, sódio e ferro podem ser considerados os minerais majoritários na composição de minerais do mesocarpo de babaçu, corroborando com o estudo de Naozuka et al. (2011), que também apresentou potássio e ferro como compostos majoritários para esta matéria-prima. Com isso, pode-se inferir que a ração com adição da farinha de mesocarpo de babaçu também possui esses minerais em sua composição.

V-3.2 Toxicidade subaguda (28 dias)

Ao analisar o consumo de ração dos animais tratados com a adição da farinha do mesocarpo de babaçu durante 28 dias, a RAMANOVA mostrou diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,0001$), dias de observação ($p < 0,0001$) e com interação ($p < 0,0001$). O pós-teste estatístico de Dunnett apontou diminuição do consumo de ração (g) no 5º dia ($p < 0,05$) nos animais do grupo que recebeu ração com adição de 5% do mesocarpo de babaçu, e nos grupos com adição de 10% e 15% do mesocarpo ($p < 0,01$), quando comparados ao grupo controle (Figura 1). O pós-teste de Dunnett apontou redução significativa no consumo de ração apenas no grupo *pair feeding* nos dias 1 a 28 ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo controle.

Figura 1 - Efeitos da adição do mesocarpo de babaçu na ração (5, 10 e 15%) sobre o consumo de ração e a variação de peso corpóreo em ratos expostos à farinha de mesocarpo de babaçu durante 28 dias, comparados ao grupo controle

Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão; $n = 08$ ratos por grupo; RMANOVA (fatores: tratamento e dia de exposição) seguidos pelo teste post hoc de Bonferroni; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus grupo controle
Fonte: Própria autoria, 2018.

Na análise de ganho de peso corpóreo (g), a RAMANOVA não mostrou diferença significativa com relação aos tratamentos ($p = 0,4233$), porém houve diferença significativa nos dias de tratamento ($p < 0,0001$) e na interação (tempo x tratamento) ($p < 0,0001$). O pós-teste de Dunnett apontou aumento do ganho de peso corpóreo nos dias 7 ($p < 0,0001$), 23 ($p < 0,01$), 25 ($p < 0,0001$), 27 ($p < 0,01$) e 28 ($p < 0,0001$) nos ratos do grupo *pair feeding*, quando comparados com o grupo controle (Figura. 1).

A Tabela 2 apresenta o resultado dos parâmetros avaliados no teste comportamental de Campo Aberto dos animais expostos ao mesocarpo de babaçu por 28 dias. Com relação aos parâmetros avaliados, a ANOVA de uma via apontou diferença significativa na imobilidade ($p = 0,0035$) e o pós- teste de Dunnett mostrou redução deste parâmetro nos grupos de 5% ($p < 0,001$) e nos grupos de 10 e 15% ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle e ao grupo *pair feeding*. Os demais parâmetros, tais como defecação,

micção, tempo de centro, tempo e frequência de locomoção, não apresentaram diferença significativa.

Tabela 2 - Parâmetros do comportamento no campo aberto de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo *pair feeding* durante 28 dias

Parâmetro	<i>Pair feeding</i> (n = 10)	Controle (n = 10)	5% (n = 10)	10% (n = 10)	15% (n = 10)
Bolo fecal (unidade)	3,42 ± 1,15	1,50 ± 0,76	2,37 ± 0,67	3,50 ± 0,65	1,00 ± 0,68
Micção (unidade)	15,38 ± 2,71	9,16 ± 3,43	15,71 ± 2,86	12,88 ± 1,26	11,29 ± 1,52
Tempo de Centro (s)	5,14 ± 0,63	5,50 ± 0,77	6,12 ± 2,31	4,57 ± 1,51	5,14 ± 1,05
Tempo de Locomoção (s)	122,90 ± 11,05	129,70 ± 16,23	164,40 ± 13,96	141,00 ± 13,67	145,10 ± 11,71
Frequência de levantar	21,75 ± 2,33	27,00 ± 4,15	27,50 ± 3,32	30,13 ± 2,78	28,14 ± 2,62
Tempo de imobilidade (s)	169,90 ± 14,43	133,10 ± 21,24	91,13 ± 12,65***	108,30 ± 8,06*	117,70 ± 1,01*

n = número de animais por grupo. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle); ^aKruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunns (para dados não paramétricos %): *p < 0,05, **p < 0,01 *versus* grupo controle
Fonte: Própria autoria, 2018.

Os parâmetros observados no labirinto em cruz elevado dos animais expostos ao mesocarpo de babaçu por 28 dias são mostrados na Tabela 2.1.

Nas análises estatísticas, não houve diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados. Com relação aos parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade subaguda do mesocarpo de babaçu por 28 dias, a análise de variância (ANOVA) apontou diferença significativa nos leucócitos (p = 0,0008). O pós-teste de Dunnett apontou redução nos níveis de leucócitos em ratos que receberam 5% (p < 0,01), nos animais do grupo *pair feeding* (p < 0,001) e nos animais do grupo de 15% (p < 0,01), quando comparados ao grupo controle (Tabela 3, série vermelha e Tabela 4, série branca). No entanto, esse parâmetro permaneceu dentro dos limites normais para ratos nessa faixa etária (8 a 16 semanas) (GIKNIS, 2008).

Tabela 2.1 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo *pair feeding* durante 28 dias

Parâmetro	<i>Pair feeding</i> (n = 10)	Controle (n = 10)	5% (n = 10)	10% (n = 10)	15% (n = 10)
% Entrada BA ^{a1}	37,13 ± 12,41	29,80 ± 3,61	30,27 ± 4,54	25,82 ± 6,46	20,58 ± 7,34
% Tempo BA ^{a2}	20,87 ± 2,52	19,71 ± 8,02	14,77 ± 2,77	15,10 ± 5,97	21,14 ± 6,55
Tempo (s) BA	3,71 ± 1,50	4,00 ± 0,00	3,25 ± 1,26	3,29 ± 2,21	2,57 ± 2,00
Frequência de entrada BF	8,43 ± 1,90	4,25 ± 1,70	8,25 ± 4,11	9,57 ± 2,99	7,14 ± 1,57
Tempo (s) BF	197,86 ± 41,06	204,75 ± 35,22	215,50 ± 35,24	39,17 ± 4,83	216,71 ± 44,10
Número de cruzamentos centro (BA + BF) ³	12,14 ± 1,03	8,25 ± 2,00	11,50 ± 1,74	11,25 ± 1,75	8,50 ± 1,71
Comportamento de risco	4,40 ± 1,63	4,71 ± 0,74	3,00 ± 1,04	4,71 ± 1,79	4,71 ± 2,03

Os dados são expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle); ^aKruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunns (para dados não paramétricos %): *p < 0,05, **p < 0,01 *versus* grupo controle; n = número de animais por grupo; BA = braços abertos; BF = braços fechados; ¹ % EBA = % de entradas nos braços abertos; ² % TBA = % de tempo nos braços abertos; ³ número total de cruzamentos entre braços abertos e fechados

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos (série vermelha) de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo *pair feeding* durante 28 dias

Parâmetros hematológicos	<i>Pair feeding</i> (n = 10)	Controle (n = 10)	5% (n = 10)	10% (n = 10)	15% (n = 10)	Lima et al.,2014
Leucócitos (10 ³ /μL)	7,20 ± 0,39	4,80 ± 0,33***	5,45 ± 0,40**	6,25 ± 0,32	5,30 ± 0,45**	3,41 - 13,70
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	7,71 ± 0,20	7,74 ± 0,26	8,03 ± 0,14	8,29 ± 0,17	8,17 ± 0,30	8,16 [#]
Hemoglobina (g/dL)	14,78 ± 0,31	15,75 ± 0,63	14,79 ± 0,38	15,15 ± 0,22	15,64 ± 0,32	10,20 - 17,80
Hematócrito (%)	41,28 ± 1,36	44,16 ± 2,13	41,19 ± 1,46	42,45 ± 0,78	44,19 ± 0,97	23,80 - 51,90
Plaquetas ^a (10 ³ /μL)	691,30 ± 19,99	649,80 ± 26,23	679,50 ± 19,06	700,90 ± 22,85	712,60 ± 34,59	727 - 1351
VCM (μm ³)	53,00 ± 0,46	53,88 ± 0,74	53,25 ± 0,41	52,88 ± 0,22	53,29 ± 0,28	43,60 - 52,60
HCM (pg)	19,06 ± 0,46	19,28 ± 0,18	19,14 ± 0,30	18,84 ± 0,12	18,87 ± 0,17	15,90 - 17,00
CHCM (g/dL)	35,98 ± 0,93	35,76 ± 0,26	35,96 ± 0,47	35,73 ± 0,22	35,41 ± 0,34	31,60 - 37,80

Dados expressos como media ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle); ^aKruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunns (para dados não paramétricos %): *p < 0,05, **p < 0,01 *versus* grupo controle. Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM), Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

* LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

[#]TACONIC, 2005.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos (série branca) de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo *pair feeding* durante 28 dias

Parâmetros hematológicos	<i>Pair feeding</i> (n = 10)	Controle (n = 10)	5% (n = 10)	10% (n = 10)	15% (n = 10)	Lima et al., 2014*
Monócito	1,85 ± 0,61	0,50 ± 0,26	2,25 ± 0,59	1,12 ± 0,39	0,71 ± 0,39	1,00 - 15,20
Linfócito	80,25 ± 1,94	79,50 ± 2,65	78,88 ± 1,14	78,88 ± 1,26	79,86 ± 2,96	43,10 - 93,7
Neutrófilos	17,63 ± 1,95	19,50 ± 2,71	18,25 ± 0,83	19,38 ± 1,13	18,86 ± 2,15	4,00 - 49,90
Eusινόfilo	0,25 ± 0,16	0,50 ± 0,26	0,62 ± 0,26	0,62 ± 0,26	0,57 ± 0,42	0,00 - 3,60

Dados expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle); ^aKruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunns (para dados não paramétricos %): *p < 0,05, **p < 0,01 *versus* grupo controle

* LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo *pair feeding* durante 28 dias

Parâmetros bioquímicos	<i>Pair feeding</i> (n = 10)	Controle (n = 10)	5% (n = 10)	10% (n = 10)	15% (n = 10)	Giknis, 2008*
AST (U/L)	182,30 ± 11,12	207,60 ± 46,21	165,50 ± 13,37	163,00 ± 14,13	158,60 ± 12,52	63 - 175
ALT (U/L)	57,13 ± 8,43	58,50 ± 9,70	53,75 ± 9,21	48,25 ± 3,37	58,71 ± 12,51	19 - 48
GGT (U/L)	0,16 ± 0,10	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08	0,31 ± 0,17	0,27 ± 0,12	1 - 6 ^{\$}
F.A. (U/L)	130,90 ± 5,22	135,10 ± 5,43	132,50 ± 4,19	118,90 ± 4,99	132,40 ± 7,62	36 - 131
LDH (U/L)	1564 ± 115,40	1398 ± 89,93	1563 ± 80,26	1618 ± 73,82	1457 ± 176,80	272 - 1961
Proteínas totais (g/dL)	7,66 ± 0,27	7,85 ± 0,53	7,14 ± 0,18	7,22 ± 0,22	7,52 ± 0,24	5,6 - 7,6
Albumina (g/dL)	3,47 ± 0,11	3,85 ± 0,17	3,69 ± 0,19	3,30 ± 0,17	3,62 ± 0,10	3,6 - 4,7
Globulina (g/dL)	4,19 ± 0,27	4,00 ± 0,38	3,44 ± 0,19	3,92 ± 0,17	3,90 ± 0,17	1,8 - 2,5
Glicose (mmol/L)	219,80 ± 15,29	349,30 ± 24,33*	336,30 ± 30,11	382,30 ± 19,00	442,90 ± 40,53**	106 - 184
Triacilgliceróis (mmol/L)	81,75 ± 17,22	149,80 ± 18,02	81,00 ± 15,68	116,80 ± 17,81	161,00 ± 32,30*	27 - 160
Colesterol (mg/dL)	72,38 ± 5,30	89,13 ± 7,90	103,80 ± 9,96*	93,75 ± 10,92	74,86 ± 6,66	35 - 95
Colesterol HDL (mg/dL)	37,25 ± 5,23	33,50 ± 2,02	69,38 ± 11,46**	69,13 ± 7,85**	27,71 ± 3,90	-
Ureia (mg/dl)	67,50 ± 3,68	74,00 ± 3,31	70,25 ± 2,04	69,38 ± 3,79	64,71 ± 2,40	10,7 - 20
Creatinina (mg/dL)	0,77 ± 0,03	0,78 ± 0,10	0,81 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,74 ± 0,06	0,3 - 0,6

Os dados foram expressos em média ± erro médio, e o número de animais por grupo = 8 ratos machos. Teste t de Student; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle

[&]MORAILLON, R.; LEGEAY, Y.; BOUSSARIE, D.; SÉNÉCAT, O. **Manual Elsevier de Medicina Veterinária**. Elsevier Brasil: Rio de Janeiro, 2013.

[@]GIKNIS, M. L. A. **Clinical laboratory parameters for Crl:WI(Han)**. Wilmington: Charles River, 2008.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, a análise estatística ANOVA apontou diferenças significantes na glicose sérica ($p = 0,0044$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett apontou aumento nos níveis de glicose em ratos do grupo de 15% ($p < 0,01$) e no grupo *pair feeding* ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (Tabela 5).

Na avaliação dos triglicerídeos, a análise de variância (ANOVA) demonstrou diferenças significantes ($p = 0,00225$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett apontou aumento deste parâmetro nos animais do grupo de 15% quando comparados ao grupo controle.

A ANOVA de uma via não mostrou um aumento nos níveis de colesterol total ($p = 0,0702$) entre os grupos; no entanto, nos pós-teste de Dunnett apontou aumento significativo no grupo de 5% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Na avaliação do colesterol HDL, a análise de variância (ANOVA) demonstrou diferenças significantes ($p = 0,00225$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett apontou aumento deste parâmetro nos animais do grupo de 5% ($p < 0,01$) e 10% ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo controle.

Nos animais do grupo de 15%, foram observadas alterações bioquímicas, como o aumento nos níveis de glicose em ratos que receberam a dose mais alta e no grupo *pair feeding*. Também foi observado um aumento nos níveis séricos de triglicerídeos dos ratos deste grupo, quando comparado ao grupo controle (Tabela 5). Nos animais dos grupos de 5% e 10%, observou-se aumento do colesterol HDL.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos, tais como AST, ALT, GGT, fosfatase alcalina, LDH, globulina, proteína total, ureia e creatinina, através da ANOVA de uma via, não apresentou diferenças significativas entre os grupos quando comparados ao controle na análise estatística (Tabela 5).

Em relação ao peso relativo dos órgãos (g/100g PC), a análise estatística não mostrou diferenças significantes no peso do fígado, coração, baço, rins, pulmão e timo em comparação com o grupo controle (Tabela 6).

A análise histopatológica dos fragmentos de fígado, rins, bexiga, timo, baço e coração coletados na necropsia dos animais dos grupos experimentais (5%, 10% e 15%), controle e *pair feeding*, não apresentou alterações dignas de nota associadas às concentrações da farinha de mesocarpo de babaçu incorporadas na ração.

Tabela 6 - Peso relativo dos órgãos (fígado, coração, baço, rins, pulmões e timo) de ratos expostos a diferentes concentrações do mesocarpo de babaçu (5, 10 e 15%) adicionados na ração comparados com o grupo controle e grupo *pair feeding* durante 28 dias

Peso relativo de órgãos	<i>Pair feeding</i> (n = 10)	Controle (n = 10)	5% (n = 10)	10% (n = 10)	15% (n = 10)	Taconic, 2005*
Fígado	3,06 ± 0,09	3,42 ± 0,16	3,14 ± 0,13	3,12 ± 0,17	3,61 ± 0,22	2,75 ± 0,00
Coração	0,31 ± 0,005	0,32 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,31 ± 0,008	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,00
Baço	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,17 ± 0,00
Rins	0,60 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,52 ± 0,07	0,60 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,65 ± 0,00
Pulmões	0,52 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,05	0,48 ± 0,03	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,00
Timo	0,083 ± 0,003	0,086 ± 0,005	0,073 ± 0,011	0,088 ± 0,004	0,093 ± 0,004	-

Dados expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett (para dados paramétricos: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 *versus* grupo controle); ^aKruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunns (para dados não paramétricos %): *p < 0,05, **p < 0,01 *versus* grupo controle. Peso relativo de órgão = (peso do órgão/peso do animal) × 100. N= número de animais por grupo = 10 ratos

*TACONIC, 2005

Fonte: Própria autoria, 2018.

V-4 Discussão

A utilização de plantas medicinais é oriunda de uma cultura milenar, com o intuito de curar doenças das mais diversas. A população em geral pressupõe que todas as plantas medicinais, de uso tradicional, foram catalogadas e testadas como seguras para a saúde humana, devido à ampla divulgação da atividade biológica na medicina popular (LAPA et al., 2007).

Segundo Fukumasu et al. (2008) e Bruning, Mosegui e Viana (2012), o Brasil tem um aumento constante no consumo de fitoterápicos, fato que se intensifica em decorrência da ampla divulgação de dados, muitas vezes imprecisos e de fontes duvidosas pela imprensa. Dados esses acerca de trabalhos científicos, que demonstram algum efeito preventivo ou terapêutico das plantas medicinais. Essas informações, juntamente ao conhecimento da medicina popular, influenciam na geração de interpretações errôneas da população acerca da utilização de plantas medicinais, haja vista que essa situação gera a compreensão de que plantas medicinais, em formulações ou suplementos dietéticos, não são tóxicas nem prejudiciais à saúde humana, uma vez que são oriundas de compostos vegetais.

Ademais, em março de 2018 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o primeiro formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira. O intuito foi o de complementar e apoiar o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, estando assim em consonância com o Sistema Único de Saúde (SUS). Foi instituída uma lista de plantas de interesse do SUS, com 71 espécies vegetais utilizadas popularmente como fitoterápicos (ANVISA, 2007).

A Lei 5.991/73 suplementa a comercialização de produtos alimentares à base de plantas, e autoriza a comercialização de suplementos, quando comprovado seu controle de qualidade e a ausência de riscos para a saúde humana (BRASIL, 1973).

Sendo assim, estudar a toxicidade subaguda da farinha do mesocarpo de babaçu como suplemento alimentar é de suma importância, considerando que o babaçu (*Orbignya phalerata*) é uma das espécies vegetais listadas na RENISUS. Os principais achados deste estudo foram ausência de sinais de toxicidade, como pieloreção, diarreia e alterações de comportamento que caracterizassem um quadro toxicidade nas concentrações de 5, 10 e 15%. Também não foram observadas mortes nem alterações clínicas que pudessem sugerir um quadro de intoxicação subaguda relacionado à farinha do mesocarpo de babaçu adicionada na ração.

A farinha do mesocarpo de babaçu atualmente vem sendo incorporada em preparações que compõem dietas regionais, devido ao elevado teor de carboidratos, fibras, minerais, tais como sódio e potássio, e compostos fenólicos, como os flavonoides majoritários, as catequinas, epicatequinas e quercetinas (MORALES, 2012; PINHEIRO et

al., 2010). No estado do Maranhão, o Governo Federal criou uma política de incentivo ao uso do mesocarpo de babaçu como ingrediente incorporado na merenda escolar em algumas comunidades (MORALES, 2012; SOUZA et al., 2009). Devido à importância e ampla utilização desta farinha incorporada na alimentação infantil na região Norte e Nordeste brasileira, o presente estudo torna-se muito importante para avaliar os potenciais efeitos tóxicos da farinha do mesocarpo de babaçu.

Para avaliar a toxicidade causada pela administração contínua de substâncias químicas, parâmetros como consumo de ração e ganho de peso são úteis para mostrar a presença de sinais de intoxicação (STEVENS; GALLO, 1989). Na avaliação da adição da farinha do mesocarpo de babaçu na ração durante 28 dias, foi possível observar redução pontual no consumo de ração nos três grupos (5%, 10% e 15%). Já no grupo *pair feeding*, ocorreu redução no consumo de ração ao longo do período experimental.

O ganho de peso dos animais expostos às diferentes concentrações da farinha de mesocarpo de babaçu adicionada na ração se manteve na mesma faixa de peso que o grupo controle. No entanto, no grupo *pair feeding* ocorreu um aumento significativo no ganho de peso durante a última semana do experimento.

A manutenção do peso dos animais dos grupos experimentais (5%, 10% e 15%) pode estar associada a uma mudança/alteração do metabolismo celular, pois este efeito de provável aceleração no metabolismo pode ser associado ao consumo da farinha do mesocarpo de babaçu, quando considerada a composição da farinha, que tem 80% de carboidratos, minerais, proteínas e flavonoides (catequina, epicatequina e quercetina). O aumento de peso observado no grupo *pair feeding*, que consumiu a mesma quantidade de ração que o grupo de 15%, pode ser relacionado diretamente com os componentes da farinha.

Sabe-se que a redução de grelina (abundante na parede do endotélio gástrico do estômago) interfere diretamente na estimulação da secreção lactotrófica e corticotrófica, atividade orexígena acoplada ao controle do gasto energético, controle da secreção ácida e da motilidade gástrica (DATE et al., 2000; SMITH et al., 1997). Estudos em modelos animais indicam que esse hormônio desempenha importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético (NAKAZATO et al., 2001). Dessa forma, a farinha do mesocarpo de babaçu pode ter promovido uma redução na produção do hormônio grelina, o qual promove estimulação do apetite. Essa redução pode estar associada aos carboidratos, moléculas que reduzem a secreção deste hormônio.

A avaliação comportamental pelo teste de campo aberto foi introduzida em 1930, e este teste correlaciona a atividade motora e a defecação com emocionalidade nos animais (DENENBERG, 1969). Na atualidade, este teste é utilizado para avaliar respostas comportamentais, como atividade motora, comportamentos exploratórios e hiperatividade,

além de avaliar o estado emocional do animal, exposto ou não a uma substância química ou potencialmente tóxica (ARCHER, 1973; DENENBERG, 1969; RAMOS; MORMÈDE, 2006).

A atividade geral é um índice para avaliar as alterações comportamentais nos animais, não só pelas abordagens fisiológica e genética, mas também por interferências toxicológicas (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003).

Com exploração do animal no campo aberto, é possível determinar ansiedade (quando estímulos ansiogênicos são suficientes para indicar perigo), exploração (quando os estímulos ansiogênicos não são excessivos e promovem a redução do comportamento exploratório do animal), ou quando a arena deixa de ser um local novo a ser explorado pelo animal, apresentando, assim, uma interferência na atividade motora (SANDINI; UDO; SPINOZA, 2013).

Segundo Penke et al. (2001), a redução da locomoção pode ser um indicativo de aumento da ansiedade, representando, assim, um reflexo da hiperresponsividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Na avaliação comportamental pelo teste de campo aberto, foi possível observar um aumento no tempo de imobilidade dos animais dos grupos experimentais (5%, 10% e 15%) quando comparados ao grupo controle e ao grupo *pair feeding*; este aumento de imobilidade, principalmente no grupo de 15%, pode evidenciar um provável efeito ansiogênico. Contudo, mais estudos são necessários para concluir que esta alteração comportamental esteja diretamente relacionada com o consumo da farinha do mesocarpo de babaçu.

O teste do labirinto em cruz elevado foi descrito a partir de estudos realizados na década de 50. Sua proposta inicial é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, evidenciando um conflito de aproximação/esquiva (MONTGOMERY, 1952). Posteriormente, Pellow et al. (1985) aperfeiçoaram o modelo para ratos, sendo este amplamente utilizado na atualidade. Experimentos farmacológicos apontaram que a administração de agentes ansiolíticos produz aumento na exploração dos braços abertos, indicando diminuição dos níveis de ansiedade do animal (PELLOW et al., 1985).

No presente estudo, os parâmetros observados no labirinto em cruz elevado em ratos machos expostos às concentrações de 5%, 10% e 15% da farinha de mesocarpo de babaçu são mostrados na Tabela 2.1. Parâmetros tais como % EBA, % TBA, Tempo de B.A., Tempo de B.F., número de cruzamentos no centro (B.A.+ B.F.) e comportamento de risco não apresentaram diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, controle e *pair feeding* (Tabela 2.1).

As avaliações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, a nível sérico, são essenciais para investigar possíveis efeitos tóxicos nos tecidos e órgãos, causados pela exposição a agentes químicos ou substâncias potencialmente tóxicas. Na avaliação de toxicidade subaguda de 28 dias do mesocarpo de babaçu, foram encontradas diferenças

entre os grupos tratados (5%, 10% e 15%), quando comparados ao grupo controle e ao grupo *pair feeding* de alguns parâmetros – no hemograma, os leucócitos, e na bioquímica, os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL –; contudo, estes valores encontram-se dentro da variação fisiológica da espécie, de acordo com Giknis (2008), Lima et al. (2014), Moraillon et al. (2013) e Taconic (2005), e dentro da faixa etária utilizada nos experimentos (8-16 semanas).

Segundo Carvalho et al. (2009), em um estudo comparativo de parâmetros hematológicos de vários centros de pesquisa, foi possível constatar grandes variações desses parâmetros em ratos Wistar, evidenciando, assim, a dificuldade de fazer especulações sobre esses resultados, considerando vários quesitos, tais como condições sanitárias, anestésicos e manipulação, que podem alterar tanto parâmetros hematológicos como bioquímicos.

A necropsia não evidenciou nenhuma alteração macroscópica dos órgãos-alvo avaliados (coração, baço, timo, rins, fígado). Ao avaliar o peso relativo desses órgãos, também não foram observadas alterações significantes para estes parâmetros. Embora tenha ocorrido uma redução de leucócitos na avaliação hematológica e um aumento nos níveis séricos da glicose, triglicerídeos, HDL, pode-se considerar que a administração da farinha de babaçu adicionada na ração nas concentrações de 5%, 10% e 15% foi segura.

V-5 Conclusão

Este trabalho demonstrou que a administração do mesocarpo de babaçu nas concentrações de 5%, 10% e 15% durante 28 dias na avaliação da toxicidade subaguda não causou efeitos tóxicos ou neurotóxicos em ratos. Este estudo mostrou que a farinha do mesocarpo de babaçu pode alterar o metabolismo celular de gordura dos animais, possivelmente por meio da ação do hormônio grelina. Logo, estudos futuros são necessários para investigar se a farinha do mesocarpo de babaçu tem ação direta na redução de peso corporal e consequentemente na redução da formação de adipócitos, metabolismo de absorção de gordura e ácidos graxos.

V- Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processos nº 2016/13460-8 e nº 2015/04729-0 - pela bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processo nº 306317/2016-8.

V- Referências

AFOLABI, T. A. et al. Functional and tableting properties of acetylated and oxidised finger millet (*Eleusine coracana*) starch. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 64, n. 4, p. 326-337, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **A realidade e o futuro do controle de qualidade de alimentos e fitoterápicos**. Brasília, DF: ANVISA, 2007.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed. Washington: AOAC, 1990.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, London, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

AZEVEDO, A. P. S. et al. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 111, p. 155-159, 2007.

BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Evaluation of acute toxicity of babassu mesocarp in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, p. 710-714, 2011.

BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Immunomodulatory and antimicrobial activity of Babassu mesocarp improves the survival in lethal sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2016, 2859652, 2016.

BELZUNG, C. Measuring rodent exploratory behavior. **Techniques in the Behavioral and Neural Sciences**, Amsterdam, v. 13, p. 738-749, 1999.

BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 73, n. 2, p. 171-175, 1981.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 65, n. 3, p. 247-250, 1979.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº. 5.991. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 17 jan. 1973.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 2675-2685, 2012.

BUGNO, A. et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 491-497, 2005.

CARNEIRO, A. P. M. et al. Farelo de babaçu em rações para frangos de corte na fase final: desempenho, rendimento de carcaça e avaliação econômica. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v. 10, n. 1, p. 40-47, 2009.

CARVALHO, G. D. et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

CINELLI, B. A. et al. Granular starch hydrolysis of babassu agroindustrial residue: A bioprocess within the context of biorefinery. **Fuel**, Oxford, v. 124, p. 41-48, 2014.

CRUSIO, W. E.; GERLAI, R. T. **Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behavior research**. New York: Elsevier, 1999.

DATE, Y. et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. **Endocrinology**, Cary, v. 141, n. 11, p. 4255-4261, 2000.

DE SMET, P. A. G. M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Hoboken, v. 76, n. 1, p. 1-17, 2004.

DENENBERG, V. H. Open-field behavior in the rat: What does it mean? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 159, n. 3, p. 852-859, 1969.

FUKUMASU, H. et al. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 49-59, 2008.

GIKNIS, M. L. A. **Clinical laboratory parameters for Crl:WI(Han)**. Wilmington: Charles River, 2008.

GIVEON, S. M. et al. Are people who use “natural drugs” aware of their potentially harmful side effects and reporting to family physician? **Patient Education and Counseling**, Shannon, v. 53, n. 1, p. 5-11, 2004.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Philadelphia, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

KARL, T.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Muenchen, v. 55, n. 1, p. 69-83, 2003.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. cap. 11, p. 247-262.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, Itabaiana, v. 10, n. 3, p. 034601, 2014.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, Hoboken, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

MANIGLIA, B. C.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 55, p. 47-55, 2016.

MONTGOMERY, K.C. Exploratory behavior and its relation to spontaneous alternation in a series of maze exposures. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, Washington, v. 45, p. 50-57, 1952.

MORAILLON, R. et al. **Manual elsevier de medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2013.

MORALES, E. M. **Viabilidade de obtenção de alimento funcional a base de farinha de mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp.*) e folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) mediante fermentação por *Rhizopus microsporus var. oligosporus*.** 2012. 69 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2012.

MOSAFERI, B. et al. Post-weaning environmental enrichment improves BDNF response of adult male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, kidlington, v. 46, p. 108-114, 2015.

NAKAZATO, M. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, London, v. 409, n. 6817, p. 194, 2001.

NAOZUKA, J. et al. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 1667-1672, 2011.

NRC. US National Research Council. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington, DC: National Academies Press, 2010.

OECD. **Guideline for testing of chemicals**: repeated dose 28-day oral toxicity in rodents. Test No. 407, adopted in 1981, and revised method adopted 3rd October 2008. OECD, Paris, 2008.

PAVLACK, M. C. M. et al. Aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 1, p. 7-24, 2007.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 149-167, 1985.

PENKE, Z. et al. Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behavior in the rat. **European Journal of Neuroscience**, Chichester, v. 14, n.4, p. 747-755, 2001.

PINHEIRO, M. M. G.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: evidence for the involvement of apigenin. **Life Sciences**, Oxford, v. 91, n. 9-10, p. 293-300, 2012.

PINHEIRO, M. T. et al. Efeito do mesocarpo de babaçu no metabolismo de carboidratos em camundongos de diferentes linhagens. **Revista de Ciências da Saúde**, São Luis, v. 12, p. 10-14, 2010.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. In: JONES, B. C.; MORMÈDE, P. **Neurobehavioral Genetics**: methods and applications. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 291.

ROCHA, L. O.; SOARES, M. M. S. R.; CORRÊA, C. L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 521-527, 2004.

SANDINI, T. M.; UDO, M. S. B.; SPINOSA, H. S. *Senecio Brasiliensis* e alcalóides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Revista Biotemas**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 83-92, 2013.

SILVA, A. P. S. **Caracterização físico-química e toxicológica do pó de mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart):** subsídio para o desenvolvimento de produtos. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SMITH, R. G. et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. **Endocrine Reviews**, Cary, v. 18, n. 5, p. 621-645, 1997.

SOUZA, M. G. et al. Determinação de As, Cd e Pb em amêndoas e mesocarpo de babaçu, sapucaia, xixá e castanha-do-pará por espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1442-1446, 2009.

SOUZA, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 133, p. 1-5, 2011.

STEPHENS, D. N. et al. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, Heidelberg, v. 90, n. 2, p. 166-169, 1986.

STEVENS, K. R.; GALLO, M. A. Practical consideration in the conduct of chronic toxicity studies. In: HAYES, A. W. (Ed.). **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 237.

TACONIC. **Control data of BrlHan: WIST@Tac(GALAS)** Rat. Taconic Bioscience Inc., 2005.

TREMML, P. et al. Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified β -amyloid precursor protein gene. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 65-76, 1998.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 2 ed. Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.

VINHAL, J. O.; LIMA, C. F.; BARBOSA, L. C. Analytical pyrolysis of the kernel and oil of babassu palm (*Orbignya phalerata*). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 107, p. 73-81, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.02.005>.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A.; BUDTZ-OLSEN, O. E. Environmentally induced changes in the dimensions of the rat cerebrum: a replication and extension. **Developmental Psychobiology**: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology, Hoboken, v. 6, n. 1, p. 3-7, 1973.

YULIANA, M. et al. Defatted cashew nut shell starch as renewable polymeric material: Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 87, n. 4, p. 2576-2581, 2012.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz: Núcleo de Informação e Tecnologia, 2008.

CAPÍTULO VI: Efeito do extrato do mesocarpo de babaçu na inflamação induzida por carragenina (edema de pata) em ratos

Naila Albertina de Oliveira¹, Thaisa Meira Sandini², Leonilda Ester Reinert Raspantini³, Elaine Cristina Lanzoni Martinelli³, Cláudia Madalena Cabrera Mori³, Alessandra Lopes de Oliveira¹, Heidge Fukumasu^{4*}

¹LTAPPN, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

²Departamento de fisiologia, Universidade Saskatchewan, Saskatoon, Canadá. ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ⁴Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: fukumasu@usp.br. Telefone: +55 1935656864.

VI- Resumo

O babaçu (*Attalea speciosa* ou *Orbignya phalerata* Mart.) é uma planta nativa das regiões Norte e Nordeste do Brasil e amplamente utilizado na medicina popular. O mesocarpo de babaçu é usado principalmente como complemento alimentar, no tratamento de feridas cutâneas, tratamento de doenças inflamatórias, entre outras. Este extrato é rico em compostos com atividade biológica, sendo eles catequina, epicatequina e quercetina. Estes flavonoides são responsáveis por reduzir o processo inflamatório, atuando diretamente nas citocinas, quimiocinas e prostaglandinas. Sendo assim, o principal intuito deste estudo foi avaliar a ação da *Orbignya phalerata* Mart. no processo inflamatório induzido em ratos Wistar, com o objetivo de determinar a atividade anti-inflamatória do extrato do mesocarpo. Foram utilizados 12 ratos Wistar e a indução da inflamação foi realizada pela administração de carragenina a 3% na superfície dorsal da pata do membro posterior direito. Foi possível observar a redução do edema ao longo das 6 horas de experimento; contudo, esta redução foi significativa a partir da 5ª hora após o tratamento com a dose de 30 mg/kg de extrato de mesocarpo de babaçu ($p < 0,05$). Na avaliação hematológica, não foram observadas alterações na série vermelha nem na série branca. Portanto, foi possível evidenciar a atividade anti-inflamatória do extrato de mesocarpo de babaçu.

Palavras-chave: Atividade biológica. *Orbignya phalerata*. Atividade anti-inflamatória.

VI-1 Introdução

O babaçu (*Attalea speciosa* ou *Orbignya phalerata* Mart.) é o nome genérico das palmeiras oleaginosas brasileiras da família *Arecaceae*, sendo comumente encontrada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Contudo, esta palmeira também pode ser localizada nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (REIS et al., 2017). O mesocarpo de babaçu é obtido a partir do coco e seu processamento gera um produto seco e moído. Após seu processamento, a farinha é comercializada como suplemento alimentar para adultos e crianças, bem como empregada para fins cosméticos e medicinais (BARROQUEIRO et al., 2016; SOUZA et al., 2011).

De acordo com Reis et al. (2017), na medicina popular o coco de babaçu tem ampla descrição de propriedades biológicas, as quais foram evidenciadas pelas comunidades nas áreas de maior prevalência do fruto. Segundo Barroqueiro et al. (2016), o mesocarpo de babaçu apresentou atividade antimicrobiana eficaz no tratamento de sepse por *Staphylococcus aureus* em ratos Wistar. Além disso, propriedades antitumorais (FORTES et al., 2009; RENNÓ et al., 2008), antitrombóticas (AZEVEDO et al., 2007) e atividade anti-inflamatória (DE SOUZA et al., 2011; REIS et al., 2017) foram atribuídas ao mesocarpo de babaçu. Do mesmo modo, o mesocarpo é capaz de induzir a liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos, sugerindo um efeito imunológico na ativação de macrófagos (DA SILVA; PARENTE, 2001), atuando também na produção de citocinas, indicando um efeito imunomodulador (GUERRA et al., 2011).

A inflamação é um processo biológico crucial que tem sido implicado em várias doenças crônicas como o câncer (COLOTTA et al., 2009), arteriosclerose (RAMJI; DAVIES, 2015), diabetes tipo II (VENIGALLA et al., 2016) e doenças cardiovasculares (DICK; EPELMAN, 2016). Os tratamentos atuais para doenças inflamatórias baseiam-se principalmente no uso de drogas anti-inflamatórias esteroidais e não-esteroidais (AINEs) (GUNAWARDENA et al., 2014), que frequentemente refletem a gravidade e a capacidade de resposta da inflamação ao regime terapêutico específico. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) modulam seu efeito anti-inflamatório impedindo a síntese de prostaglandinas (PGs) por meio da inibição das enzimas ciclooxigenase (COX), que catalisam a conversão do ácido araquidônico em PGs (AURIEL; REGEV; KORCZYN, 2014; SEIBERT et al., 1997; VANE; BOTTING, 1998). No entanto, as opções atuais de AINEs têm sido associadas a diversos efeitos adversos tais como aumento da pressão arterial, aumento do risco de insuficiência cardíaca congestiva, ocorrência de trombose e também podem predispor os pacientes à erosão gastrointestinal grave (AISEN et al., 2003; MCMURRAY; HARDY, 2002). Estes efeitos colaterais são comuns a quase todos os AINEs em algum grau (VANE; BOTTING, 1998). Sabe-se que os medicamentos anti-inflamatórios

estão entre os medicamentos mais consumidos, com mais de 70 milhões de prescrições e 30 bilhões de comprimidos de AINEs vendidos no mercado a cada ano (MAROON et al., 2006). Dessa forma, há uma necessidade imprescindível em providenciar fontes mais seguras de novos medicamentos anti-inflamatórios.

Os anti-inflamatórios esteroidais também apresentam muitas desvantagens, incluindo efeitos imunossupressores, bem como a resistência de muitas doenças, tais como câncer e doenças inflamatórias agudas associadas a esses medicamentos (BARNES, 2006, 2010). Os produtos naturais apresentam componentes importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e há evidências de que estes possam ser uma fonte alternativa de agentes anti-inflamatórios com menos efeitos colaterais (BARNES, 2006).

Além disso, demonstrou-se que a interação entre os fatores inflamatórios (como o NF- κ B, COX-2, IL-1, TNF- α e PGE 2) e os flavonoides presentes nos produtos vegetais melhoram as doenças inflamatórias. Isso porque atuam diretamente nos mediadores inflamatórios, justificando assim a utilização de extratos oriundos de plantas no desenvolvimento de novos fitoterápicos.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu extraído via etanol pressurizado, utilizando técnica de extração líquida pressurizada (PLE), por meio da indução do processo inflamatório com carragenina (edema de pata).

VI-2 Material e Métodos

VI-2.1 Extração do mesocarpo de babaçu

O mesocarpo de babaçu usado como matéria-prima foi proveniente da cidade de Teresina (latitude: 05° 05' 21" S, longitude: 42° 48' 07" W), no estado do Piauí, coletada em junho de 2016 e fornecida pela incubadora de empresas BABACOAL (Teresina, BR), com sede na Universidade Federal do Piauí.

A extração do mesocarpo de babaçu foi realizada com etanol anidro (Panreac, Barcelona, ES) no extrator com solvente acelerado - ASE Dionex, 150® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), em uma célula de extração de 34 mL nas condições de T = 86 °C, tempo de contato de solvente com a amostra (St) de 3 min, volume de solvente 100% SV, 3 ciclos/bateladas e pressão de 10,34 Mpa; tais condições foram determinadas em ensaios preliminares. Após a extração etanólica, o extrato foi seco com N₂ e armazenado em Freezer -20 °C (Brastemp, São Bernardo do Campo, BR).

VI-2.2 Quantificação de flavonoides

A extração dos flavonoides do extrato do mesocarpo de babaçu foi realizada segundo Arabbi, Genovese e Lajolo (2004), com adaptações. As amostras foram extraídas com metanol (grau cromatográfico):água deionizada Milli-Q (40:60) (Panreac, Barcelona, ES), (Millipore, Burlington, USA), armazenado em freezer -20 °C (Brastemp, São Bernardo, BR) na proporção de 1:200 (m/v), através da utilização do Ultra-Turrax (IKA, Wilmington, USA), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro Whatman (GE, Barcelona, ES) nº 6. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes. Para concentração dos extratos foi utilizado rotaevaporador (Marconi, Piracicaba, BR) acoplado a um banho termostatzado, no qual a temperatura foi regulada a 40 °C. As amostras concentradas, já sem metanol, tiveram o seu volume ajustado com adição de água em um balão volumétrico de 25 mL e posteriormente purificada em filtro de 0,45µm (Waters, Milford, USA). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol, 20 mL de ácido fórmico e 60 mL de água. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol (grau cromatográfico) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore, Burlington, USA) de 0,22 µm. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonoides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para a quantificação dos flavonoides, estes foram separados por uma coluna C 18 250 x 4,60 mm, 5 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), de acordo com Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). Foi utilizado um gradiente de solventes constituído por ácido fórmico 0,2%(Merck/Millipore, Burlington, USA):metanol grau HPLC (Panreac, Barcelona, ES) (70:30). O fluxo usado foi de 0,6 mL/min a 25 °C. A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção, dos espectros de absorção do UV com detecção de 270nm (quercetina), 272nm (catequina) e 278nm (epicatequina). Para quantificação dos flavonoides, foi utilizada a padronização externa, através da comparação de áreas de cada pico da amostra com as áreas obtidas na análise de soluções padrões com concentrações conhecidas. Através de um gráfico de comparação, as áreas obtidas foram correlacionou com as suas respectivas soluções previamente preparadas com os padrões de catequina e epicatequina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nas concentrações de 0,32, 0,16, 0,08, 0,04 e 0,02 mg/mL e, para a quercetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), as concentrações foram de 0,088, 0,044, 0,017, 0,008 e 0,004 mg/mL. As curvas de calibração foram feitas com os compostos acima no mesmo método usado para a análise das amostras. Os resultados foram expressos em mg por 100g de amostra.

VI-2.3 Animais

Foram utilizados 12 ratos Wistar, com 8 semanas de idade, provenientes do biotério do Centro de Toxicologia Veterinária (CEPTOX), Pirassununga/SP, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas; a fase clara foi iniciada diariamente às 6 h da manhã. As condições de temperatura (20 ± 4 °C) foram controladas, assim como a umidade relativa ($55 \pm 10\%$). Os animais foram mantidos em gaiolas abertas de polipropileno ($41 \times 34 \times 16$ cm), com tampas de inox altas (Beiramar®, São Paulo, BR), mantidas em estantes ventiladas (Alesco® – Monte Mor, BR), em sala climatizada. Foram alocados 2 animais por gaiola, favorecendo assim o contato visual entre eles devido à divisão metálica alocada nas caixas. A alimentação dos animais consistiu em ração comercial (Nuvilab CR1®, Quimtia, Curitiba, BR) e água filtrada, em condições *ad libitum*. A habituação dos animais às condições experimentais foi realizada durante um período de 20 dias anteriores ao início da administração dos extratos do mesocarpo de babaçu. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com as orientações éticas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FZEA/USP, representado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (CEUA/FZEA), sob a aprovação do protocolo nº 2679030216 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP, representado pela CEUA/FMVZ, sob aprovação do protocolo nº 6703030217. As diretrizes de bem-estar dos animais foram adotadas para os estudos de acordo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e o Uso de Animais para Fins Científicos e Didáticos (BRASIL, 2013).

VI-2.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

VI-2.4.1 Administração do extrato de mesocarpo de babaçu

Antes da indução do processo inflamatório com solução de carragenina a 3%, os animais em jejum foram pré-tratados com 30 mg/kg, dose escolhida de acordo com a concentração de catequina, epicatequina e quercetina de extrato do mesocarpo de babaçu administrado por sondagem gástrica (gavagem) em dose única; a administração foi realizada 1h antes da indução do edema. Este extrato foi produzido a partir de testes preliminares da extração líquida pressurizada (PLE) com etanol absoluto pressurizado nas condições de $T = 86$ °C e $St = 3$ min, condição otimizada descrita no item III-3.5 do Capítulo III.

VI-2.4.2 Bloqueio do nervo ciático

Posteriormente, os animais foram sedados com 1 mg/kg de acepromazina 1% (Aceprom ® Vetnil, Louveira, BR) e, após 10 min, os animais foram submetidos ao procedimento de bloqueio do nervo ciático, sob restrição mecânica suave (Figura 1A), com 1,8 mL cloridrato de bupivacaína 0,50% (Cristália, Itapira, BR) (135 mg/kg), utilizando uma seringa para anestesia odontológica (Injex®, Ourinhos, BR) com agulha ultrafina (Figura 1B). Dez minutos após a injeção perineural, foi possível confirmar a interrupção do estímulo nervoso através da perda do movimento do membro (Figura 1C) (MONTEIRO, 2016).

Figura 1 - Bloqueio do nervo ciático com cloridrato de bupivacaína (A) contenção, (B) aplicação do anestésico no nervo ciático, (C) nervo anestesiado

Fonte: Própria autoria, 2018.

VI-2.4.3 Edema de pata de ratos induzido por carragenina

A inflamação foi induzida com 0,1 mL de solução de carragenina 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), a qual foi preparada com 30 min de antecedência, diluída em solução salina 0,09% (Synth, Diadema, BR). A carragenina foi injetada com o auxílio de seringa e agulha de insulina na superfície dorsal da pata do membro posterior direito. Este procedimento foi realizado após a confirmação do bloqueio do nervo ciático. Ao longo do período experimental (6 horas), novas doses do anestésico local foram administradas sempre que o animal iniciava a recuperação do movimento do membro posterior direito, fato observado apenas em um animal do grupo controle (MONTEIRO, 2016).

A superfície dorsal da pata do membro posterior direito de todos os animais foram medidas antes da indução do edema e essa medida foi considerada como tempo 0 (MONTEIRO, 2016).

Para monitorar o desenvolvimento da inflamação, as circunferências plantares do membro injetado, antes da administração subcutânea da solução de carragenina (3%), foram consideradas como registros basais do volume da pata do membro posterior direito de todos os animais e identificados como “tempo zero”. O aumento de volume causado pela reação inflamatória do tecido dos animais foi calculado pela diferença entre o valor registrado pelo pletismômetro (Figura 2) (Ugo Basile, Varese, Itália) e o registrado no “tempo zero”. Durante seis horas, foi monitorado o aumento no volume da pata dos grupos experimentais e controle. As medidas foram reportadas em mL, no nível do metatarso. Para cada animal, as medições foram feitas duas vezes por dois avaliadores distintos (sendo realizadas 4 medidas para cada tempo) nos intervalos de tempo de 0, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 h após a indução do edema. As medidas foram expressas em média $\pm$ erro padrão da média (PERROT; GUILBAUD; KAYSER, 1999).

Figura 2 - Pletismômetro usado na avaliação do edema de pata

Fonte: Disponível em: <<http://www.cebiolog.com.br/pletismocircmetro.html>>

VI-2.5 Análises hematológica e histológica

A coleta de sangue foi realizada com os ratos previamente anestesiados com cloridrato de xilazina (Vetnil, Louveira, BR) (5,0 mg/kg/animal) e cloridrato de cetamina (Vetnil, Louveira, BR), (50 mg/kg/animal), concomitantemente por via intraperitoneal. Os animais foram submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca, a qual foi efetuada com seringas (BD, Plastipak, Curitiba, BR) e agulhas (BD, Plastipak, Curitiba, BR), ambas descartáveis. Após a coleta de sangue, a eutanásia de todos os animais do estudo ocorreu através de exsanguinação por punção cardíaca.

A análise de hemograma foi realizada com uma alíquota de sangue com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (BD, Plastipak, Curitiba, BR), a qual foi analisada no aparelho automático Horiba, ABX Diagnostics Blood Center (Vet- ABCTM Animal, Montpellier, FR), para a emissão dos valores de cada componente analisado da amostra.

A coloração de Rosenfeld (Dinâmica Química, Diadema, BR) foi utilizada na pigmentação das lâminas, as quais foram utilizadas para a contagem de diferencial de leucócitos. Durante o procedimento de coloração para a contagem de células, as lâminas foram colocadas em um suporte de coloração e recobertas com 20 gotas do corante Rosenfeld. Após 3 minutos, foram adicionadas 20 gotas de água destilada e, em seguida, a mistura (água/corante) foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 3 min; subsequentemente, a lâmina foi lavada com água corrente e seca em posição vertical.

Na necropsia, a superfície dorsal da pata do membro posterior direito dos animais foi avaliada macroscopicamente com o intuito de detectar possíveis lesões. Tais tecidos foram fixados em formol a 10%, tamponado e preparado com formaldeído (Dinâmica Química, Diadema, BR). Após 48h, os tecidos foram transferidos para um frasco com álcool etílico 70% (Dinâmica Química, Diadema, BR). Após a fixação, os tecidos foram seccionados entre a II e III falange e submetidos a processo de descalcificação em solução aquosa a 5% de ácido fórmico (Synth, Diadema, BR), tamponada com ácido cítrico (Synth, Diadema, BR). Subsequentemente, os materiais foram desidratados com álcool 60, 70, 80, 90 e 100%, xilol I e II e posteriormente emblocados em parafina para a inclusão de tecidos. Cortes transversais de 6 µm foram corados com hematoxilina (Leica, Wetzlar, DE) e eosina (Leica, Wetzlar, DE) para realização das mensurações. A avaliação histológica foi realizada em microscópio óptico (Nikon, eclipse 50 i, Tóquio, JP).

Para a quantificação do número de neutrófilos na derme da região do tarso-metatarso, cinco campos aleatórios de cada região da derme na face dorsal do tarso-metatarso foram fotografados em aumento de 400x por meio de microscopia óptica de campo claro. Através do software ImageJ (NIH - National Institute of Health, Bethesda, USA) (SCHINDELIN et al., 2015), foram contados o número de neutrófilos por campo de cada um dos animais dos diferentes grupos. Os valores foram apresentados em número de neutrófilos por campo de 400x.

VI-2.6 Análise estatística

Para análise dos resultados dos experimentos com animais, foi empregado o programa estatístico GraphPad Prism 7.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos por média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Para avaliar a inflamação do edema da pata induzida por carragenina, foi utilizada a análise de variância

de duas vias (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. Para análise paramétrica, foi utilizado o teste t de Student. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

VI-3 Resultados

VI-3.1 Extração e preparo do extrato do mesocarpo de babaçu

No dia da administração, os extratos do mesocarpo de babaçu foram diluídos em 2 mL de água destilada. Após a completa diluição (Figura 3), os extratos PLE de mesocarpo de babaçu foram utilizados para tratar os animais. Este extrato apresentou a composição de fenólicos totais de 1.257,25 mgGAE/100g de pó da farinha do mesocarpo. Na Figura 1, a coloração marrom avermelhada é atribuída aos compostos fenólicos.

Figura 3 - Extrato de mesocarpo de babaçu diluído

Fonte: Própria autoria, 2018.

VI-3.2 Quantificação de flavonoides do extrato de mesocarpo de babaçu

O perfil cromatográfico do extrato do mesocarpo de babaçu (impressão digital) foi obtido por CLAE (Figura 4). Os cromatogramas confirmaram a catequina como constituinte principal, seguida da epicatequina e quercetina. Comparando o cromatograma do extrato com o obtido da substância pura, é possível confirmar a presença dos flavonoides quantificados.

A identificação dos flavonoides consistiu na comparação do espectro de absorção UV com padrões comerciais de catequina, epicatequina e quercetina, que podem ser observados nos cromatogramas da Figura 4 (A) e (B).

Figura 4 - Cromatogramas da identificação da quercetina 270nm (A) e catequina 272nm e epicatequina 278nm (B) no extrato do mesocarpo de babaçu

(A)

(B)

Fonte: Própria autoria, 2018.

O composto encontrado em maior quantidade foi a catequina (768,78 mg/100g de extrato), seguido da epicatequina (264,91 mg/100g de extrato) e quercetina (24,60 mg/100g de extrato), respectivamente, como pode ser observado na Tabela 1. Esses dados foram utilizados para definição da dose administrada nos animais submetidos ao processo inflamatório induzido por carragenina através do edema de pata.

Tabela 1 - Quantidade de flavonoides no extrato do mesocarpo de babaçu

Flavonoide	mg/100g de extrato	mg/100g de pó	Dose administrada
Catequina	768,78	23,07	7,68 mg
Epicatequina	264,91	7,95	2,65 mg
Quercetina	24,60	0,74	0,25 mg

Fonte: Própria autoria, 2018.

VI-3.3 Avaliação da resposta inflamatória

Antes da administração de carragenina, os registros basais do tamanho (em mm) da pata do membro posterior direito de todos os animais foram realizados e identificados como “tempo zero”. O aumento do diâmetro do membro posterior direito ocasionado pela reação inflamatória do tecido dos animais foi avaliado e mensurado durante seis horas, período durante o qual foi possível monitorar a redução e o aumento do tamanho da pata de todos os grupos experimentais, como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Edema de pata dos animais do grupo experimental, sendo 6 animais controle e 6 animais experimentais, tratados com 30 mg/kg de extrato de mesocarpo de babaçu comparados ao grupo controle (solução salina)

Fonte: Própria autoria, 2018.

Na avaliação do edema de pata, foi possível observar que os animais tratados com o extrato do mesocarpo de babaçu apresentaram redução do tamanho do edema no membro posterior direito quando comparados com o grupo controle. Foi possível observar redução do tamanho do volume de edema (mL) entre os grupos na quinta hora após tratamento (Figura 5; $p < 0,01$) e sexta hora (Figura 5; $p < 0,05$). O bloqueio do nervo ciático antes da aplicação de carragenina não interferiu na resposta inflamatória ou no efeito anti-inflamatório do extrato do mesocarpo de babaçu, pois foi possível observar a evolução do edema durante o período avaliado, a redução do processo inflamatório nas primeiras horas e o aumento da pata, que ocorreu novamente após a redução do efeito do extrato do mesocarpo de babaçu na 5ª hora.

A utilização do bloqueio do nervo ciático proporcionou conforto aos animais, pois agiu bloqueando a condução do estímulo de dor. Outro fator relevante a ser considerado é o refinamento do protocolo experimental, preservando o bem-estar dos animais e reduzindo as alterações causadas pelo estresse.

VI-3.4 Análises hematológica e histológica

Os resultados referentes à avaliação dos parâmetros hematológicos, provenientes dos animais expostos ao tratamento com o extrato de mesocarpo de babaçu, comparados ao grupo controle (Tabela 2), não mostrou diferenças significantes nos parâmetros avaliados. Dessa forma, pode-se inferir que a administração de 30 mg/kg do extrato do mesocarpo de babaçu nesta dose não causou alterações hematológicas.

Tabela 2 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de mesocarpo de babaçu nos parâmetros hematológicos (série vermelha) de machos

Parâmetros hematológicos	Controle (n = 8)	30 mg/kg (n = 8)	Giknis (2008)*
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	$8,30 \pm 0,18$	$8,39 \pm 0,24$	05/out
Hemoglobina (g/dL)	$14,58 \pm 0,31$	$14,48 \pm 0,34$	13,70 - 17,60
Hematócrito (%)	$44,61 \pm 0,99$	$44,20 \pm 1,40$	39,60 - 52,50
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$664,40 \pm 23,44$	$644,30 \pm 19,55$	638 - 1177
VCM (μm^3)	$53,63 \pm 0,18$	$52,88 \pm 0,35$	48,90 - 57,90
HCM (pg)	$17,55 \pm 0,19$	$17,25 \pm 0,26$	17,10 - 20,40
CHCM (g/dL)	$32,65 \pm 0,34$	$32,81 \pm 0,46$	32,90 - 37,50

Dados expressos como média $\pm$ erro médio. Estes dados foram analisados pela ANOVA de uma via ($p < 0,05$). Volume corpuscular médio (VCM); Hemoglobina corpuscular média (HCM); Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). *Dados de referência para ratos Wistar na idade de 8-16 semanas.

Fonte: Própria autoria, 2018.

A análise dos parâmetros hematológicos pode evidenciar a presença ou ausência de alterações nas células sanguíneas. Esses parâmetros embasam a avaliação de alterações relacionadas ao processo inflamatório, que alteram a porcentagem de leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 3 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de mesocarpo de babaçu nos parâmetros hematológicos (série branca) de machos

Parâmetros hematológicos	Controle (n = 8)	30 mg/kg (n = 8)	Giknis (2008)*
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$8,30 \pm 0,22$	$8,25 \pm 0,33$	1,13 - 7,49
Monócito (%)	$1,14 \pm 0,26$	$1,87 \pm 0,61$	0,80 - 3,90
Linfócito (%)	$39,71 \pm 4,07$	$38,00 \pm 2,78$	62,2 - 90,00
Neutrófilos (%)	$59,14 \pm 3,90$	$60,13 \pm 2,54$	7,10 - 33,20

Dados expressos como média $\pm$ erro médio. Estes dados foram analisados pela ANOVA de uma via ($p < 0,05$). Dados de referência para ratos wistar na idade de 8-16 semanas.

Fonte: Própria autoria, 2018.

Ao avaliar a Tabela 3, pode-se verificar que, ao comparar o leucograma com dados de literatura Giknis (2008), não houve alterações em todos os animais do experimento, tanto no grupo experimental como no grupo controle.

A intensidade da imagem dos neutrófilos foi examinada visualmente para avaliação semi-quantitativa usando o ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Maryland, USA). Ao avaliar o número de neutrófilos por campo dos grupos experimentais e controle (Figura 6), foi possível verificar que os animais tratados com o extrato apresentaram redução ($p < 0,01$) de neutrófilos por campo quando comparados com o controle, evidenciando redução no processo inflamatório.

Figura 6 - Redução do número de neutrófilos por campo do grupo experimental e do grupo controle

Fonte: Própria autoria, 2018.

VI-4 Discussão

O presente estudo é o primeiro a descrever a identificação e quantificação dos flavonoides majoritários e reportar a atividade anti-inflamatória do extrato do mesocarpo de babaçu extraído via PLE com etanol pressurizado. Flavonoides são polifenóis, substâncias encontradas em abundância em plantas e frutas. O extrato do mesocarpo de babaçu é rico em flavonoides, substâncias responsáveis pela atividade antioxidante, anti-carcinogênica, antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória (KHAN; MUKHTAR, 2007; LAKENBRINK et al., 2000; ZAVERI, 2006). A redução do processo inflamatório está diretamente ligada a estes compostos, que são responsáveis pela redução de mediadores inflamatórios, tais como COX-2 e TNF- α (LAKENBRINK et al., 2000; ZAVERI, 2006).

Segundo Lakenbrink et al. (2000), Rahman, Biswas e Kirkham (2006) e Bastos, Rogero e Arêas (2009), as catequinas possuem efeito anti-inflamatório, uma vez que diminuem a atividade da proteína IKK envolvida na fosforilação do IKB- α .

Consequentemente, diminui o efeito sobre a sinalização do NF- κ B, reduzindo a expressão gênica da enzima COX-2. A quercetina também atua na redução da expressão gênica da COX-2 e iNOS, pelo mecanismo de diminuição da translocação do fator de transcrição NF- κ B do citoplasma para o núcleo.

No edema de pata, foi possível observar que a eliminação da dor pelo bloqueio do nervo ciático com cloridrato de bupivacaína não prejudicou a evolução do edema após a injeção de carragenina. Em princípio, mesmo que o bloqueio do nervo periférico possa interferir no componente neurogênico da inflamação, ele não comprometeu a evolução do início da cascata inflamatória, haja vista que parâmetros como o tamanho da pata ao longo do período de 6h e o número de neutrófilos mantiveram-se aumentados no grupo controle e reduzidos no grupo tratado com a dose de 30 mg/kg do extrato do mesocarpo de babaçu. Este comportamento é semelhante ao que ocorre em experimentos nos quais anti-inflamatórios são testados utilizando o protocolo de indução do processo inflamatório com carragenina induzindo, assim, o edema de pata.

A atividade anti-inflamatória induzida por carragenina foi escolhida por ser muito estudada em modelos de inflamação e possuir um mecanismo de ação aguda e diretamente relacionada com diversos mediadores químicos, tais como a histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (GARCIA-PASTOR et al., 1999; VINEGAR et al., 1987). Outros fatores bem definidos em relação ao processo inflamatório são caracterizados pela infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), liberação de prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico, além da formação de espécies reativas, diretamente envolvidas no processo de patogênese da inflamação e infecções (KATHIRAVAN; SHWETHA, 2012).

A atividade anti-inflamatória do extrato do mesocarpo de babaçu foi confirmada pela redução do volume da pata ao longo das 6 horas avaliadas após a indução do edema, sendo possível sugerir que as catequinas, epicatequinas e quercetinas contidas no extrato do mesocarpo de babaçu atuaram diretamente nos mediadores inflamatórios, reduzindo, assim, o edema e o número de neutrófilos. Outra hipótese a ser considerada é que o extrato do mesocarpo de babaçu possa ter promovido uma redução dos mecanismos anti-inflamatórios, atuando na inibição da síntese de prostaglandinas, células as quais são responsáveis pelo aumento na permeabilidade capilar, estimulando, dessa forma, a atividade da fagocitose de restos celulares resultantes do processo inflamatório originado pelos macrófagos (DE MOURA SPEROTTO et al., 2018).

As catequinas são substâncias que apresentam alta biodisponibilidade na corrente sanguínea, aproximadamente de 77 a 90% (CHEN et al., 1997). Este flavonoide é o composto majoritário no extrato. Portanto, é possível inferir que a disponibilidade destas moléculas na forma livre no plasma elucida a importância da utilização deste extrato como

um possível fitoterápico anti-inflamatório, uma vez que o extrato do mesocarpo de babaçu é rico em compostos fenólicos, e principalmente em catequinas, epicatequinas e quercetinas.

A redução significativa do edema da pata dos animais indicou que a dose de 30 mg/kg do extrato do mesocarpo de babaçu apresenta atividade anti-inflamatória significativa, especialmente na fase aguda da inflamação. A atividade pode estar relacionada à inibição da ativação dos mediadores químicos da inflamação.

O fator de transcrição nuclear NF- κ B regula a expressão de inúmeros genes que são críticos para a regulação da apoptose, replicação viral, tumorigênese e inflamação, além de várias doenças autoimunes. Além disso, o NF- κ B é crucial para respostas inflamatórias, e a ativação aberrante do NF- κ B é frequentemente observada em numerosos cânceres. Portanto, os inibidores de sinalização do NF- κ B são considerados potenciais agentes terapêuticos para o câncer e doenças inflamatórias (GUO et al., 2015; KARIN et al., 2004). Como o NF- κ B é essencial para desencadear a inflamação, espera-se que drogas anti-inflamatórias não esteroidais, drogas antirreumáticas modificadoras da doença, glicocorticoides e especialmente produtos naturais demonstrem alto potencial para reduzir a ativação do NF- κ B (SIMMONDS; FOXWELL, 2008). Dessa forma, acredita-se que o extrato do mesocarpo de babaçu pode ter efeito direto ou indireto no NF- κ B; contudo, estudos futuros devem ser conduzidos no sentido de compreender o mecanismo por qual este composto atua na inflamação.

VI-5 Conclusão

Este estudo é o primeiro a isolar sistematicamente os flavonoides do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu extraído via PLE. Os compostos majoritários encontrados no extrato – catequina, epicatequina e quercetina – evidenciaram a atividade anti-inflamatória do extrato de mesocarpo de babaçu. Isso porque foi observado que o extrato administrado na dose de 30 mg/kg reduziu significativamente o edema de pata induzindo nos ratos com carragenina; redução no número de neutrófilos também foi observada. Estes dados evidenciam que em nível celular as catequinas podem ter promovido a redução da ativação do NF- κ B induzida por TNF- α e dos fatores inflamatórios (inibindo a produção de radicais livres). No entanto, estudos futuros são necessários para confirmar a redução a nível plasmático dos mediadores inflamatórios em animais tratados com este extrato.

VI- Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processos nº 2016/13460-8 e nº 2015/04729-0 - pela bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processo nº 306317/2016-8.

VI- Referências

AISEN, P. S. et al. NSAIDs and hypertension. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 163, p. 1115-1115, 2003.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 1124-1131, 2004.

AURIEL, E.; REGEV, K.; KORCZYN, A.D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, Amsterdam, v. 119, p. 577-584, 2014.

AZEVEDO, A. P. S. et al. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 111, p. 155-159, 2007.

BARNES, P.J. Corticosteroids: the drugs to beat. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 2-14, 2006.

_____. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 120, p. 76-85, 2010.

BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Immunomodulatory and antimicrobial activity of Babassu mesocarp improves the survival in lethal sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2016, p. 2859652, 2016.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, São Paulo, v. 53, p. 646-656, 2009.

BRASIL. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Brasília, DF: CONCEA, 2013.

CHEN, L. et al. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 25, p. 1045-1050, 1997.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 30, p. 1073-1081, 2009.

DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 72, p. 887-893, 2001.

DE MOURA SPEROTTO, N. D. et al. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 225, p. 178-188, 2018.

DE SOUZA, P. A. et al. Effects of a nanocomposite containing *Orbignya speciosa* lipophilic extract on Benign Prostatic Hyperplasia. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 135, p. 135-146, 2011.

DICK, S. A.; EPELMAN, S. Chronic heart failure and inflammation: what do we really know? **Circulation Research**, Philadelphia, v. 119, p. 159-176, 2016.

FORTES, T. S. et al. Desenvolvimento do tumor de ehrlich em camundongos após incubação in vitro com mesocampo de babaçu. **Revista de Ciências da Saúde**, Maranhão, v. 11, p. 11-18, 2009.

GARCIA-PASTOR, P. et al. Effects of petrosaspongolide M, a novel phospholipase A2 inhibitor, on acute and chronic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 289, p. 166-172, 1999.

GIKNIS, M. L. A. **Clinical laboratory parameters for Crl:WI(Han)**. Wilmington: Charles River, 2008.

GUERRA, R. N. M. et al. Babassu aqueous extract (BAE) as an adjuvant for T helper (Th) 1-dependent immune responses in mice of a Th2 immune response-prone strain. **BMC Immunology**, London, v. 12, art. 13, 2011.

GUNAWARDENA, D. et al. Determination of anti-inflammatory activities of standardized preparations of plant-and mushroom-based foods. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 53, p. 335-343, 2014.

GUO, Y. J. et al. Involvement of TLR2 and TLR9 in the anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in HSV-1-infected microglia. **Life Sciences**, Oxford, v. 127, p. 12-18, 2015.

KARIN, M.; YAMAMOTO, Y.; WANG, M. Q. The IKK NF- κ B system: a treasure trove for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 3, p. 17-26, 2004.

KATHIRAVAN, S.; SHWETHA, V. K. Protective efficacy of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (Linn) against bradykinin induced inflammation in rats. **International Journal of Ayuvedic and Herbal Medicine**, Mandsaur, v. 2, n. 2, p. 366-379, 2012.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, Oxford, v. 81, p. 519-533, 2007.

LAKENBRINK, C. et al. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 2848-2852, 2000.

MAROON, J. C. et al. Natural antiinflammatory agents for pain relief in athletes. **Neurosurgical Focus**, Charlottesville, v. 21, p. 1-13, 2006.

MCMURRAY, R. W.; HARDY, K. J. Cox-2 inhibitors: today and tomorrow. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 323, p. 181-189, 2002.

MONTEIRO, K. M. **Refinamento de modelos experimentais para a diminuição do sofrimento animal e da variabilidade da resposta farmacológica**. 2016. 127 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

PERROT, S.; GUILBAUD, G.; KAYSER, V. Effects of intraplantar morphine on paw edema and pain-related behaviour in a rat model of repeated acute inflammation. **Pain**, Philadelphia, v. 83, p. 249-257, 1999.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemistry and Pharmacology**, Los Angeles, v. 72, p. 1439-1452, 2006.

RAMJI, D. P.; DAVIES, T. S. Cytokines in atherosclerosis: key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. **Cytokine Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 26, p. 673-685, 2015.

REIS, M. Y. F. A. et al. Anti-Inflammatory activity of Babassu oil and development of a microemulsion system for topical delivery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, p. 3647801, 2017.

RENNÓ, M. N. et al. Crude ethanol extract from babassu (*Orbignya speciosa*): cytotoxicity on tumoral and non-tumoral cell lines. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 467-476, 2008.

SCHINDELIN, J. et al. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 82, p. 518-529, 2015.

SEIBERT, K. et al. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 400A, p. 167-170, 1997.

SIMMONDS, R. E.; FOXWELL, B. M. Signalling, inflammation and arthritis: NF- κ B and its relevance to arthritis and inflammation. **Rheumatology**, Basel, v. 47, p. 584-590, 2008.

SOUZA, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart.) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 133, p. 1-5, 2011.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**, Basel, v. 47, p. 78-87, 1998.

VENIGALLA, M. et al. Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 95, p. 63-74, 2016.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation Proceedings**, Washington, v. 46, p. 118-126, 1987.

ZAVERI, N. T. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, Oxford, v. 78, p. 2073-2080, 2006.

4 CONCLUSÕES GERAIS

As amêndoas de babaçu apresentam 59,89 g/100g de lipídios nas sementes. Este valor foi determinado quando a percolação com éter de petróleo foi empregada via Soxhlet. Ao comparar o isopropanol pressurizado e o etanol, solventes verdes com polaridades muito distintas, altos rendimentos de extração de 55,34 g/100g e 53,12 g/100g foram obtidos, respectivamente. Esses resultados são promissores quando comparados com métodos tradicionais, tais como extração por prensagem a quente e a frio e por percolação de solvente via Soxhlet, uma vez que esse teor de lipídios representa 92,4 e 88,7% do óleo nas sementes, respectivamente.

Na extração líquida pressurizada (PLE) do óleo das amêndoas de babaçu, duas variáveis do processo foram estudadas – o tempo de contato entre a matriz e o solvente em cada lote (St) e o volume de solvente na extração (SV). A influência destas variáveis no rendimento do extrato foi avaliada por meio de um DCCR e nas principais análises de efeitos do St, SV e de sua interação (St x SV) no rendimento do óleo de babaçu utilizando etanol como solvente.

Quando o volume de solvente não é um fator significativo no processo de extração com solvente pressurizado, isso pode ser considerado como um fator econômico importante, pois podem ser empregadas quantidades menores de solvente e, mesmo assim, bons rendimentos podem ser alcançados. Esta é uma grande vantagem quando se utiliza solvente pressurizado no processo de extração.

No entanto, quando se utilizou isopropanol pressurizado, o volume de solvente (SV) influenciou na PLE e houve diferença significativa no rendimento do óleo das sementes de babaçu. Especificamente neste caso, foi possível gerar uma superfície de resposta e detectar estatisticamente que maiores quantidades de solventes para tempos de contato (St) em torno de 3 min geram os maiores rendimentos. Este diferente comportamento depende da polaridade do solvente empregado, de modo que a otimização dos processos de extração se torna importante na investigação de novos processos que visam empregar métodos alternativos e solventes para ter produtos de qualidade.

O perfil de ácidos graxos do óleo de babaçu foi igual, independentemente do solvente, método ou condições utilizadas na extração. Os ácidos graxos em maior concentração foram os ácidos láurico, mirístico, oleico e palmítico, que apresentam efeitos clínicos no tratamento de úlceras (lesões comuns em idosos) e queimaduras. Em função da composição de ácidos graxos, os principais triacilgliceróis presentes neste óleo foram COL, LOL, LOM, LOP e MOP.

O óleo de amêndoa de babaçu extraído com CO₂ supercrítico apresentou rendimentos de 51,94 a 57,71 g/100g para pressão de 25 MPa, enquanto que a 35 Mpa, os

rendimentos variaram de 53,65 a 59,93 g/100g. Estes resultados são promissores quando comparados com o hexano, solvente convencional utilizado na extração de óleo, uma vez que o conteúdo lipídico obtido via SFE representa de 75,43 a 89,86% do óleo presente nas sementes, respectivamente.

Empregando a tecnologia de extração com CO₂ supercrítico, foi possível observar que as condições de pressão utilizadas não promoveram interações significativas na concentração de β -sitosterol, uma vez que este fitosterol pode ser extraído com o CO₂ supercrítico devido à interação das moléculas com os ácidos graxos. Vale ressaltar que a quantificação deste composto e a determinação do perfil de ácidos graxos são importantes dados para futuros estudos com o óleo da amêndoa de babaçu, no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de feridas cutâneas, tais como úlceras de pressão, comumente detectadas em pacientes em unidades de terapia intensiva, idosos e pacientes com alterações metabólicas.

As extrações PLE em batelada ou ciclos, que operam a alta pressão e temperatura, podem proporcionar rendimentos elevados e extratos de alta qualidade quando comparados aos métodos tradicionais.

Ao avaliar os efeitos principais das variáveis de processo (St e T e a interação entre elas, St $\times$ T) no rendimento das extrações do mesocarpo de babaçu via extração com etanol pressurizado, foi observado que a variável T exerceu influência positiva neste parâmetro, contribuindo para maiores rendimentos e maior concentração de compostos fenólicos nos extratos. Pode-se observar também que, embora a variável St não tenha apresentado influência no processo, a interação T $\times$ St foi significativa no rendimento dos extratos. Para o rendimento da extração, o modelo linear gerado conseguiu prever o comportamento do processo em função da T, e os maiores rendimentos dos extratos do mesocarpo de babaçu foram obtidos a temperaturas elevadas.

A concentração de compostos fenólicos nestes extratos foi bastante elevada, principalmente quando comparada ao mesmo extrato obtido via método convencional. Compostos fenólicos possuem atividade antioxidante e, por isso, os extratos do mesocarpo de babaçu tem alto potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos, já que compostos fenólicos têm sido empregados na indústria cosmética e farmacêutica. Outra propriedade refere-se à ação anti-inflamatória também descrita em literatura como uma ação dos flavonoides (catequinas), que foi confirmada pelo experimento de avaliação anti-inflamatória em ratos. O estudo preliminar qualitativo sobre a atividade antimicrobiana dos extratos indicou uma provável ação contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Este resultado evidencia que os extratos do mesocarpo de babaçu produzidos via etanol pressurizado são ricos em atividades biológicas.

Em conclusão, este estudo demonstrou que a administração oral de óleo das amêndoas de babaçu extraído com CO₂ supercrítico em dose única de 2.000 mg/kg, bem como as três doses utilizadas no teste subagudo (1, 3 e 5 mg/kg), não mostraram efeitos tóxicos ou neurotóxicos em ratos. Este estudo mostrou que o óleo pode alterar o metabolismo celular de gordura dos animais, efeito visto após o tratamento subagudo (28 dias).

Nesse sentido, evidencia-se a possibilidade de utilização do óleo das amêndoas de babaçu no desenvolvimento clínico de novo agente no tratamento da obesidade, haja vista que este óleo possui concentrações de β -sitosterol, um fitoesterol que pode ter ação direta na redução de peso corporal e, conseqüentemente, na redução da formação de adipócitos. No entanto, estudos adicionais são necessários para demonstrar a segurança do consumo humano do óleo das amêndoas de babaçu como suplemento dietético.

Este trabalho demonstrou que a administração do mesocarpo de babaçu nas concentrações de 5%, 10% e 15% durante 28 dias na avaliação da toxicidade subaguda não causou efeitos tóxicos ou neurotóxicos em ratos. Este estudo mostrou que a farinha do mesocarpo de babaçu pode alterar o metabolismo celular de gordura dos animais, possivelmente por meio da ação do hormônio grelina. Logo, estudos futuros são necessários para investigar se a farinha do mesocarpo de babaçu tem ação direta na redução de peso corporal e conseqüentemente na redução da formação de adipócitos, metabolismo de absorção de gordura e ácidos graxos.

Este estudo é o primeiro a isolar sistematicamente os flavonoides do extrato etanólico do mesocarpo de babaçu extraído via PLE. Catequina, epicatequina e quercetina foram os compostos majoritários encontrados no extrato e evidenciaram a atividade anti-inflamatória do extrato de mesocarpo de babaçu. Isso porque foi observado que o extrato administrado na dose de 30 mg/kg (sendo 7,68 mg de catequina, 2,65 mg de epicatequina e 0,25 mg de quercetina) reduziu significativamente o edema de pata induzido nos ratos com carragenina. Redução no número de neutrófilos também foi observada. Estes dados evidenciam que em nível celular as catequinas podem ter promovido a redução da ativação do NF- κ B induzida por TNF- α e dos fatores inflamatórios (inibindo a produção de radicais livres). No entanto, estudos futuros são necessários para confirmar a redução a nível plasmático dos mediadores inflamatórios em animais tratados com este extrato.

5 TRABALHOS FUTUROS

- Determinação das atividades antioxidante do óleo das amêndoas de babaçu extraídos via PLE e SFE;
- Determinação e quantificação dos fitoesteróis campesterol, estigmasterol e ergosterol, α -tocoferol, β -tocoferol, alfa, gama e delta-tocotrienol;
- Avaliar a farmacocinética do β -sitosterol *in vivo*;
- Identificação, determinação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos do mesocarpo de babaçu obtidos via PLE;
- Atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* dos extratos do mesocarpo de babaçu, explorando o potencial deste extrato contra bactérias gram-positivas;
- Detecção de marcadores anti-inflamatórios (IL-6, IL10, IL12, dentre outros);
- Avaliação *in vivo* da atividade antinociceptiva dos extratos do mesocarpo de babaçu.