Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização fenólica por LC-ESI-QTOF-MS e atividades biológicas de resíduos do processamento de frutos amazônicos

Anna Paula de Souza Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2018

Anna Paula de Souza Silva
Bacharela em Ciências dos Alimentos

Caracterização fenólica por LC-ESI-QTOF-MS e atividades biológicas de resíduos do processamento de frutos amazônicos

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Anna Paula de Souza

Caracterização fenólica por LC-ESI-QTOF-MS e atividades biológicas de resíduos do processamento de frutos amazônicos / Anna Paula de Souza Silva.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

112 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Resíduos agroindustriais 2. *Euterpe oleracea* Mart. 3. *Maximiliana maripa* Aubl Drude 4. Espécies reativas de oxigênio 5. Espectrometria de massas de alta resolução I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Flavio e Joana, à minha irmã Anna Flavia, aos meus avós Epitácio e Neide, e a todos que me incentivaram e me motivaram a seguir nesta caminhada, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde, proteção, amor e força concedidos para eu viver e crescer com as alegrias e as dificuldades do caminho.

Aos meus pais Flávio A. da Silva e Joana D'Arc C. de Souza, e à minha irmã Anna Flavia S. Silva, pessoas que Deus me presenteou como minha família. Agradeço pelo amor, incentivo, paciência, dedicação e orientação ao longo de todos estes anos.

Aos meus avós (Epitácio de Souza, Neide C. de Souza, Odete P. da Silva e Antonio Pedro da Silva, *in memoriam*), que sempre fizeram de tudo para eu ser feliz e sonhavam em me ver graduada, o que infelizmente não foi possível. Gratidão pelo tempo que Deus nos permitiu viver juntos e por continuarem cuidando de mim e me dando forças.

À Universidade de São Paulo, em especial à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (a Gloriosa ESALQ/USP), minha segunda casa e local de grande aprendizado, onde tantas conquistas e realizações foram alcançadas.

Ao meu orientador prof. Dr. Severino Matias de Alencar, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pelas oportunidades, ensinamentos, apoio e incentivo, que me permitiram aprender e evoluir pessoal e profissionalmente.

Aos professores Dr. Pedro Luiz Rosalen (FOP/Unicamp) e Dr. Renato Grimaldi (FEA/Unicamp), pela confiança em mim e em meu trabalho, pela parceria na realização deste projeto, ensinamentos e apoio.

À empresa Citróleo Group pela parceria, confiança e investimento na realização deste projeto, em especial ao sr. Rafael M. Maestre, ao Juliano D. Coletta, à Gabriela Rocha e à Flávia F. Jesuíno.

Ao meu médico e amigo Dr. Pedro Antonio N. Franco, à Profa. Dra. Silvia Maria G. Molina, e à Dra. Faride Simão, anjos que Deus colocou em meu caminho e que me ajudaram muito nesta trajetória, principalmente nos momentos mais difíceis, sempre acreditando em mim e me fazendo enxergar o melhor do meu ser.

A todos os meus professores, que muito me ensinaram sobre as ciências e sobre a vida dentro e fora da sala de aula, desde a educação básica até o ensino superior e pós-graduação.

Aos funcionários do Departameto de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP, em especial à Dona Amábile Stabelin pelo carinho, apoio e longas conversas à espera do ônibus!

Aos colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental (ESALQ/USP), Adna P. Massarioli, Luciano H. Campestrini, Heloísa M. Forti, Ivani A.M. Moreno, Priscilla S. Melo, Naiane S. Gerhard, Larissa B.B. Borges, Fernanda F. Juliano, Camila F. da Silva, Jackeline C. Soares e Daniel V. Morais, com quem compartilhei conhecimento, alegrias, descobertas, dificuldades, longas risadas e que sempre me ajudaram e motivaram.

Aos colegas de trabalho e amigos do Departamento de Ciências Fisiológicas, área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica (FOP/Unicamp), Janaina C.O. Sardi, Marcelo Franchin, Josy G. Lazarini, Fernanda T.A.S. Emeri, Bruno D. Nani, pessoas e profissionais muito especiais que me auxiliaram na execução do projeto e com as quais muito aprendi.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

À amada e sapeca Pitty(nha), cachorrinha dos meus avós Epitácio e Neide que se tornou de minha família após a partida deles. Agradeço por tantas alegrias que ela proporcionou, e por mostrar-se forte quando todos estávamos fracos, ensinando que, principalmente nos momentos difíceis, devemos ser amorosos e continuar mantendo um largo sorriso no rosto.

A todos que me ajudaram e/ou apoiaram direta ou indiretamente ao longo da realização deste trabalho, e a todos que Deus coloca em meu caminho diariamente, com quem posso aprender muito e que contribuem para a minha evolução pessoal e espiritual.

GRATIDÃO!

EPÍGRAFE

“Pode-se encontrar a felicidade, mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz”.

Albus P.W.B. Dumbledore em Harry Potter e o Prisioneiro de Azkaban (*J.K. Rowling*)

“Não tenho certeza de nada, mas a visão das estrelas me faz sonhar”.

(*Vincent van Gogh*)

SUMÁRIO

RESUMO **9**

ABSTRACT **10**

LISTA DE FIGURAS **11**

LISTA DE TABELAS **13**

1. INTRODUÇÃO **15**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **19**

2.1. CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E POTENCIAL BIOATIVO DOS FRUTOS AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA MART.) E INAJÁ (MAXIMILIANA MARIPA AUBL. DRUDE) 19

2.2. IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS . 22

2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS 24

REFERÊNCIAS 27

3. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS DE TORTAS DE AÇAÍ E INAJÁ POR MEIO DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA **35**

RESUMO 35

ABSTRACT 35

3.1. INTRODUÇÃO 36

3.2. MATERIAL E MÉTODOS 38

3.2.1. Obtenção e preparo dos extratos 37

3.2.2. Determinação das condições de extração de compostos antioxidantes pela metodologia de superfície de resposta 39

3.2.3. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical ABTS, redução do Fe^{+3} e redução do reagente Folin-Ciocalteau 41

3.2.3.1. Atividade sequestrante do radical ABTS 41

3.2.3.2. Atividade antioxidante pelo método de redução do Fe^{+3} (FRAP) 41

3.2.3.3. Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau 42

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

3.4. CONCLUSÃO 57

REFERÊNCIAS 57

4. CARACTERIZAÇÃO FENÓLICA POR LC-ESI-QTOF-MS E POTENCIAL BIOATIVO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE AÇAÍ E INAJÁ **63**

RESUMO 63

ABSTRACT 63

4.1. INTRODUÇÃO 64

4.2. MATERIAL E MÉTODOS 66

4.2.1. Preparo das amostras e obtenção dos extratos de resíduos de frutos amazônicos 66

4.2.2. Caracterização da composição fenólica das tortas por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI–QTOF-MS) 67
4.2.2.1. Purificação das amostras 67
4.2.2.2. Injeção e análise da composição química 68
4.2.3. Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau 68
4.2.4. Atividade sequestrante do radical DPPH 69
4.2.5. Atividade sequestrante do radical ABTS 69
4.2.6. Atividade antioxidante pelo método de redução do Fe^{+3} (FRAP) 70
4.2.7. Sequestro do radical peroxila ($ROO^{\bullet}$) 70
4.2.8. Sequestro do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) 71
4.2.9. Sequestro do radical ácido hipocloroso (HOCl) 71
4.2.10. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* 72
4.2.10.1. Cultura celular 72
4.2.10.2. Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT 72
4.2.10.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* 72
4.2.11. Atividade antimicrobiana 73
4.2.11.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) 73
4.2.11.2. Concentração Bactericida Mínima (CBM) 74
4.2.11.3. Concentração Fungicida Mínima (CFM) 74
4.2.12. Análise Estatística 75
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 75
4.3.1. Avaliação do perfil de compostos fenólicos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI–QTOF-MS) 75
4.3.2. Redução do reagente Folin-Ciocalteau e atividade antioxidante *in vitro* 80
4.3.3. Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória *in vitro* 84
4.3.4. Atividade antimicrobiana 87
4.4. CONCLUSÃO 91
REFERÊNCIAS 91

5. CONCLUSÃO 105

6. GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS NO PROJETO .. 107

APÊNDICES 109

RESUMO

Caracterização fenólica por LC-ESI-QTOF-MS e atividades biológicas de resíduos do processamento de frutos amazônicos

O Brasil possui uma rica diversidade em espécies de plantas nativas cujo potencial bioativo, embora ainda pouco investigado, as coloca como alvos de pesquisa na área de produtos naturais. Dentre as espécies nativas estão o açaí-do-Pará (*Euterpe oleraceae* Mart.) e o inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), frutos processados visando, principalmente, a obtenção de polpa e óleo. Contudo, a extração mecânica do óleo por prensagem gera grande quantidade de um material residual denominado "torta", geralmente descartado no meio ambiente como resíduo ou destinado à alimentação animal. Considerando-se a busca por ingredientes ativos naturais em substituição aos sintéticos para aplicação industrial, e a necessidade de exploração científica de resíduos agroindustriais, este trabalho teve como objetivo otimizar a extração de compostos antioxidantes de tortas de açaí e inajá, e avaliar a composição fenólica dos extratos otimizados pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI–QTOF-MS), bem como suas atividades biológicas antioxidante, citótoxica e anti-inflamatória (*in vitro*) e antimicrobiana. Para tanto, a melhor condição de extração dos compostos antioxidantes foi determinada empregando-se um planejamento experimental com delineamento do tipo DCCR juntamente com a metodologia de superfície de resposta. A atividade antioxidante (variável resposta) foi determinada pelos métodos de sequestro do radical ABTS, FRAP e redução do reagente Folin-Ciocalteau, sob diferentes temperaturas de extração e concentrações de etanol (variáveis exploratórias). Encontrada a condição de extração ideal (70°C e 50% de etanol, v/v) foi realizada a caracterização fenólica por espectrometria de massas de alta resolução, que possibilitou a identificação de 20 compostos bioativos no extrato de torta de açaí e de 6 no de inajá, dentre os quais estão apigeninas, catequinas e derivados do ácido caféico. As atividades biológicas avaliadas foram: antioxidante, determinada pelos métodos de sequestro dos radicais livres sintéticos ABTSe DPPH, FRAP, redução do reagente Folin-Ciocalteau, além da desativação de espécies reativas de oxigênio (radical peroxila, ânion superóxido e ácido hipocloroso); anti-inflamatória, pela inibição da ativação do fator de transcrição NF-κB; e antimicrobiana, pela determinação da CIM e CBM. Os resultados indicaram que ambos os extratos apresentaram elevada atividade antioxidante, todavia, o extrato de torta de açaí destacou-se em comparação ao da torta de inajá. O extrato da torta de açaí não promoveu redução da viabilidade celular para a cultura de macrófagos RAW 264.7 nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, enquanto que no extrato de torta de inajá não foi verificada redução da viabilidade nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL (p>0,05). Os extratos ainda apresentaram atividade anti-inflamatória, sendo os extratos das tortas de inajá e de açaí capazes de inibir a ativação de NF-κB em 40 e 100%, repectivamente. O extrato de torta de inajá não apresentou atividade antimicrobiana, ao passo que o de torta de açaí inibiu o crescimento de bactérias patogênicas em concentrações de 1250 e 2500 µg/mL. Este trabalho mostra o potencial bioativo desses resíduos, corroborando com potenciais aplicações tecnológicas de seus extratos em escala industrial.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais; *Euterpe oleracea* Mart.; *Maximiliana maripa* Aubl. Drude; Espécies reativas de oxigênio; Espectrometria de massas de alta resolução

ABSTRACT

Phenolic characterization by LC-ESI-QTOF-MS and biological activities of Amazonian fruits processing residues

Brazil has a rich diversity of native plant species which bioactive potential, although still unexploited, places them as research targets in the natural products area. Among these native species are *açaí-do-Pará* (*Euterpe oleraceae* Mart.) and *inajá* (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), fruits processed mainly aiming the extraction of pulp and oil. However, the oil mechanical extraction by pressing results in great amounts of a residual material termed "cake", generally discarded in the environment or destined to animal feeding. Considering the search for natural active ingredients to substitute the synthetic ones for industrial application, and the need of scientific investigation of agroidustrial residues, this paper aimed to optimaze the extraction of antioxidant compounds from *açaí* and *inajá* cakes, and to evaluate the phenolic composition of the extracts by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS), as well as their antioxidant, cytotoxic and anti-inflammatory (*in vitro*), and antimicrobial, activities. For this purpose, the best condition for extraction of the antioxidant compounds was determined by using an experimental design with a RCCD design together the response surface methodology. The antioxidant activity (dependent variable) was determined by the methods ABTS radical scavenging, FRAP assay and Folin-Ciocalteau reagent reduction, under different temperatures (°C) of extraction and ethanol concentrations (%, v/v) (independent variables). Established the best extraction condition (70°C and ethanol 50%, v/v), the phenolic profile of the cakes extracts was characterized by LC-ESI-QTOF-MS, which made possible the identification of 20 bioactive compounds in *açaí* cake extract and 6 in *inajá* cake extract, among which are apigenins, catechins and caffeic acid derivatives. The following biological activities were analyzed: antioxidant, by ABTS and DPPH synthetic radicals scavenging assay, FRAP, Folin-Ciocalteau reagent reduction, and oxygen reactive species deactivation (peroxil, superoxide and hipochlorous acid radicals); anti-inflammatory, by the inhibition of the transcription factor NF-κB activation; and antimicrobial, by determining MIC and MBC. The results indicated that both extracts show high antioxidant activity, however, the *açaí* cake extract stood out compared to *inajá* cake extract. The *açaí* cake extract didn't decrease cell viability for RAW 264.7 macrophages culture in the concentrations 1, 10 and 100 µg/mL, while the *inajá* cake extract didn't decrease the cell viability in the concentrations 1, 10, 100 and 1000 µg/mL (p>0,05). The extracts still exhibited anti-inflammatory activity, being the *inajá* and *açaí* cakes extracts capable to inhibit NF-κB activation in 40% and 100%, respectively. The *inajá* cake extract didn't show antimicrobial activity, while *açaí* cake extract inhibited the growing of pathogenic bacteria in concentrations of 1250 and 2500 µg/mL. This work confirms the bioactive potential of the residues, supporting possible technological applications of the extracts on an industrial scale.

Keywords: Agroindustrial residues; *Euterpe oleracea* Mart.; *Maximiliana maripa* Aubl. Drude; Reactive oxygen species; High resolution mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos das amostras de tortas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (A) e de inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude) (B). 38

Figura 2. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para o sequestro do radical ABTS pelo extrato da torta de açaí. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v). 49

Figura 3. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a análise de FRAP pelo extrato da torta de açaí. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v). 49

Figura 4. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau pelo extrato da torta de açaí. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v). 50

Figura 5. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para o sequestro do radical ABTS pelo extrato da torta de inajá. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v). 50

Figura 6. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a análise de FRAP pelo extrato da torta de inajá. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v). 51

Figura 7. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau pelo extrato da torta de inajá. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v). 51

Figura 8. Aspectos originais das amostras de tortas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (A) e de inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude) (B). 66

Figura 9. Atividade citotóxica de extratos de tortas de açaí (A) e de inajá (B). V = grupo controle de células que receberam somente o meio de cultura (100% de viabilidade). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). 85

Figura 10. Gráficos das atividades anti-inflamatórias dos extratos de tortas de açaí (A) e de inajá (B): V = veículo), LPS = lipopolissacarídeo e açaí e inajá nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p< 0,05). 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis reais e codificados do planejamento experimental.....39

Tabela 2. Planejamento experimental – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). 40

Tabela 3. Atividade antioxidante (variável resposta) dos extratos de torta de açaí determinada por três diferentes métodos analíticos, de acordo com o planejamento DCCR. Os valores finais são médias das triplicatas e foram utilizados para construção dos gráficos de superfície de respostas.....43

Tabela 4. Atividade antioxidante (variável resposta) dos extratos de torta de inajá determinada por três diferentes métodos analíticos, de acordo com o planejamento DCCR. Os valores finais são médias das triplicatas e foram utilizados para construção dos gráficos de superfície de respostas.....43

Tabela 5. Efeitos significativos das variáveis exploratórias sobre a variável resposta atividade antioxidante. Limite de confiança ao nível de 5% de probabilidade.....45

Tabela 6. Análise de variância para os efeitos das variáveis exploratórias sobre a atividade antioxidante de extratos de tortas de açaí e de inajá. Os valores seguidos por asterisco (*) indicam que a fonte de variação foi significativa ao nível de significância de 5%.....48

Tabela 7. Modelos matemáticos gerados para as superfícies de resposta das amostras de torta de açaí e de inajá. As respostas de atividade antioxidante foram obtidas por diferentes métodos analíticos de avaliação da atividade antioxidante. 53

Tabela 8. Resultados da atividade antioxidante de cada resíduo preditos pelas equações polinomiais e os observados em laboratório. 53

Tabela 9.Compostos identificados em extrato de torta de inajá por LC-ESI-QTOF-MS. 76

Tabela 10. Compostos identificados em extrato de torta de açaí por LC-ESI-QTOF-MS.....77

Tabela 11. Atividades antioxidantes dos extratos dos resíduos das tortas de açaí e inajá pelos métodos de Folin-Ciocalteau, FRAP, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ e capacidade de desativação do ânion superóxido (O_2^-), do radical peroxila ($ROO^{\bullet}$) e do ácido hiplocoroso (HOCl).....81

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos liofilizados de tortas de açaí e inajá. Microrganismos Gram-positivos são identificados por (+), e Gram-negativos, por (-). 88

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma rica diversidade em espécies vegetais frutíferas, somando cerca de 500 variedades das quais 220 são de plantas nativas da Amazônia, o que representa 44% da diversidade de frutas existentes no Brasil (NEVES et al., 2015). Dentre estas espécies, em sua maioria ainda pouco exploradas cientificamente, estão o açaí-do-Pará (*Euterpe oleracea* Mart.) e o inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), frutos de palmeiras da família Arecaceae encontradas principalmente no estado do Pará e de grande importância socioeconômica para as comunidades de pequenos produtores (TREICHEL et al., 2016).

Estes frutos são colhidos e geralmente processados com vistas à obtenção de produtos e derivados alimentícios, como a polpa e o óleo, principalmente para consumo local e regional. Contudo, a demanda nacional e internacional por frutos oleaginosos também é crescente devido à possibilidade de sua utilização como ingredientes, tanto de produtos alimentícios quanto de cosméticos e farmacêuticos (PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008; RUFINO et al., 2011).

Um aspecto importante na obtenção de óleos vegetais pelo processo de prensagem é a geração de um subproduto de alto valor proteico denominado “torta”, a qual é geralmente destinada à alimentação animal ou descartada como resíduo no meio ambiente. Todavia, devido à sua composição nutricional e substâncias bioativas, pode-se inferir que este material – gerado em grande quantidade após a extração do óleo – constitui fonte de compostos com atividades biológicas importantes, tais como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, o que permite sua valorização e reaproveitamento industrial (MATTHÄUS, 2002; PERICIN et al., 2009).

Dentre estas substâncias bioativas destacam-se os compostos fenólicos, os quais podem atuar como agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e antimicrobianos. Esses compostos possuem capacidade de sequestrar Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (como os radicais superóxido, ácido hipocloroso e peroxila) e/ou Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) (a exemplo do óxido nítrico e do peroxinitrito), que são radicais livres capazes de provocar efeitos deletérios à saúde do organismo durante o estresse oxidativo. Além disso, os compostos fenólicos são capazes de retardar ou inibir processos oxidativos e inflamatórios no organismo, contribuindo na prevenção de doenças como catarata, diabetes, doença de Alzheimer, envelhecimento precoce, entre outras enfermidades. Nos alimentos estes compostos antioxidantes ainda podem evitar a peroxidação lipídica e outras reações de

alteração de cor, aroma, sabor, textura e valor nutricional (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; CIRCU; AW, 2010), e a substituição de ingredientes sintéticos por naturais é uma preocupação recorrente das indústrias, principalmente da alimentícia, cosmética e farmacêutica, devido aos possíveis efeitos tóxicos e carcinogênicos relacionados às doses e ao tempo de exposição a esses ingredientes sintéticos (BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007).

Embora a prospecção de compostos bioativos de origem natural em frutos nativos, bem como em seus subprodutos e resíduos seja uma tendência no campo de pesquisa de produtos naturais, não foram encontrados trabalhos analisando as atividades biológicas - tais como antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, bem como a composição fenólica - de extratos de tortas de açaí e de inajá, visando conhecer o seu potencial enquanto fontes de compostos ativos.

Portanto, as justificativas para a realização de estudos com resíduos agroindustriais baseiam-se principalmente nos seguintes motivos: 1) no fato do Brasil ser um país cujo PIB é significativamente influenciado pelas atividades do agronegócio, e a indústria alimentícia, consequentemente, ser afetada por essas atividades (CEPEA, 2017); 2) no fato da crescente demanda por alimentos aumentar a geração de resíduos agroindustriais, sendo necessário desenvolver estratégias que promovam a reutilização destes materiais para reduzir o impacto ambiental; 3) na busca pela substituição industrial de aditivos sintéticos pelos naturais; 4) na busca por compostos biologicamente ativos provenientes de resíduos agroindustriais; e 5) pela oportunidade de se atingir um maior aproveitamento do alimento ao longo de sua cadeia produtiva, minimizando a geração de resíduos e passando a agregar valor tanto a materiais subaproveitados, quanto às regiões onde os frutos nativos são encontrados.

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi otimizar a extração de compostos antioxidantes de tortas de açaí e inajá, e avaliar a composição fenólica dos extratos otimizados pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI–QTOF-MS), bem como suas atividades biológicas antioxidante, citótoxica e anti-inflamatória (*in vitro*) e antimicrobiana. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, espera-se contribuir na alimentação de bases de dados existentes sobre frutos nativos, além de fornecer informações científicas que motivem a criação de estratégias para um possível reaproveitamento e reinserção desses resíduos tanto na cadeia agroindustrial, quanto nas indústrias farmacêutica e/ou cosmética.

Referências

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; YASAR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, v.18, n.9, p.1131-1136, 2007.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **PIB do Agronegócio – dados de 1996 a 2017.** Piracicaba, 2017. Disponível em: < https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>.Acesso em 13 jan.2018.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKY,J.N. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.12, p. 3444-3452, 2002.

NEVES, L.C.; TOSIN, J.M.; BENEDETTE, R.M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v.174, p.188-196, 2015.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.T. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of a Phytochemical Enriched Oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 4631–4636, 2008.

PERICIN, D.; KRIMER, V.; TRIVIC, S.; RADULOVIC, L. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. **Food Chemistry**, v. 113, n.2, p.450-456, 2009.

RUFINO, M.S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P.; SAURA-CALIXTO, F. Açaí (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100–2106, 2011.

TREICHEL, M.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E.; CARVALHO, C.; BELING, R.R. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**. Brazilian Fruit Yearbook. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88 p. Disponível em:< http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo_edicao/4/2016/04/20160414_0d40a2e2a/pdf/5149_2016fruticultura.pdf>. Acesso em: 1 jul. 2016.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características culturais e potencial bioativo dos frutos açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude)

O açaí pertence ao gênero *Euterpe*, o qual engloba cerca de 28 espécies das quais se destacam *E. oleracea*, *E. precatoria* e *E. edulis*. Todavia, somente os frutos das duas primeiras espécies são comercializados para consumo. A diferença básica entre *E. precatoria* e *E. oleracea* está principalmente relacionada às regiões de cultivo: enquanto a primeira espécie, também conhecida como "açaí-do-Amazonas" é encontrada no estado e na bacia do rio Amazonas, a segunda espécie, "açaí-do-Pará", pode ser encontrada nos estados do Pará, Tocantins, Maranhão, Amapá, além da Guiana e Venezuela (YAMAGUCHI et al., 2015).

Os frutos do açaizeiro são pequenos, esféricos, de coloração roxa escura e encontrados aglomerados em grandes cachos que nascem no topo das palmeiras. A frutificação ocorre em maior abundância entre os meses julho e dezembro, sendo que cada palmeira pode produzir, em média, cerca de 120 kg de frutos por safra (SHANLEY; MEDINA, 2005). O principal produto obtido e exportado é a polpa, obtida por um processamento que envolve maceração, despolpamento e refino visando à remoção de partículas maiores e/ou resíduos indesejáveis. A semente do açaí corresponde a 85% do peso do fruto e a polpa (epicarpo e mesocarpo dos frutos) a 15%, que pode ser prensada para a extração de óleo ou ser consumida com outros produtos da dieta da população regional (EMBRAPA, 2005).

De acordo com a Produção Agrícola Municipal (PAM), divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção nacional agrícola do açaí aumentou de 1 milhão para 1,1 milhão de toneladas do ano de 2015 para 2016, sendo o estado do Pará o maior produtor (IBGE, 2016), cuja capital consome quantidades acima de 300 mil toneladas do fruto anualmente (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017). O açaí-do-Pará tem sido frequentemente estudado com o objetivo de se determinar seus compostos bioativos, principalmente as substâncias antioxidantes, e possibilidades de utilização tanto como ingrediente alimentício quanto em produtos da indústria cosmética.

A atividade antioxidante do óleo e da polpa de açaí originário do estado do Pará foi avaliada por Rufino et al. (2011) pelos métodos de sequestro dos radicais sintéticos ABTS e DPPH, capacidade de redução do Fe^{+3} (FRAP), sequestro do radical peroxila (ORAC) e poder redutor total determinado pela redução do reagente Folin-Ciocalteau. Os autores obtiveram

resultados indicando que a polpa possui compostos fenólicos com alta atividade antioxidante, estando a maioria deles associada às fibras alimentares do fruto. Além disso, também observaram que o óleo do açaí possui atividade antioxidante superior à do azeite de oliva e um perfil graxo bastante similar ao deste óleo, sendo os ácidos graxos majoritários do óleo de açaí o oléico (52,1%) e o palmítico (25,3%). Assim, os autores concluem que o fruto pode ser utilizado como fonte de substâncias antioxidantes capazes de prevenir a oxidação lipídica em produtos alimentícios cárneos e de pescado (RUFINO et al., 2011).

O açaí também foi alvo de um estudo *in vitro* , realizado por Wong et al. (2013), que avaliou o seu potencial neuroprotetor. Este efeito está associado à redução da formação das fibrilas de β-amiloide, peptídeos constituintes das placas senis responsáveis pelo desenvolvimento da doença de Alzheimer, o que sugere que o extrato de açaí promove inibição da agregação de β-amiloide e, por consequência, possui efeito neuroprotetor. Além disso, o extrato do fruto também apresenta alta atividade antioxidante, sendo capaz de mitigar danos oxidativos desencadeados por ERO.

Outro estudo apontou que o extrato de açaí rico em antocianinas apresentou alta atividade antioxidante determinada pelos métodos de Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) e de Sequestro do Radical $DPPH^{\bullet+}$ (DPPH), colocando-o como fonte de antioxidantes naturais (HOGAN et al., 2010). Além disso, esses mesmos autores também constataram que os extratos ainda apresentaram efeito antiproliferativo contra células C-6 de glioma nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, e que o efeito provavelmente foi provocado pela indução da apoptose destas células cancerígenas.

As propriedades bioativas do açaí estão principalmente relacionadas a efeitos antiproliferativos, anti-inflamatórios e antioxidantes (SCHAUSS et al., 2006; PACHECO-PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008; HOGAN et al., 2010; MARTINO et al., 2016). No entanto, a atividade antimicrobiana deste fruto ainda é pouco explorada (DIAS-SOUZA et al., 2018), o que também é observado para frutos no geral. Esta propriedade é de grande relevância, pois se relaciona a um gargalo da conservação de alimentos, a deterioração causada por microrganismos e as doenças transmitidas por alimentos provocadas por microrganismos patogênicos.

Determinadas cepas de microrganismos podem provocar infecções severas nos seres humanos, a exemplo da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, microrganismos indicadores de manipulação de alimentos realizada de forma inadequada (PAZ et al., 2015). Tal preocupação justifica a utilização de conservantes sintéticos com ação antimicrobiana nos produtos alimentícios, contudo, a substituição de ingredientes sintéticos por naturais é uma

busca recorrente das indústrias de alimentos, que buscam ativos de origem natural, seguros e capazes de tanto contribuir no aumento da vida útil dos produtos quanto serem eficientes contra possíveis patógenos (PAZ et al., 2015).

A literatura aponta que o extrato aquoso de açaí possui atividade sequestrante de radicais livres avaliadas em modelos *in vitro* e *in vivo*, sendo capaz de neutralizar ERO durante o estresse oxidativo. O modelo *in vivo* adotado por Bonomo et al. (2014) para avaliação da atividade antioxidante utilizou *Caenorhabditis elegans*, uma espécie de nematoide cuja mortalidade e resistência ao estresse oxidativo são influenciadas por bactérias. Os resultados indicaram que o extrato aquoso de açaí aumentou a resistência ao estresse oxidativo e ao estresse osmótico, independentemente da atividade antimicrobiana exercida pelo mesmo extrato (BONOMO et al., 2014).

De acordo com Lian et al. (2012) a atividade antimicrobiana do açaí está relacionada com a presença de compostos fenólicos. Os polifenóis com ação inibitória, ou capazes de promover a morte de microrganismos, provocam alteração da permeabilidade das membranas e se complexam com macro ou micronutrientes, afetando mecanismos celulares como o transporte de elétrons e a absorção de nutrientes pelas células (COWAN, 1999; DAGLIA, 2012). Nas espécies vegetais os flavonoides são a classe de compostos fenólicos mais abundante e que possuem diversas atividades biológicas (D'MELLO et al., 2011; PEREZ et al., 2014; GROSSO et al., 2016; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016), porém não se pode relacionar a atividade antimicrobiana do açaí estritamente a estes compostos, uma vez que as lignanas presentes também podem apresentar atividades biológicas, como inseticida e antimicrobiana (YAMAGUCHI et al., 2015).

O inajazeiro é uma planta abundantemente encontrada na região amazônica que frutifica entre os meses de janeiro e março no Pará, e no início de novembro, no estado do Acre (SHANLEY; MEDINA, 2005). As palmeiras podem medir de 3,5 a 20 m de altura e produzem grandes cachos com aglomerados de frutos ovoides que, quando maduros, apresentam o epicarpo de coloração marrom e o mesocarpo de coloração amarela (CAVALCANTE, 2010).

O inajazeiro muitas vezes é considerado uma "praga" pelos habitantes daquela região pelo fato da planta ter suas sementes dispersas facilmente por animais, e deste modo, ser facilmente encontrada em áreas de pasto, sendo também resistente ao fogo e capaz de brotar novamente nas áreas queimadas. No entanto, a palmeira é de grande importância para a preservação da biodiversidade silvestre, visto que os frutos são produzidos em grande

quantidade (média de 5000 por palmeira por ano) e compõem a alimentação de muitas espécies da fauna local (SHANLEY; MEDINA, 2005).

A polpa deste fruto apresenta em torno de 35,50 % de óleo, no qual estão presentes os ácidos graxos láurico ($C_{12}H_{24}O_2$) e mirístico ($C_{14}H_{28}O_2$) (RODRIGUES; DARNET; SILVA, 2010). Alguns autores indicam não haver diferença significativa entre o teor de compostos fenólicos presentes na casca e na polpa deste fruto. Contudo, com o passar do tempo é observada uma diminuição da atividade antioxidante de tais partes do fruto, devido, provavelmente, ao acúmulo de compostos fenólicos com menor atividade antioxidante e/ou perda daqueles inicialmente presentes no fruto e com atividade antioxidante mais elevada (NEVES et al., 2015).

O inajá não possui valor agregado e nem um grande mercado, sendo consumido majoritariamente nas regiões produtoras. Porém, tal espécie vem recebendo atenção e se tornando alvo de pesquisas quanto à sua utilização como biocombustível (STACHIW et al., 2016), o que pode beneficiar inclusive as comunidades em que a palmeira está presente, com a geração de emprego, renda e energia para as áreas isoladas (EMBRAPA, 2014). Embora tenha relevância socioeconômica para a região amazônica, não foram encontradas referências em termos de avaliação do potencial bioativo do fruto, bem como para a torta gerada durante o processo de extração do óleo.

2.2. Importância da avaliação do potencial bioativo de resíduos agroindustriais

Os frutos oleaginosos podem ser colhidos de forma extrativista ou cultivados em sistemas solteiros ou consorciados, como no caso do açaí. Geralmente são processados com vistas à obtenção de produtos e derivados alimentícios, como a polpa e o óleo, para consumo local e regional, principalmente sob a forma de sucos.

No caso do açaí, ainda que a maior parte da produção seja destinada para consumo nos próprios estados e regiões produtoras, o mercado encontra-se em franca expansão, sendo 30% da produção destinada aos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, e 10% ao mercado externo, principalmente para os Estados Unidos e o Japão (CONAB, 2016).

Os óleos vegetais podem ser extraídos a partir das sementes ou da polpa dos frutos por prensagem (extração mecânica) ou por extração utilizando solvente. Pré-tratamentos mecânicos e/ou que envolvam aplicação de temperatura podem ser aplicados aos frutos antes da extração para aumentar o rendimento de óleo (SAVOIRE; LANOISELLÉ; VOROBIEV, 2013). Contudo, um aspecto importante na obtenção dos óleos vegetais pelo processo de prensagem é a geração de um subproduto de alto valor proteico denominado “torta”, o qual é

geralmente destinado a alimentação animal ou descartada, muitas vezes sem tratamento, como resíduo no meio ambiente. A torta de açaí é composta pelo epicarpo e pelo mesocarpo do fruto, enquanto que a torta de inajá é obtida da polpa, fração do fruto com maior quantidade de óleo.

Os resíduos e os subprodutos agroindustriais ainda são subexplorados e podem representar gargalos ambientais e logísticos para as indústrias, além de não contribuírem na geração de divisas para o setor (YI et al., 2009). O acúmulo destes materiais no meio ambiente, principalmente aqueles com alta concentração de componentes orgânicos, pode favorecer a criação de um meio propício para a ação de bactérias, fungos e leveduras, os quais podem provocar a contaminação do solo e de lençóis freáticos, contrariando assim as práticas industriais sustentáveis. Logo, o reaproveitamento e/ou minimização de resíduos são altamente desejáveis, e a possibilidade destes materiais constituírem fontes naturais de compostos bioativos os colocam como alvo de estudos quanto à sua composição química e atividades biológicas, propriedades que os tornam passíveis de aplicação em diversos segmentos industriais (MELO et al., 2015).

As tortas podem ainda apresentar um teor residual de óleo passível de sofrer reações de deterioração ao longo do tempo, como a peroxidação lipídica, e assim contribuir na degradação deste resíduo, o que também pode justificar o seu descarte. Todavia, dada a grande quantidade de torta gerada após a extração do óleo dos referidos frutos - cujo rendimento é em torno de 30% para o açaí e de 23% para o inajá (SHANLEY; MEDINA, 2005; ROMERO et al., 2015) - e de outras espécies oleaginosas, além da composição química bioativa dos frutos que as originaram, esses resíduos agroindustriais podem constituir fontes de compostos com atividades biológicas importantes. Dentre estas substâncias estão os compostos fenólicos, cujas propriedades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória podem contribuir para a valorização e reaproveitamento tecnológico dos resíduos enquanto fontes naturais e economicamente viáveis de compostos bioativos (MATTHÄUS, 2002; MELO et al., 2015; PERICIN et al., 2009; WANG et al., 2010).

2.3. Compostos fenólicos e atividades biológicas

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de espécies vegetais expressivamente presentes na dieta humana. Tais substâncias são produzidas pelo metabolismo secundário dos vegetais ao longo de seu desenvolvimento e em resposta a condições de estresse - como lesões de tecidos, ataques de insetos e pragas, estresse hídrico, entre outros – e possuem múltiplas propriedades biológicas (HELENO et al., 2015).

A estrutura de um composto fenólico é determinada pela presença de pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, os quais também podem dar lugar a outros grupos funcionais, como ésteres e glicosídeos. A produção dos compostos fenólicos pode ocorrer por duas vias, a do ácido chiquímico e a do ácido malônico. A primeira via de formação é a principal responsável pela biossíntese da maioria dos compostos fenólicos nos vegetais, e converte precurssores da via glicolítica e da via pentose-fosfato em aminoácidos aromáticos, sendo o ácido chiquímico e o ácido cinâmico dois compostos intermediários dessa rota (HERRMANN; WEAVER, 1999).

Os compostos fenólicos podem ser agrupados de acordo com a sua cadeia carbônica principal, sendo distribuídos nas classes: fenóis simples, benzoquinonas (C6); ácidos fenólicos (C6-C1); acetofenonas e ácidos fenilacéticos (C26-C2); fenilpropanoides, dentre os quais estão ácidos cinâmicos, cumarinas e cromonas (C6-C3); naftoquinonas (C6-C4); xantonas e benzofenonas (C6-C1-C6); estilbenos e antraquinonas (C6-C2-C6); flavonoides, isoflavonoides e chalconas (C6-C3-C6); lignanas (C6-C3)2 e ligninas (C6-C3)n; diflavonoides (C6-C3-C6)2; melaninas vegetais (C6)n; taninos hidrolisáveis (C6-C1)n e condensados (C6-C3-C6)n (OLDONI, 2007). Os flavonoides são a classe mais encontrada em espécies vegetais, e estão presentes desde as raízes até as folhas e frutos das plantas, podendo ser divididos em diferentes grupos de acordo com o grau de complexidade da molécula (DEL RIO et al., 2013; JAKOBEK, 2015).

Os compostos fenólicos são considerados importantes substâncias devido, principalmente, a sua capacidade antioxidante, estabilizando radicais livres responsáveis por desencadear efeitos deletérios a organismos vivos e também reações que alteram a composição e o aspecto dos alimentos. Estes radicais podem ser gerados por fontes endógenas (na cadeia respiratória, durante processos inflamatórios, entre outros) e exógenas (exposição à luz ultravioleta e ao ozônio, dieta, tabaco, estresse, poluição, entre outros), e buscam estabilidade eletrônica, capturando elétrons de outras moléculas do organismo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os radicais livres estão intimamente relacionados ao estresse oxidativo, condição de desequilíbrio no organismo que ocasiona o aumento da formação de espécies reativas oxidantes no meio biológico, dentre as quais estão as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN). Estas espécies, geradas continuamente no metabolismo aeróbico, desempenham importantes atividades, como transdução de sinal de reações metabólicas, defesa contra antígenos e invasão de microrganismos, dentre outros (FINKEL; HOLBROOK, 2000). No entanto, quando no estresse oxidativo – condição em que há o desequilíbrio na concentração de agentes oxidantes e antioxidantes no organismo vivo – as espécies reativas encontram-se em elevadas concentrações e podem interromper a homeostase de células e tecidos, favorecendo assim a morte celular, lesão de tecidos e do material genético, e o desenvolvimento de patologias como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes e câncer (LEITE; SARNI, 2003; BARBOSA et al., 2010; ROLEIRA et al., 2015).

A geração constante e inevitável de compostos oxidantes pelo metabolismo propiciou o desenvolvimento de sistemas antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enximáticos) visando inibir a ação das espécies reativas presentes em excesso no organismo, e assim equilibrar os níveis entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes no organismo vivo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARBOSA et al., 2010). No entanto, a ingestão de compostos bioativos provenientes da dieta também é necessária e de grande relevância por consistir em uma proteção adicional para a manutenção do equilíbrio do estado redox (PANDEY; RIZVI, 2009), sendo os produtos vegetais fontes naturais de compostos fenólicos e outros compostos bioativos.

Os compostos fenólicos podem ainda ser utilizados industrialmente como agentes antioxidantes, fundamentais na conservação de produtos alimentícios, farmacológicos e cosméticos, atuando como estabilizantes, inibidores da peroxidação lipídica e do desenvolvimento bacteriano (LUTHER et al., 2004; SUN et al., 2010). Os antioxidantes são, portanto, compostos que, em baixas concentrações, desempenham papel relevante no sistema fisiológico retardando, prevenindo e/ou removendo os danos oxidativos provocados por moléculas reativas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). Tais compostos podem ser nutrientes ou não nutrientes de origem natural – a exemplo das vitaminas, ácido ascórbico, carotenoides, antocianinas, enzimas e alguns minerais (como zinco, manganês e ferro) – ou de origem sintética – como o Butilhidroxianisol (BHA) e o Butilhidroxitolueno (BHT) (SCHNEIDER, 2005).

A indústria alimentícia comumente utiliza o BHA e o BHT como agentes antioxidantes na conservação dos produtos visando aumentar sua estabilidade e vida útil. No entanto, a segurança da utilização industrial destes ingredientes quanto às doses e aos possíveis efeitos tóxicos causados pelo consumo vem sendo questionada, o que impulsiona o interesse das indústrias em pesquisar e utilizar substâncias com ação antioxidante de origem natural em substituição às sintéticas tradicionalmente empregadas (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Além da capacidade antioxidante, os compostos fenólicos ainda possuem efeitos anti-inflamatórios. O processo inflamatório pode ocorrer por diferentes vias e compreende a participação de citocinas (como o fator de necrose tumoral alfa TNF-α), quimiocinas, mediadores inflamatórios (como leucotrienos), e ainda está relacionado aos danos oxidativos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) (FRANCHIN et al., 2016; ZHANG; TSAO, 2016). A inflamação pode ser considerada aguda, que apresenta sintomas mais brandos com extravasamento de proteínas plasmáticas e outros componentes intracelulares, e ocorre por um curto período, ou crônica, a qual é decorrente de um processo inflamatório provocado por antígenos (inclusive físicos e químicos) não totalmente curado, e que está associada à ocorrência de doenças crônicas e danos severos ao organismo (ARULSELVAN et al., 2016).

Durante o processo inflamatório diversas células do sistema imunológico que desempenham mecanismos de defesa são mobilizadas, tanto para eliminar o antígeno quanto para sintetizar novos mediadores inflamatórioa como as citocinas, quimiocinas e eicosanoides (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; FRANCHIN et al., 2017). O fator nuclear kappa B (NF-κB) apresenta papel crucial na indução da síntese de mediadores inflamatórios. Este fator de transcrição nuclear consiste de um complexo proteico que regula processos fisiológicos e patológicos, como o câncer de mama e artrite, por exemplo. Estudos mostram que sua inibição farmacológica pode levar ao controle da progressão de algumas doenças, como as inflamatórias (RAYET; GÉLINAS, 1999; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; LING; KUMAR, 2012).

O agravamento do processo inflamatório pode culminar desde lesões de tecidos e desordens metabólicas até processos crônicos, o que requer a utilização de medicamentos com ação anti-inflamatória. No entanto, a utilização destas drogas sintéticas pode ser limitada (FRANCHIN et al., 2016), o que torna necessário o tratamento com outros princípios ativos como os compostos fenólicos, os quais podem ser obtidos em matrizes vegetais .Estes compostos podem atuar no sequestro de ERO e assim contribuir na diminuição da geração de

citocinas induzidas pelo acúmulo de tais espécies reativas. Além disso, os compostos fenólicos também são capazes de atuar na inibição de duas grandes vias inflamatórias, a do fator nuclear NF-kB e a das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (ARULSELVAN et al., 2016).

As propriedades bioativas do açaí, tais como efeitos antiproliferativos, anti-inflamatórios, antioxidantes e cardioprotetores, estão, portanto, relacionadas principalmente à presença de compostos fenólicos. Estudos sobre os efeitos do açaí *in vivo* – ainda escassos na literatura -, demonstram que este fruto é capaz de proteger o organismo contra o estresse oxidativo por mecanismos diretos (neutralização de ERO e ERN) e indiretos (induzindo a transcrição de proteínas citoprotetoras), além de reduzir a produção das ERO. O açaí ainda é descrito por possuir propriedades antimicrobianas de supressão do crescimento de bactérias específicas, mas aparentemente esta capacidade não está relacionada à modulação do estresse oxidativo no organismo vivo (BONOMO et al., 2014).

Devido às suas propriedades bioativas, muitos frutos nativos amazônicos podem ser potencialmente utilizados sob a forma de extratos como corantes alimentícios naturais, aditivos alimentícios com propriedades nutracêuticas, ingredientes funcionais, agentes antimicrobianos e até mesmo como princípios ativos em produtos cosméticos e/ou farmacêuticos. Porém, a caracterização dos resíduos do processamento dos frutos é igualmente importante, uma vez que são gerados a partir de materiais reconhecidos por sua etnologia, riqueza nutricional e de compostos ativos (BONOMO et al., 2014; BRAGA et al., 2016; MELO et al., 2015; OLDONI et al., 2016).

Referências

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2017. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2017. 88p.

ARULSELVAN, P.; FARD, M.T.; TAN, W.S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M.E.; KUMAR, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

BARBOSA, K B F ; COSTA, N M B; ALFENAS, R C G ; PAULA, S O; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. RADICAIS LIVRES E OS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES DA DIETA. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, pp. 123-130, maio/ago., 1999.

BONOMO, L.D.F.; SILVA, D.N.; BOASQUIVIS, P.F.; PAIVA, F.A.; GUERRA, J.F.C.; MARTINS, T.A.F.; TORRES, A.G.J.; PAULA, I.T.B.R.; CANESCHI, W.L.; JACOLOT, P.; GROSSIN, N.; TESSIER, F.J.; BOULANGER, E.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; OLIVEIRA, R.P. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms. **Plos One**, v. 9, n. 3, 2014.

BRAGA, G.C.; MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; ALENCAR, S.M. Extraction yield, antioxidant activity andphenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. **Ciência Rural**, v.46, n.8, p.1498-1504, 2016.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis na Amazônia**. 7 ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010, 282 p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura mensal. Açaí (fruto)**. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_09_11_55_19_conjutura_de__acai_abr_-16-1.pdf>. Acesso em 25 ago. 2016.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n.4, p. 564-582, 1999.

D'MELLO, P.; GADHWAL, M.K.; JOSHI, U.; SHETGIRI, P. MODELING OF COX-2 INHIBOTORY ACTIVITY OF FLAVONOIDS. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.4, p.33-40, 2011.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n.2, p. 174-181, 2012.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKY,J.N. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, JEREMY, P.E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidant & Redox Signaling**. Columbus, v.18, n.14, p.1818-1892, 2013.

DIAS-SOUZA, M.V.; SANTOS, R.M.; CERÁVOLO, I.P.; COSENZA, G.; MARÇAL, P.H.F.; FIGUEIREDO, F.J.B. *Euterpe oleracea* pulp extract: Chemical analyses, antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*, cytotoxicity and interference on the activity of antimicrobial drugs. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p.29-35, 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Prosa Rural** - Palmeira inajá: matéria-prima para o biodiesel e fonte de renda para o pequeno produtor. 2014. Disponível em:< https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/1806420/prosa-rural---palmeira-inaja-materia-prima-para-o-biodiesel-e-fonte-de-renda-para-o-pequeno-produtor>. Acesso em 14 jan. 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistemas de Produção 4** – Açaí. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 137p., 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1. 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p. 239-247, 2000.

FRANCHIN, M.; COLÓN, D.F.; CUNHA, M.G.; CASTANHEIRA, F.V.S.; SARAIVA, A.L.L.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; CUNHA, T.M.; ROSALEN, P.L. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific reports**, v. 7, n.6, 2016.

GROSSO, G. et al. Dietary polyphenols are inversely associated with metabolic syndrome in Polish adults of the HAPIEE study. **European Journal of Nutrition**, p. 1-12, 2016.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL,B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**., v. 393, p. 561–564, 2010.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parente compounds: a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 173, p.501-513, 2015.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, n.1, p.473-503, 1999.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção de açaí. Disponível em:< https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6578#resultado>. Acesso em 13 jan. 2017.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v.175, p.556-567, 2015.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.18, n.2, p.60-65, 2003.

LIAN, P. Y., MASEKO, T., RHEE, M., & NG, K. The antimicrobial effects of cranberry against *Staphylococcus aureus*. **Food Science and Technology International**, v. 18, n.2, p.179-186, 2012.

LUTHER, M.; PARRY, J.; MOORE, J.; MENG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, Z.; YU, L.L.L.U. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v.104, p.1065–1073, 2004.

MARTINO, H.S.D.; DIAS, M.M.S.; NORATTO, G.; TALCOTT, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Anti-lipidaemic and anti-inflammatory effect of açai (*Euterpe oleracea* Martius) polyphenols on 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Functional Foods**, v.23, p.432-443, 2016.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.12, p. 3444-3452, 2002.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.S.; ROSALEN, O.L. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species, **Food Chemistry**, v.181, p. 160 -169, 2015.

NEVES, L.C.; TOSIN, J.M.; BENEDETTE, R.M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v.174, p.188-196, 2015.

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R.M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 306-312, 2016.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.T. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of a Phytochemical Enriched Oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 4631–4636, 2008.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p.1-15, 2016.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2, n.5, p.270-278, 2009.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M.F.; CARVALHO, A.P.; DOMINGUES, V.F.; GOMES, A.M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELEURE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p.462-468, 2015.

PEREZ, A. et al. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. **Pharmacological Research**, v. 89, p. 11-18, 2014.

PERICIN, D.; KRIMER, V.; TRIVIC, S.; RADULOVIC, L. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. **Food Chemistry**, v. 113, n.2, p.450-456, 2009.

RODRIGUES, A.M.C.; DARNET, S., SILVA, L.H.M. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society.**, v.21 n.10, 2010.

ROLEIRA, F.M.F.; TAVARES-DA-SILVA, E.J.; VARELA, C.L.; COSTA, S.C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary antioxidants: anticâncer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p.235-258, 2015.

ROMERO, O.E.; TEIXEIRA, B.J.; LLICA, E.R.; MALPARTIDA, K.L.Z.; AQUISE, E.C.A. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante del aceite de *Euterpe precatoria* Mart. obtenido por diferentes métodos de extracción. **Revista de la Sciedad Química del Perú**, v. 81, n.1, 2015.

RUFINO, M.S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P.; SAURA-CALIXTO, F. Açaí (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100–2106, 2011.

SAVOIRE, R.; LANOISELLÉ, J.L.; VOROBIEV, E. Mechanical Continuous Oil Expression from Oilseeds: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n.1, p.1-16, 2013.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G.S.; HART, A.N.; SHANBROM, E. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p.8604-8610, 2006.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, p.7-30. 2005.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. Belém (Brasil): Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia/Center for International Forestry Research, 300p., 2005.

STACHIW, R.; RIBEIRO, S.B.; JARDIM, M.A.G.; POSSIMOSER, D.; ALVES, W.C.; CAVALHEIRO, W.C.S. Potencial de produção de biodiesel com espécies oleaginosas nativas de Rondônia, Brasil. **Acta Amazonica**, v.46, n.1, 2016.

SUN, J.; JIANG, Y.Y.S.A.; SHI, J.; WEI, X.; XUE, S.J.; SHI, J.; YI, C. Antioxidant activities and contents of polyphenol oxidase substrates from pericarp tissues of litchi fruit. **Food Chemistry**., v.119, p. 753–757, 2010.

WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J.D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1156-1162, 2010.

WONG, D.Y.S.; MUSGRAVE, I.F.; HARVEY, B.S.; SMID, S.D.. Açaí (*Euterpe oleraceae Mart*.) berry extract exerts neuroprotective effects against -amyloid exposure *in vitro*. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 221–226, 2013.

YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, L.F.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.

YI, C.; SHI, J.; KRAMER, J.; XUE, S.; JIANG, Y.; ZHANG, M.; MA, Y.; POHORLY, J. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. **Food Chemistry**, Barking, v.114, n.2, p.570-576, 2009.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v.8, p. 33-42, 2016.

3. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS DE TORTAS DE AÇAÍ E INAJÁ POR MEIO DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Resumo

A atividade agroindustrial gera grande quantidade de resíduos sólidos ao longo do processamento, dentre os quais estão as tortas, resíduos de frutos processados para a extração de óleo egeralmente descartados no meio ambiente ou destinados à alimentação animal. Visto que os compostos bioativos estão presentes em baixas concentrações nas matrizes vegetais, este trabalho teve como objetivo determinar a condição de extração ideal para tortas dos frutos amazônicos açaí-do-Pará (*Euterpe oleracea* Mart.) e inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), visando a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante. Assim, foi utilizado um planejamento experimental multivariado com um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo os resultados avaliados por meio de gráficos de superfícies de resposta e de análises estatísticas. Os extratos das duas amostras de tortas foram obtidos de acordo com os ensaios do planejamento experimental e os efeitos das variáveis exploratórias - temperatura de extração (°C) e concentração de etanol (%, v/v) - foram avaliados sobre a atividade antioxidante (variável resposta), determinada pelos métodos de sequestro do radical livre ABTS, redução do Fe^{3+} (FRAP) e redução do reagente Folin-Ciocalteau. Os gráficos de superfície de resposta gerados para ambas as amostras, para os três métodos empregados, indicaram a mesma condição de extração, correspondente a temperatura de 70°C e concentração de etanol a 50% (v/v). Os modelos matemáticos obtidos mostraram-se adequados e indicaram que os valores preditos foram próximos aos observados em escala laboratorial. Portanto, a utilização da metodologia de superfície de resposta possibilitou a determinação de uma condição ideal dentro de uma faixa de interesse, considerando-se o intervalo e as condições analisadas, para a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante.

Palavras chave: Atividade antioxidante; Resíduos de frutas; Compostos fenólicos; Superfície de respostas

Abstract

The agroindustrial activity generates large amounts of solid residues throughout processing, among which are the “cakes”, fruit residues from mechanical pressing aiming oil extraction. These residues are generally discarded in the environment or directed to animal feeding. Once bioactive compounds are present in low concentrations in vegetable matrices, this paper aimed to determine the ideal extraction condition for cakes of Amazonian fruits, namely *açaí-do-Pará* (*Euterpe oleracea* Mart.) and *inajá* (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), in order to obtain extracts with high antioxidant activities. Thus, a multivariate experimental design with a Central Composite Rotational Design (CCRD) was used, and the results were evaluated through response surface graphs and statistical analyzes. The extracts from the two cakes were obtained according to each essay of the experimental design and the effects of the exploratory variables – extraction temperature (ºC) and ethanol concentration (%, v/v) – were

evaluated on antioxidant activities (dependent variable), determined by the methods of ABTS radical scavenging, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and Folin-Ciocalteau reagent reduction. The response surface graphs generated for both samples signaled the same extraction condition, corresponding to a temperature of 70ºC and ethanol concentration at 50% (v/v). The mathematical models obtained were adequate and indicated that the predicted values were close to those observed in laboratory tests. Therefore, the response surface methodology application allowed the determination of an ideal condition within a range of interest, considering the conditions analyzed, to obtain extracts with high antioxidant activities.

Keywords: Antioxidant activity; Fruit residues; Phenolic compounds; Response surface methodology

3.1. Introdução

A agroindústria brasileira constitui um setor de grande impacto sobre a economia do país, e sua atividade traz como resultados tanto uma grande variedade de produtos quanto quantidades expressivas de resíduos sólidos, geralmente descartados no meio ambiente ou destinados à alimentação animal. No entanto, estes resíduos podem constituir fontes naturais de compostos bioativos, como polifenóis, e substâncias com potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (MELO et al., 2015; PACKER et al., 2015; LAZARINI et al., 2016; CALOMENI et al., 2017; DE CAMARGO et al., 2017).

Um exemplo de atividade agroindustrial é a extração de óleo vegetal de frutas, como o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e o inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), destinados tanto a indústria alimentícia quanto à farmacêutica e a cosmética. O processo de extração de óleo destes frutos gera um subproduto de alto valor proteico, denominado “torta”, ainda subvalorizado e descartado como resíduo ou destinado à alimentação animal. Contudo, este material pode apresentar elevada concentração de compostos com atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, o que pode contribuir para a sua valorização, reaproveitamento e reinserção industrial (MATTHÄUS, 2002; PERICIN et al., 2009).

Todavia, tais compostos bioativos são encontrados em baixas concentrações em espécies vegetais, e visando a obtenção de extratos com alta atividade antioxidante a partir desses materiais, bem como sua aplicação industrial, é necessário estudar processos que permitam otimizar a etapa de extração das substâncias de interesse ou encontrar uma combinação de condições que correspondam aos maiores valores de atividade antioxidante dentro de um intervalo de condições de análise (OLDONI et al., 2016). Delineamentos experimentais acompanhados por análises estatísticas podem ser utilizados para essa

finalidade, pois permitem que os efeitos de duas ou mais variáveis exploratórias sobre uma variável resposta sejam avaliados, contribuindo desta forma para a tomada de decisão sobre a melhor combinação de condições que retorna os maiores valores da resposta avaliada.

A utilização do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) aliado à metodologia de superfícies de resposta é um dos métodos que pode ser empregado para o estudo da extração de compostos antioxidantes de matrizes vegetais (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009; MUSHTAQ et al., 2015). Este método matemático e estatístico compreende a análise dos efeitos individuais e de interação das variáveis exploratórias, bem como a geração de regressões polinomiais ajustadas que predizem o comportamento dos resultados obtidos em função das variáveis e do intervalo de condições estudadas. Dentre as vantagens que a sua utilização oferece está a menor quantidade de ensaios requeridos para que seja encontrada a região de interesse ou o ponto ótimo da resposta desejada. De posse dos dados gerados é possível ajustar e melhorar processos por meio da racionalização de recursos, redução de despesas, redução do número de ensaios, otimização do tempo, dentre outros fatores, o que leva ao aumento da eficiência do processo (MAJEED et al., 2016).

A extração dos compostos antioxidantes pode ser afetada por muitas variáveis, como razão massa:solvente, tipo e concentração do solvente extrator, temperatura de extração, tempo, pH, tamanho de partícula, agitação, sonicação, dentre outras (D'ALESSANDRO et al., 2012; STOICA et al., 2013; WANG et al., 2016). Tais variáveis podem influenciar positiva ou negativamente a resposta analisada, como também apresentarem efeitos individuais e/ou de interação que podem ser observados quando empregados planejamentos experimentais multivariados, que possibilitam a avaliação dos resultados pela construção de gráficos de superfície de respostas. Estes planejamentos mostram-se menos dispendiosos em comparação aos experimentos da otimização clássica, que avalia a influência de somente um fator por vez sobre a resposta desejada e que pode não determinar corretamente os efeitos de interação das variáveis (MAJEED et al., 2016).

Para resíduos de frutas nativas brasileiras, como o açaí e o inajá, o emprego da metodologia de superfície de resposta visando a determinação da região ótima de extração de compostos antioxidantes ainda é escasso. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a condição ótima para a extração de compostos antioxidantes naturais provenientes de tortas do processamento de açaí e de inajá, por meio da utilização de planejamento experimental multivariado.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Obtenção e preparo dos extratos

As amostras de tortas dos frutos açaí e inajá (Figura 1), originários do estado do Pará, foram fornecidas pela empresa Citróleo, localizada no município de Torrinha, interior do estado de São Paulo. Foram recebidos 5 kg de cada torta, sendo a torta de açaí proveniente de Santa Luzia do Pará (Comunidade do Fuzil, 1°41´11,24´´S 46°51´16,20´´O) e a de inajá proveniente de Santo Antonio do Tauá (Comunidade do Remédio, 1°05´27,86´´S 48°11´18,26´´O), ambas localizadas na região nordeste do Pará. A coleta da torta de açaí foi realizada pela empresa no início do mês de novembro de 2016, e recebida neste mesmo período. Já a torta de inajá foi obtida em coleta realizada no mês de abril de 2017 e recebida no mesmo mês. Os materiais recebidos foram homogeneizados, porcionados, acondicionados em sacos plásticos bem fechados, e armazenados em freezer à temperatura de -18°C até o momento das análises

Figura 1. Aspectos das amostras de tortas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (A) e de inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude) (B).

As amostras das tortas de açaí e de inajá foram moídas criogenicamente com nitrogênio líquido (-196°C) e, então, desengorduradas com hexano na proporção de 1:5 (m/v). Na sequência, a mistura foi centrifugada a 5000 x g durante 10 minutos. Após a realização do processo de desengorduramento por duas vezes, a fração precipitada foi coletada e o sobrenadante descartado. O solvente foi evaporado do material precipitado por meio de uma corrente de ar em uma câmara de fluxo. Após seco, o material moído e desengordurado foi armazenado a -18°C, até o momento das análises.

Os extratos das tortas de açaí e inajá foram produzidos em triplicata, pela pesagem de 50mg do material devidamente desengordurado, seguida da adição de 1 mL da solução

extratora hidroetanólica. A mistura foi levada para banho termostatizado por 30 minutos, de acordo com as condições do planejamento experimental, seguida de banho ultrassônico (180 W) por 15 minutos, e centrifugação (5000 x g) a 4ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas análises.

3.2.2. Determinação das condições de extração de compostos antioxidantes pela metodologia de superfície de resposta

As superfícies de resposta foram geradas a partir da utilização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo obtidos os modelos equacionais matemáticos que permitiram estudar a atividade antioxidante dos extratos frente à alteração de duas variáveis exploratórias: a temperatura de extração (T, °C) e a concentração de etanol (%, v/v), utilizado como solvente extrator. O planejamento contou com três repetições no ponto central e α = ± 1,41, sendo a variável resposta a atividade antioxidante, determinada por três diferentes métodos analíticos. Os valores mínimos e máximos de α foram estabelecidos com base na literatura (MELO et al., 2015), e os demais pontos do intervalo do estudo foram calculados (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Níveis reais e codificados do planejamento experimental.

Variáveis exploratórias	**Níveis de variação**				
	- α	**-1**	**0**	**1**	**α**
Temperatura de extração (ºC)	25	32	50	68	75
Etanol (%, v/v)	50	56	70	84	90

Tabela 2. Planejamento experimental – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Ensaios (E)	Variáveis exploratórias			
	Valores codificados		Valores reais	
	Temperatura de extração (ºC)	Etanol (%, v/v)	Temperatura de extração (ºC)	Etanol (%, v/v)
E1	-1	1	32	84
E2	1	1	68	84
E3	-1	-1	32	56
E4	1	-1	68	56
E5	0	0	50	70
E6	0	0	50	70
E7	0	0	50	70
E8	-1,41	0	25	70
E9	0	1,41	50	90
E10	1,41	0	75	70
E11	0	-1,41	50	50

A atividade antioxidante dos extratos obtidos das tortas foram determinadas pelos métodos de redução do reagente Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999), capacidade de redução do Fe^{+3} (FRAP) (GRIFFIN; BHAGOOLI, 2004) e sequestro do radical livre ABTS (AL-DUAIS; MULLER; JETSCHKE, 2009).

As respostas de atividade antioxidante obtidas em cada ensaio para cada método empregado, bem como os valores descodificados (reais) para cada ensaio, foram analisadas utilizando o *software* Statistica versão 12. Os dados experimentais foram analisados e ajustados para um modelo de regressão polinomial de segunda ordem, cuja representação geral é dada pela Equação 1, contendo coeficientes lineares, quadráticos e de interação.

$$Z = b_0 + b_1X + b_2Y + b_{11}X^2 + b_{22}Y^2 + b_{12}XY \quad (1)$$

Nesta equação, Z corresponde à variável dependente (resposta), que foi, neste caso, a atividade antioxidante. Os valores b representam os coeficientes estimados da regressão polinomial, sendo X e Y os valores dos fatores descodificados das variáveis exploratórias (temperatura de extração e concentração de etanol). Os termos lineares são representados por b_1X e b_2Y, enquanto que os termos quadráticos são representados por $b_{11}X^2$ e $b_{22}Y^2$ e estão relacionados à curvatura do gráfico de superfície de resposta, uma vez que o efeito quadrático diz respeito à interação da variável consigo mesma (produto bilateral dos termos). O último

termo da equação, $b_{12}XY$, refere-se ao efeito das interações entre os termos (HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Por meio da análise de variância (ANOVA), os modelos matemáticos e os coeficientes de regressão foram considerados significativos quando os valores de *p* foram inferiores a 0,05. Com a ANOVA ainda foi possível observar a significância da falta de ajuste e os valores de F (*p*=0,05), utilizados para avaliar a adequação do modelo.

3.2.3. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical ABTS, redução do Fe^{+3} e redução do reagente Folin-Ciocalteau

3.2.3.1. Atividade sequestrante do radical ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS foi utilizado o método descrito por Al-Duais; Muller; Jetschke (2009), com modificações. Assim, foram pipetados 20 µL da amostra ou padrão com 220 µL da solução do radical $ABTS^{\bullet+}$, com absorbância previamente ajustada a 0,7 ± 0,02 com tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,4), em microplaca de 96 poços. A solução do radical foi obtida a partir da mistura das soluções ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (140 mM), ambas em água destilada, que reagiu por 16h ao abrigo da luz. O branco da análise foi composto por 240 µL de tampão fosfato e a curva padrão foi obtida a partir de diferentes concentrações de soluções de Trolox, variando de 12,5 a 200 µM. Após 6 minutos de reação ao abrigo da luz, as absorbâncias das amostras foram lidas em leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA), no comprimento de onda de 734 nm. Os resultados foram expressos em micromoles equivalentes ao Trolox por grama de amostra (µmol Trolox/g).

3.2.3.2. Atividade antioxidante pelo método de redução do Fe^{+3} (FRAP)

O método FRAP consiste na capacidade do antioxidante em reduzir Fe^{+3} a Fe^{+2}, e foi executado conforme o descrito por Griffin e Bhagooli (2004) com algumas adaptações. Alíquotas de 20µL do padrão ou da amostra, 30 µL de água destilada e 200 µL do reagente FRAP foram pipetadas em cada poço da microplaca de 96 poços. O reagente FRAP foi obtido pela mistura de 10 partes de solução tampão acetato de potássio (0,3M, pH 3,6), 1 parte de solução cloreto férrico (20mM, em água) e 1 parte de solução TPTZ (10 mM, em solução de

HCl 40 mM). O branco da análise foi composto por 50 µL de água e 200 µL do reagente FRAP.

A microplaca foi agitada e incubada a 37°C durante 8 minutos. Após o tempo de incubação, a absorbância foi medida no comprimento de onda 595 nm em leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA). A curva de calibração foi construída a partir de diferentes concentrações de soluções de sulfato ferroso, que variaram de 100 a 700 µM. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes ao sulfato ferroso por grama de amostra (µmol SF/g).

3.2.3.3. Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau

A capacidade de redução foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton; Orthofer; Lamuela (1999), com algumas modificações. Para a análise, 20µL do padrão ou da amostra e 100µL da solução de Folin-Ciocalteau em água (10%, v/v) foram pipetados em microplaca de 96 poços. Após 5 minutos foram adicionados 75 µL da solução de carbonato de sódio em água (7,5%, v/v). Depois de 40 minutos de reação ao abrigo da luz, a placa foi inserida em uma leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) e a leitura da absorbância realizada no comprimento de onda 740 nm. As leituras foram feitas em triplicata e os resultados expressos em miligramas de equivalentes ao ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g), calculados por meio do ajuste de uma curva de calibração (20 a 120 µg/mL).

3.3. Resultados e discussão

Após a realização das análises de atividade antioxidante pelos métodos $ABTS^{\bullet+}$, FRAP e redução do reagente Folin-Ciocalteau, os resultados de cada ensaio do planejamento experimental foram inseridos no *software* Statistica 12 para construção dos gráficos de superfície de resposta (Tabelas 3 e 4) e análise estatística. Os resultados da atividade antioxidante pelos diferentes métodos foram considerados como sendo a variável dependente (resposta), enquanto que as variáveis temperatura de extração (°C) e concentração de etanol (%, v/v) foram consideradas as variáveis exploratórias.

Tabela 3. Atividade antioxidante (variável resposta) dos extratos de torta de açaí determinada por três diferentes métodos analíticos, de acordo com o planejamento DCCR. Os valores finais são médias das triplicatas e foram utilizados para construção dos gráficos de superfície de respostas.

Ensaios (E)	$ABTS^{\bullet+}$ (µmol Trolox/g amostra)	FRAP (µmol SF/g amostra)	Redução de Folin-Ciocalteau (mg EAG/g amostra)
E1	34,37 ± 2,84	18,37 ± 4,54	2,06 ± 0,13
E2	51,16 ± 4,14	17,30 ± 1,23	5,25 ± 0,26
E3	71,57 ± 9,57	71,82 ± 1,54	6,67 ± 0,29
E4	92,92 ± 6,51	91,37 ± 2,55	8,28 ± 0,48
E5	62,63 ± 2,58	69,05 ± 5,75	5,84 ± 0,88
E6	61,99 ± 2,92	68,16 ± 1,61	5,95 ± 0,20
E7	67,29 ± 3,00	75,53 ± 3,61	5,94 ± 0,30
E8	48,74 ± 4,25	44,69 ± 1,34	3,54 ± 0,24
E9	28,77 ± 2,76	31,91 ± 1,97	2,04 ± 0,04
E10	84,31 ± 7,36	82,76 ± 2,55	8,03 ± 0,88
E11	84,74 ± 0,92	84,91 ± 0,12	7,14 ± 0,17

Legenda: EAG=equivalentes ao ácido gálico; SF=equivalentes ao sulfato ferroso.

Tabela 4. Atividade antioxidante (variável resposta) dos extratos de torta de inajá determinada por três diferentes métodos analíticos, de acordo com o planejamento DCCR. Os valores finais são médias das triplicatas e foram utilizados para construção dos gráficos de superfície de respostas.

Ensaios (E)	$ABTS^{\bullet+}$ (µmol Trolox/g amostra)	FRAP (µmol SF/g amostra)	Redução de Folin-Ciocalteau (mg EAG/g amostra)
E1	79,40 ± 4,43	35,71 ± 3,85	4,72 ± 0,68
E2	149,51 ± 6,15	71,94 ± 3,56	8,13 ± 0,49
E3	153,18 ± 20,26	107,83 ± 1,20	13,45 ± 0,40
E4	175,34 ± 12,83	156,54 ± 10,07	17,47 ± 0,69
E5	167,36 ± 7,03	113,12 ± 4,05	13,03 ± 0,27
E6	155,41 ± 11,88	88,46 ± 15,68	11,86 ± 2,04
E7	159,59 ± 13,05	91,43 ± 6,43	11,07 ± 1,24
E8	102,60 ± 14,82	64,66 ± 7,13	7,41 ± 0,90
E9	103,99 ± 17,87	42,11 ± 3,82	4,42 ± 0,54
E10	156,73 ± 23,73	115,56 ± 8,83	13,04 ± 0,16
E11	167,39 ± 8,04	114,60 ± 4,49	13,46 ± 0,26

Legenda: EAG=equivalentes ao ácido gálico; SF=equivalentes ao sulfato ferroso.

Os valores dos efeitos das variáveis analisadas na etapa de otimização da extração de compostos antioxidantes das tortas de açaí e de inajá estão apresentados na Tabela 5.

Quando o método de sequestro do radical ABTS foi utilizado para a otimização da extração de compostos antioxidantes da torta de açaí, observou-se que o efeito quadrático da variável temperatura, assim como o efeito da interação entre as variáveis lineares, não foi significativo a $p<0,05$, o que indica que, dentro das condições empregadas, tais parâmetros não possuem influência na extração dos compostos antioxidantes e na resposta avaliada. Os demais efeitos foram estatisticamente significativos, sendo que o efeito linear da temperatura resultou em um aumento de atividade antioxidante de cerca de 22 μmol Trolox/g de amostra, equivalente a 30%, aproximadamente. Já os efeitos linear e quadrático da concentração de etanol na solução extratora foram significativos, mas negativos, indicando que o aumento da concentração de etanol desfavorece a extração dos antioxidantes, diminuindo o valor da resposta analisada em, aproximadamente, 48% (efeito linear) e 34% (efeito quadrático) (Tabela 5).

Tabela 5. Efeitos significativos das variáveis exploratórias sobre a variável resposta atividade antioxidante. Limite de confiança ao nível de 5% de probabilidade.

Resíduo	Método	Variáveis significativas	Efeitos	Erro puro	Valor de *p*	R^2	CReg	Erro puro	Valor de *p*
Açaí	ABTS$^{\cdot-}$	Média	63,9665	1,636480	0,0000	0,94743	38,2337801	27,8127176	0,1819
		Temperatura (°C) (L)	22,2815	2,022342	0,0000		0,618929426	0,0561761702	0,0000
		Etanol (%, v/v) (L)	-39,3305	1,994168	0,0000		1,2957131	0,803959722	0,1201
		Etanol (%, v/v) (Q)	-6,7147	2,343295	0,0085		-0,0192883784	0,00571999226	0,0025
	FRAP	Média	70,5577	1,319299	0,0000	0,89452	-86,2178715	25,8314308	0,0045
		Temperatura (°C) (L)	20,7334	1,806782	0,0000		2,30063315	0,318238855	0,0000
		Temperatura (°C) (Q)	-11,1378	2,057294	0,0000		-0,017116932	0,00317442431	0,0001
		Etanol (%, v/v) (L)	-47,2898	1,703551	0,0000		4,08926554	0,67310642	0,0000
		Etanol (%, v/v) (Q)	-16,2287	1,902699	0,0000		-0,041165866	0,00485090601	0,0000
	CR	Média	5,90693	0,141649	0,0000	0,95626	2,62592115	2,94932364	0,3821
		Temperatura (°C) (L)	2,80644	0,175048	0,0000		-0,0321654946	0,0344214368	0,3594
		Etanol (%, v/v) (L)	-3,69439	0,172610	0,0000		0,193866048	0,0737224776	0,0147
		Etanol (%, v/v) (Q)	-1,11372	0,245349	0,0000		-0,00288905204	0,000495106473	0,0000
		Interação (1Lby2L)	0,79288	0,2453491	0,0035		0,00157317538	0,000486803794	0,0036
Inajá	ABTS$^{\cdot-}$	Média	160,7541	3,032653	0,0000	0,92079	3,495332	74,89661	0,9632
		Temperatura (°C) (L)	43,9782	4,349604	0,0000		2,203234	1,13257	0,0666
		Temperatura (°C) (Q)	-27,7375	5,019361	0,0000		-0,042805	0,00775	0,0000
		Etanol (%, v/v) (L)	-46,8162	4,122115	0,0000		3,718795	1,74041	0,0458
		Etanol (%, v/v) (Q)	-21,6920	4,621328	0,0001		-0,055337	0,01179	0,0000
		Interação (1Lby2L)	23,7518	5,812917	0,0006		0,047127	0,01153	0,0000
	FRAP	Média	97,5102	2,361025	0,0000	0,91554	11,69266	56,67560	0,8390
		Temperatura (°C) (L)	38,7013	3,902221	0,0000		1,07504	0,10840	0,0000
		Etanol (%, v/v) (L)	-65,7249	3,856314	0,0000		3,26348	1,64302	0,0633
		Etanol (%, v/v) (Q)	-15,7102	4,577593	0,0032		-0,04008	0,01168	0,0032
	CR	Média	11,97704	0,321822	0,0000	0,91262	-7,53668647	6,39499997	0,2501
		Temperatura (°C) (L)	3,87743	0,397704	0,0000		0,275626445	0,0752885034	0,0012
		Temperatura (°C) (Q)	-1,08812	0,482589	0,0335		-0,00167920055	0,000744735872	0,0335
		Etanol (%, v/v) (L)	-7,67055	0,392163	0,0000		0,557673995	0,16517382	0,0025
		Etanol (%, v/v) (Q)	-2,32854	0,460821	0,0000		-0,00594015854	0,00117556386	0,0000

Legenda: CR=Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau; L=efeito linear; Q=efeito quadrático; CReg=coeficientes de regressão.

A Tabela 5 ainda mostra que quando o método FRAP foi utilizado para a análise da torta de açaí, verificou-se que, com exceção da interação, todas as variáveis apresentaram efeitos significativos. Somente o efeito linear da temperatura foi positivo, indicando que a extração das substâncias de interesse é favorecida quando esta variável passa de um nível inferior a um nível superior, mantendo-se a concentração de etanol constante. O aumento na extração foi de 20,7 μmol SF/g amostra, aproximadamente 27%, ao passo que os demais efeitos afetaram negativamente a extração dos compostos de interesse nas condições avaliadas.

O efeito mais pronunciado foi o da variável concentração de etanol (linear), que indicou um decréscimo de 47,3 μmol SF/g amostra, quando a concentração do solvente aumentou. Os resultados indicaram que o aumento da temperatura favorece a extração dos compostos antioxidantes, mas o efeito quadrático, embora significativo, desfavorece a extração, e confirmaram novamente que o aumento da concentração do solvente implica em respostas menores.

Para a otimização da extração de antioxidantes da torta de açaí pelo método de redução do reagente Folin-Ciocalteau foi verificado que somente o efeito quadrático da variável temperatura não foi significativo a $p<0,05$ (Tabela 5). Os demais efeitos das variáveis foram significativos sobre a resposta: os efeitos linear e quadrático da variável concentração de etanol foram negativos e os efeitos da interação e da variável temperatura (linear) foram positivos. Os efeitos negativos indicam que a extração dos compostos antioxidantes é desfavorecida quando a variável concentração de etanol passa de seu nível inferior para o superior mantendo-se uma temperatura constante; e que o efeito quadrático (interação de uma variável consigo mesma) também provoca o mesmo comportamento da perda de extração de antioxidantes. Todavia, os efeitos da temperatura (linear) e da interação entre as variáveis indicam favorecimento da extração dos compostos antioxidantes.

Analisando-se os resultados estatísticos da Tabela 5 para a otimização do extrato de torta de inajá pelo método do $ABTS^{\bullet+}$, nota-se que todas as variáveis e a interação foram significativos a $p<0,05$. O efeito linear da temperatura apresentou o maior valor, indicando que quando a temperatura de extração sofre um aumento dentro do planejamento testado, a extração dos antioxidantes pode aumentar em até cerca de 44 μmol trolox/g amostra. A interação das variáveis também apresentou efeito positivo, com um valor de 23,75 μmol trolox/g amostra. Todavia, os demais efeitos foram negativos, sendo o mais expressivo aquele estimado para a concentração de etanol (linear), correspondente a aproximadamente -46,87 μmol trolox/g amostra.

Na avaliação pelo método FRAP, somente os efeitos de interação e o quadrático da variável temperatura não foram significativos a $p<0,05$. O aumento da temperatura favoreceu consideravelmente a extração dos compostos antioxidantes, indicando que o aumento da temperatura neste caso contribuiu de maneira significativa para a atividade antioxidante pela redução do Fe^{+3}. Por outro lado, o efeito linear da concentração de etanol novamente se destacou de maneira negativa, mostrando que o aumento desta variável prejudica a capacidade antioxidante da amostra e a extração de tais compostos.

Os resultados obtidos pelo método de redução do reagente Folin-Ciocalteau, apresentados na Tabela 5, indicaram que as variáveis apresentaram efeitos lineares e quadráticos significativos, mas que o efeito da interação de ambas não influenciou a extração significativamente ($p<0,05$). O efeito linear e positivo da temperatura aponta que o aumento dos valores desta variável culmina em uma maior resposta. Já os efeitos quadráticos das duas variáveis estudadas, bem como o efeito linear da concentração de etanol, estão relacionados ao decréscimo da atividade antioxidante, pois são negativos.

Portanto, e de acordo com os gráficos gerados e com a análise dos efeitos estimados apresentados na Tabela 5, foi possível constatar que os extratos das tortas de açaí e de inajá têm comportamentos bastante similares frente ao planejamento experimental avaliado. As condições de extração consideradas ideais foram escolhidas dentro da zona ótima de extração, com base na utilização de temperatura e concentração de etanol tão menores quanto possível, isto é, temperatura de extração de 70°C e solução extratora etanol: água a 50% (v/v).

Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) variaram de 0,89 a 0,95 (Tabela 5), o que indica que entre 89 e 95% dos resultados encontrados e das variações podem ser explicados pelos modelos de regressão. A fim de se verificar os ajustes dos modelos, bem como a significância de cada termo, foram realizadas análises de regressão e de variância (ANOVA) cujos resultados estão mostrados na Tabela 7.

A análise de variância mostrou que todas as regressões foram significativas e preditivas pelo fato do $F_{calculado}$ ser superior ao valor do $F_{tabelado}$ em mais de três vezes, considerando $p=0,05$; e que, com exceção dos resultados de atividade antioxidante determinada pelo método FRAP para as tortas de açaí e de inajá, e pelo método de CR para o resíduo de inajá, a falta de ajuste de todos os modelos gerados foi um parâmetro não significativo a $p=0,05$.

Tabela 6. Análise de variância para os efeitos das variáveis exploratórias sobre a atividade antioxidante de extratos de tortas de açaí e de inajá. Os valores seguidos por asterisco (*) indicam que a fonte de variação foi significativa ao nível de significância de 5%.

Resíduo	Método	Fonte de Variação	S.Q.	G.L.	M.Q.	Teste F	$F_{tabelado}$ (p 0,05)	R^2
Açaí	**$ABTS^{\bullet+}$**	Regressão	12576,026	3	4192,0088	174,20*	2,934	0,9474
		Resíduo	697,85	29	24,0639			
		Falta de ajuste	119,36	5	23,8728	0,99	2,621	0,9420
		Erro puro	578,49	24	24,1037			
		Total	13273,88	32				
	FRAP	Regressão	15938,983	4	3984,7457	31,72*	2,714	0,8192
		Resíduo	3517,88	28	125,6385			
		Falta de ajuste	1640,68	4	410,1688	5,24*	2,776	0,7934
		Erro puro	1877,20	24	78,2167			
		Total	19456,86	32				
	CR	Regressão	137,180	4	34,2949	153,02*	2,714	0,956
		Resíduo	6,28	28	0,2241			
		Falta de ajuste	1,9413	4	0,4853	2,69	2,776	0,9500
		Erro puro	4,3341	24	0,1806			
		Total	143,4552	32				
Inajá	**$ABTS^{\bullet+}$**	Regressão	22341,350	5	4468,2700	51,15*	2,661	0,92089
		Resíduo	1921,92	22	87,3600			
		Falta de ajuste	349,1800	3	116,3933	1,41	3,127	0,9028
		Erro puro	1572,7400	19	82,7758			
		Total	24263,2700	27				
	FRAP	Regressão	27505,710	5	5501,1420	45,89*	2,714	0,9198
		Resíduo	2397,51	20	119,8755			
		Falta de ajuste	1192,7900	3	397,5967	5,61*	3,197	0,8998
		Erro puro	1204,7200	17	70,8659			
		Total	29903,2200	25				
	CR	Regressão	469,664	4	117,4159	73,11*	2,714	0,9126
		Resíduo	44,97	28	1,6061			
		Falta de ajuste	22,5983	4	5,6496	6,06*	2,776	0,9001
		Erro puro	22,3720	24	0,9322			
		Total	514,6340	32				

Legenda: CR=Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau; SQ=soma quadrática; GL=graus de liberdade; MQ=média quadrática

A falta de ajuste significativa pode ser justificada pelo fato dos valores da média quadrática (M.Q.) para o erro puro terem sido consideravelmente baixos, o que resulta em um maior valor de $F_{calculado}$ obtido pela razão $M.Q._{falta\ de\ ajuste}/M.Q._{erro\ puro}$. Uma vez que o erro puro está relacionado às variações provocadas por erros experimentais aleatórios, nota-se que devido ao fato de os valores obtidos no experimento se mostrarem bastante próximos, o valor

do erro puro apresenta-se baixo, indicando que houve pouca variabilidade provocada por condições aleatórias. Quando este valor baixo é considerado e utilizado no denominador da razão, o valor resultante de $F_{calculado}$ será maior. Os gráficos de superfície de resposta e os gráficos de contorno para os extratos dos resíduos estão apresentados nas figuras de 2 a 7.

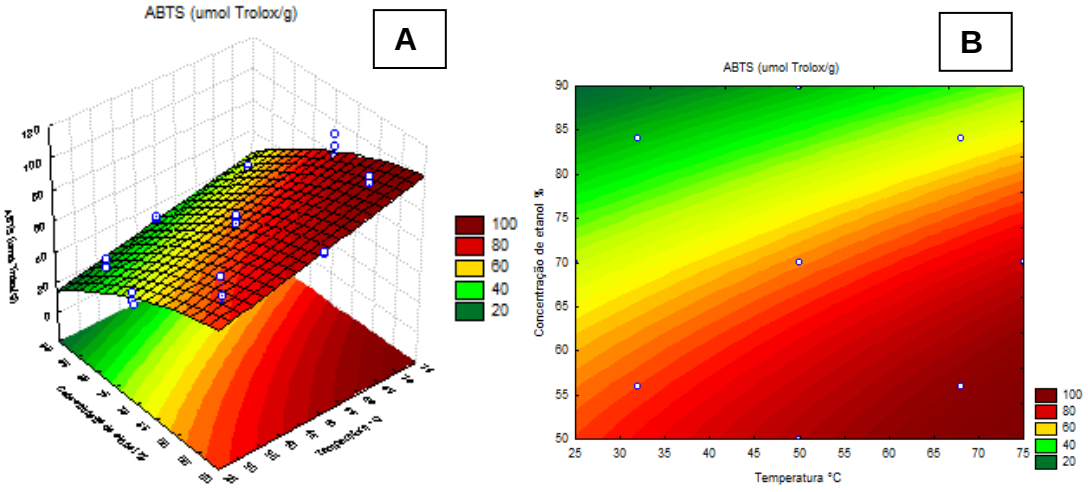


Figura 2. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para o sequestro do radical ABTS pelo extrato da torta de açaí. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v).

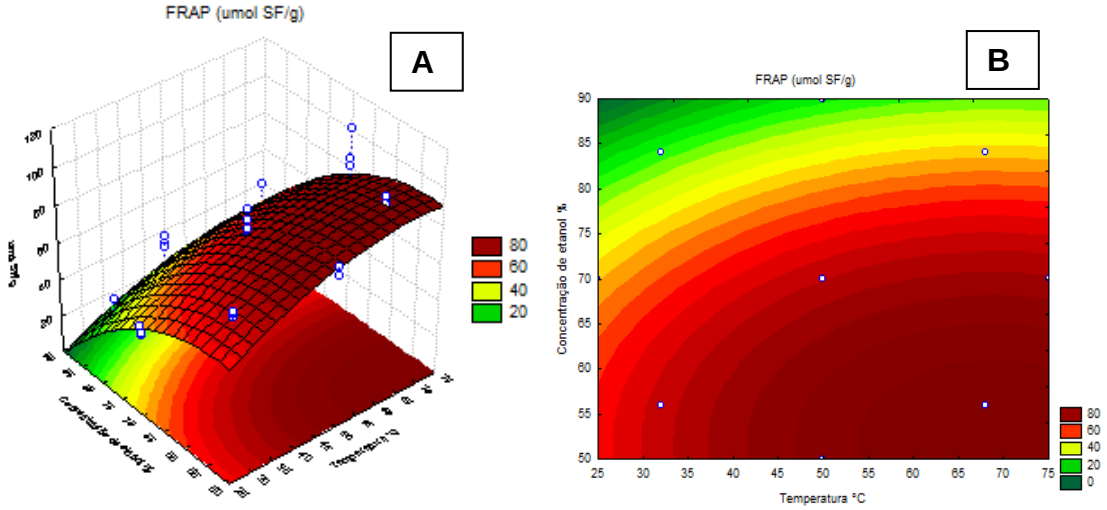


Figura 3. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a análise de FRAP pelo extrato da torta de açaí. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v).

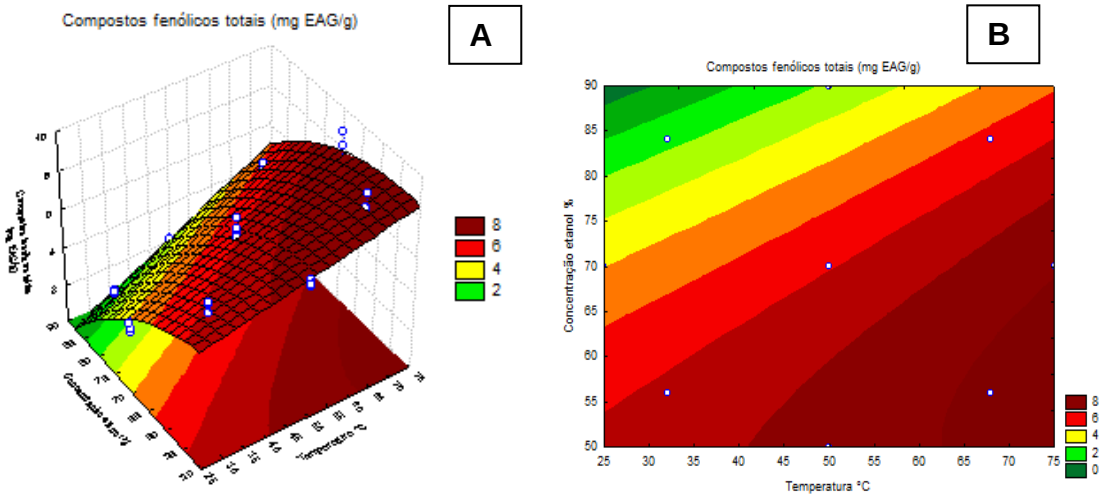


Figura 4. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau pelo extrato da torta de açaí. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v).

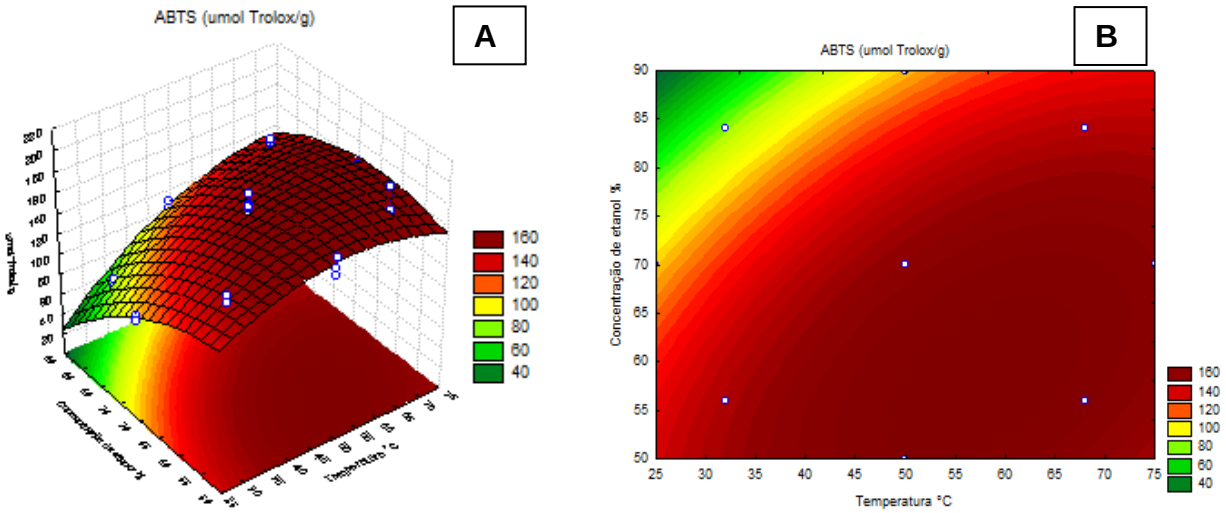


Figura 5. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para o sequestro do radical ABTS pelo extrato da torta de inajá. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v).

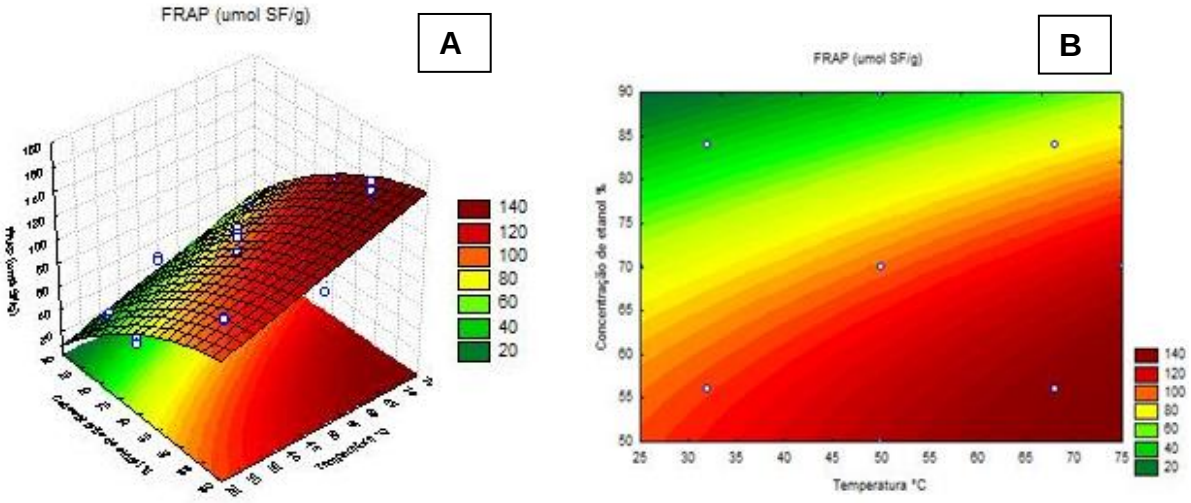


Figura 6. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a análise de FRAP pelo extrato da torta de inajá. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v).

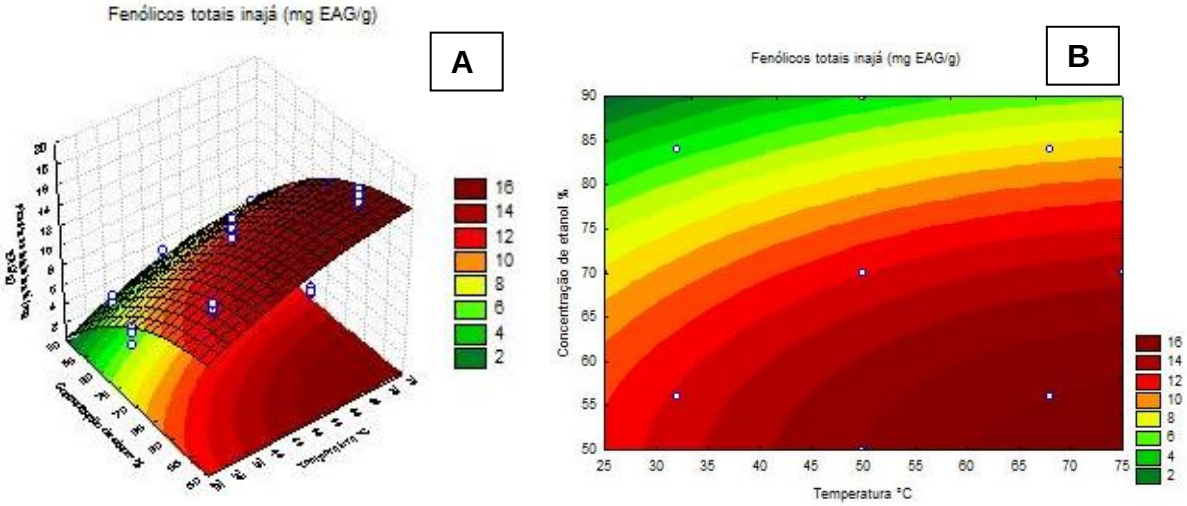


Figura 7. Gráficos de Superfície de Resposta (A) e de contornos (B) para a capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau pelo extrato da torta de inajá. As regiões em vermelho escuro correspondem à condição de extração que retorna o maior valor de atividade antioxidante dentro do intervalo estudado. As abscissas correspondem à temperatura de extração (°C), e o eixo das ordenadas, a concentração de etanol (%, v/v).

Os resultados observados nos gráficos de superfície de resposta indicam, de maneira geral, que as regiões de máxima extração dos compostos antioxidantes, considerando as variáveis exploratórias e o intervalo de condições estudadas, encontram-se nas faixas em que a concentração do etanol na solução extratora é menor e a temperatura de extração é maior. Tal comportamento foi observado para ambas as amostras analisadas e pelos três métodos analíticos de avaliação da atividade antioxidante (Figuras 2 a 7).

A utilização da metodologia de superfície de respostas teve como objetivo determinar o intervalo de condições que permitissem a maior extração de substâncias antioxidantes. A obtenção das faixas ótimas de extração, em detrimento à identificação dos pontos ótimos de extração, permitiu que fosse escolhida a melhor condição de extração, considerando também outros fatores como mão-de-obra e custo operacional, por exemplo, quando se pensa em aplicações industriais.

Nas regiões em que as respostas foram maiores, correspondentes à cor vermelha escura, observou-se que a concentração da solução extratora (etanol: água) variou de 50 a cerca de 55% (v/v), indicando que menores concentrações de etanol favorecem a extração dos compostos antioxidantes nas condições testadas (Figuras 2 a 7). Diversos fatores podem influenciar a maior ou menor extração das substâncias de interesse, sendo exemplos as estruturas moleculares dos compostos antioxidantes, as matrizes vegetais, os métodos de extração, o tipo e composição do solvente extrator, dentre outros (DO et al., 2014; ZŁOTEK et al., 2016). Dentre as condições analisadas, verificou-se que a composição da solução extratora influenciou significativamente a variável resposta.

A literatura mostra, de maneira geral, que a extração dos compostos antioxidantes de diferentes tipos de amostras é realizada com a combinação de solventes com diferentes polaridades, soluções aquosas de um ou mais solventes ou ainda com soluções acidificadas. Dentre os principais solventes utilizados, combinados ou não, estão metanol, etanol, acetona e água. Embora o etanol possa ser menos eficiente em comparação a outros solventes para a extração de compostos antioxidantes, devido à sua cadeia carbônica ser maior do que a do metanol (DO et al., 2014), neste trabalho foram utilizadas somente soluções aquosas de etanol devido a baixa toxicidade deste solvente em comparação a outros, além do seu menor custo.

O etanol é capaz de solubilizar tanto substâncias polares quanto substâncias orgânicas apolares. Os resultados indicados pelos gráficos de superfície de resposta apontam que as soluções com menores concentrações de etanol extraem com maior eficiência os compostos antioxidantes e os polifenóis presentes, pois a maioria destas substâncias bioativas possui caráter polar (HUANG et al., 2002). A melhor solvatação das substâncias pelos solventes mais polares está relacionada à interação das regiões polares dos compostos antioxidantes com o respectivo meio (BOEING et al., 2014).

As equações polinomiais geradas para as superfícies de resposta de cada resíduo agroindustrial, analisado pelos 3 diferentes métodos de determinação de atividade antioxidante, estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Modelos matemáticos gerados para as superfícies de resposta das amostras de torta de açaí e de inajá. As respostas de atividade antioxidante foram obtidas por diferentes métodos analíticos de avaliação da atividade antioxidante.

Resíduos	Método	Modelo matemático
Açaí	$ABTS^{\bullet+}$	z= 38,233780141374+,61892942608828*x+1,2957131045911*y-,019288378382537*y^2+0,
	FRAP	z= -86,217871536144+2,3006331492295*x-,017116932023039*x^2+4,0892655371465*y-,041165866045001*y^2+0,
	CR	z=2,6259211549513-,032165494578395*x+,19386604754928*y-,0028890520440673*y^2+,0015731753784367*x*y+0,
Inajá	$ABTS^{\bullet+}$	z= 3,4953315244933+2,2032338243661*x-,042804791197039*x^2+3,7187948614105*y-,055336664936455*y^2+,047126606464094*x*y+0,
	FRAP	z= 11,692658919293+1,0750359617667*x+3,2634817409992*y-,040077133662863*y^2+0,
	CR	z= -7,5366864726446+,27562644499892*x-,0016792005532804*x^2+,55767399520283*y-,0059401585362935*y^2+0,

Para que os modelos descodificados gerados pelas superfícies de resposta fossem validados, um novo ensaio foi realizado em laboratório utilizando as condições de extração consideradas ótimas indicadas pelas superfícies. Os valores preditos foram obtidos substituindo-se "X" pelo valor 70 (correspondente à condição ideal da variável temperatura de extração, °C), e "Y" pelo valor 50 (correspondente à condição ideal da concentração de etanol da solução extratora, em % v/v). Os resultados obtidos em laboratório e os previstos pelos modelos estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da atividade antioxidante de cada resíduo preditos pelas equações polinomiais e os observados em laboratório.

Resíduo	Método	Resultado predito pelo modelo	Resultado observado
Açaí	$ABTS^{\bullet+}$	98,12 µmol Trolox/g amostra	51,61 ± 3,86 µmol Trolox/g amostra
	FRAP	92,50 µmol SF /g amostra	90,42 ± 8,46 µmol SF /g amostra
	CR	8,35 mg EAG/g amostra	10,08 ± 0,82 mg EAG/g amostra
Inajá	$ABTS^{\bullet+}$	160,52 µmol Trolox/g amostra	310,16 ± 2,57 µmol Trolox/g amostra
	FRAP	149,93 µmol SF /g amostra	162,28 ± 4,85 µmol SF /g amostra
	CR	16,56 mg EAG/g amostra	17,30 ± 0,25 mg EAG/g amostra

Legenda: CR=Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau; EAG=equivalentes ao ácido gálico; SF=equivalentes ao sulfato ferroso.

Os resultados preditos pelas equações polinomiais e os observados em laboratório mostraram-se próximos de maneira geral, com exceção dos resultados de atividade antioxidante determinados pelo sequestro do radical $ABTS^{\bullet+}$ para ambas as amostras. Tal comportamento pode ser justificado pelo acúmulo de variações aleatórias e não controláveis que podem ocorrer ao longo da análise, como diluição, pipetagem e até mesmo durante o processo de extração e tempo de armazenamento da amostra. Embora a falta de ajuste para alguns modelos gerados tenha sido significativa, observa-se que as regressões mostram-se preditivas, comportamento que se deve ao baixo valor do erro puro.

A metodologia de superfície de respostas pode ser utilizada para diferentes objetivos, dentre os quais para a otimização da extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes. Esta etapa pode combinar diversos procedimentos de preparo de amostra e técnicas de extração, que podem influenciar significativamente a resposta de atividade antioxidante ou do teor de compostos fenólicos totais, a exemplo de métodos físicos, extração por solvente e extrações assistidas por ultrassom (HIDALGO; ALMAJANO, 2017).

Dentro do procedimento de extração de compostos fenólicos, múltiplas variáveis podem ser avaliadas, a exemplo da extração com a utilização de solventes por maceração ou pela extração com solvente envolvendo transferência de massa, que compreende a aplicação de aquecimento e utilização de diferentes solventes, sejam eles puros ou combinados.

Os compostos fenólicos podem diferir quanto à polaridade, o que pode justificar a utilização de misturas de solventes extratores com polaridades variadas como acetona, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, água, entre outros. Para que seja obtido um extrato com elevada atividade antioxidante é interessante utilizar uma solução extratora com um gradiente de polaridade, a fim de que sejam recuperados tantos os fenólicos mais polares quanto os mais apolares. Contudo, a utilização de técnicas de extração ecologicamente corretas é altamente desejável, visto que o emprego de solventes “verdes”, como o etanol, possui impacto menor ao meio ambiente e contribui na garantia da sustentabilidade em pesquisas analíticas (DENT et al., 2013).

Observa-se que, geralmente, os solventes extratores constituídos por uma mistura de água e álcoois (metanol, etanol, butanol, entre outros) apresentam maior eficiência de extração das substâncias fenólicas em comparação aos constituídos somente por um tipo de solvente, sendo o etanol o solvente menos tóxico quando comparado a outros como acetona, hexano e metanol. Além disso, a eficiência do solvente extrator composto por uma mistura etanol: água tem sido relatada como sendo maior quando as concentrações deste álcool variam

de 40 a 70% (v/v) (D'ALESSANDRO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015; TORMA et al., 2017).

Este comportamento também foi observado no presente estudo. Avaliando-se os gráficos de superfície de resposta somente pelo efeito do etanol sobre a resposta, é possível observar maior eficiência de extração em concentrações de cerca de 50-55% (v/v). Além disso, existe uma tendência que indica que concentrações ainda menores possam retornar valores de atividade antioxidante maiores do que os observados no intervalo estudado.

Ainda na etapa de extração foi utilizada a sonicação pelo fato desta técnica ser aplicável no segmento industrial e por favorecer a extração de compostos bioativos intracelulares. A extração assistida por ultrassom baseia-se na indução da cavitação, fenômeno físico que consiste na criação, aumento e implosão de cavidades de vapor de gases por diferença de pressão, resultado no rompimento das paredes e membranas celulares. Como consequência, ocorre a difusão e a liberação dos compostos intracelulares, dentre os quais estão os compostos fenólicos (ADJÉ et al., 2010; HIDALGO; ALMAJANO, 2017).

Outras técnicas de extração também podem ser empregadas e suas variáveis analisadas por delineamentos que geram superfícies de resposta. Neste trabalho a etapa de extração combinou diferentes técnicas (extração com o uso de solvente, uso de temperatura, sonicação e centrifugação à baixa temperatura), as quais podem influenciar as respostas finais (D'ALESSANDRO et al., 2012; STOICA et al., 2013; WANG et al., 2016). No entanto, optou-se por somente analisar a variação dos efeitos da temperatura e da concentração do solvente extrator, por serem esses os fatores de maior contribuição na extração dos compostos de fenólicos, mantendo-se assim as demais condições constantes.

Para tortas de frutas nativas brasileiras, como o açaí e o inajá, a utilização do método de superfícies de resposta visando a obtenção de extratos ricos em polifenóis ainda é escassa. Observa-se de maneira geral que os trabalhos desenvolvidos partem de condições de extração pré-estabelecidas, e não a partir de um delineamento experimental visando estudar a influência de variáveis sobre a resposta desejada para, assim, ser definida a melhor condição de extração.

Com o objetivo de extrair compostos fenólicos de açaí destinados à produção de polpa, Pompeu; Silva; Rogez (2009) avaliaram a influência da concentração de etanol, ácido clorídrico e temperatura no teor de compostos fenólicos totais, com base em um planejamento DCCR com 3 fatores e 5 níveis. Os resultados encontrados pelos autores vão ao encontro dos obtidos no presente trabalho, pois indicam que o aumento da temperatura favorece a extração

dos compostos fenólicos dentro das condições analisadas (29,5, 45 e 60,5 °C e proporção amostra:solvente de 1:4) (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009). Com o aumento de temperatura de 29,5 para 45°C, e de 45°C para 60,5°C, os autores obtiveram teores de compostos fenólicos totais, respectivamente, iguais a 102 a 362 mg EAG/100g do fruto e de 362 a 460 mg EAG/100g do fruto. No presente trabalho os resultados para o teor de compostos fenólicos totais variaram de 204,16 a 848,82 mg EAG/100g para a torta de açaí, diferença esta que pode ser causada por diversos fatores, principalmente pelo tipo de amostra analisada e planejamento adotado.

Enquanto neste estudo a condição ótima observada foi a extração a 70°C com etanol:água 50%(v/v), Pompeu; Silva; Rogez (2009) encontraram que para o teor de compostos fenólicos totais a condição ideal de extração para polpa de açaí foi de 60-65°C, com uma concentração de etanol variando de 50-70%. Os mesmos autores também encontraram condições diferentes dependendo da resposta analisada, e as condições ótimas de extração mantiveram-se, de maneira geral, nos extremos das condições do planejamento.

Para grão de trigo, as condições ótimas de extração de compostos fenólicos foram tempo de extração variando de 60 a 64 minutos, concentração de etanol variando de 49 a 54%, e temperatura na faixa de 61 a 64°C (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005), sendo estas duas últimas condições relativamente próximas ao encontrado neste trabalho para as tortas de açaí e inajá. Outros autores encontraram que, para extratos de engaços de uva, o maior valor de atividade antioxidante, determinado pelos ensaios de capacidade antioxidante em equivalentes ao Trolox (TEAC) e ORAC, foi observado quando a concentração de etanol variou entre 40,4 e 55,4%, à temperatura de 83,6°C (KARACABEY; MAZZA, 2010), condições relativamente próximas às deste estudo.

A literatura possui muitos trabalhos que empregam superfícies de resposta para a otimização da extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes. De maneira geral, três ou mais variáveis são analisadas, dentre as quais se destacam tempo de extração, proporção massa:solvente, tipo e concentração do solvente extrator. Tais fatores podem variar e influenciar significativamente o teor de compostos fenólicos totais e as respostas da atividade antioxidante, dificultando a comparação com outros tipos de planejamento e de variáveis exploratórias consideradas para análise, o que implica em maiores ou menores respostas de atividade antioxidante. Para resíduos de frutas, a literatura indica que a utilização de superfícies de resposta para otimização da extração de fenólicos ainda é bastante escassa (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009), vertente à qual este trabalho pode contribuir de maneira significativa.

Embora o planejamento adotado neste trabalho tenha mostrado bom ajuste, e as condições de extração indiquem o caminho para o ponto ótimo dentro do intervalo analisado, tal ponto ainda não foi encontrado, pois os gráficos sugerem a necessidade de ampliação das faixas de estudo das variáveis exploratórias para que a superfície tenha sua conformação tridimensional característica com a indicação do ponto ótimo.

Sendo assim, para que seja possível encontrar o ponto ótimo exato que apresenta os maiores valores de atividade antioxidante, deve-se incluir no planejamento intervalos maiores de temperatura (acima dos 75°C) e valores menores de concentração de etanol na solução extratora (abaixo dos 50%, v/v). No que tange às diferentes matrizes, pode ser necessário estudar o comportamento da variável resposta para o mesmo planejamento empregado, uma vez que aspectos como a composição da amostra e os procedimentos de preparo de amostra e extração das substâncias de interesse podem influenciar a resposta de maneira significativa.

3.4. Conclusão

De acordo com as condições estabelecidas no planejamento experimental desenvolvido foi possível concluir que a condição ótima de extração que retorna as maiores atividades antioxidantes para ambos os extratos de tortas, dentro do intervalo considerado neste experimento, foi a que combinou uma temperatura de 70°C e uma concentração de etanol de 50% (v/v). Assim, é possível concluir que nas condições estabelecidas foi possível encontrar uma faixa em que a combinação das variáveis exploratórias possibilitaram a maior extração das substâncias de interesse, de modo que este estudo contribui para estudos de otimização das condições de extração de compostos antioxidantes provenientes de tortas da extração de óleo de açaí e de inajá.

Referências

ADJÉ, F.; LOZANO, Y.F.; LOZANO, P.; ADIMA, A.; CHEMAT, F.; GAYDOU, E.M. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.439-444, 2010.

AL-DUAIS, M; MULLER, L; BOHM, V; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European of Food Research Technology**, v. 228, p. 813-821. 2009.

BOEING, J.S.; BARIZÃO, E.O.; SILVA, B.C.; MONTANHER, P.F.; ALMEIDA, V.C.; VISENTAINER, J.V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v.8, n.48, p.2-9, 2014.

CALOMENI, A. V. ; SOUZA, V. B. ; TULINI, F. L. ; THOMAZINI, M.; OSTROSCHI, L.C.; ALENCAR, S. M. ; MASSARIOLI, A. P. ; BALIEIRO, J. C. C. ; CARVALHO, R. A. ; TRINDADE, C. S. F. Characterization of antioxidant and antimicrobial properties of spray-dried extracts from peanut skins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 105, p. 215-223, 2017.

D'ALESSANDRO, L.G.; KRIAA, K.; NIKOV, I.; DIMITROV, K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. **Separation and Purification Technology**, v. 93, p.42-47, 2012.

DE CAMARGO, A.C.; REGITANO-DARCE, M. A. B. ; RASERA, G. B. ; do PRADO SILVA, L. ; ALVARENGA, V. O. ; SANT'ANA, A. S. ; SHAHIDI, F. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chemistry**, v. 237, p. 538-544, 2017.

DENT, M.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; PENIC, M.; BRNCIC; BOSILJKOV, T.; LEVAJ, B. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. **Food Technology and Biotechnology**, v.51, n.1, p. 84–91, 2013.

DO, Q.D.; ANGKAWIJAYA, A.E.; NGUYEN, P.L.T.; HUYNH, L.H.; SOETAREDJO, F.E.; ISMADJI , S.; JU, Y.H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 296-302, 2014.

D'ALESSANDRO, L.G.; KRIAA, K.; NIKOV, I.; DIMITROV, K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. **Separation and Purification Technology**, v.93, n.1, p.42–47, 2012.

GRIFFIN, S.P., BHAGOOLI, R. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 302, p. 201–211, 2004.

HIDALGO, G.I.; ALMAJANO, M.P. Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. Antioxidants (Basel), v. 6, n.1, 2017.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.6, p.1378-1384, 2008.

HUANG D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, .JA.; DEEMER, E.K: Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 1815–1821, 2002.

KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.119, n.1, p.343-348, 2010.

LAZARINI, J. G. ; FRANCHIN, M. ; INFANTE, J. ; PASCHOAL, J. A. R. ; FREIRES, I. A.; ALENCAR, S.M. ; ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 249-257, 2016.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surfasse methodology. **Food Chemistry**, v. 93, n.1, p.47-56, 2005.

MAJEED, M.; HUSSAIN, A.I.; CHATHA, S.A.S.; KHOSA, M.K.K.; KAMAL, G.M.; KAMAL, M.A.; ZHANG, X.; LIU, M. Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from *Origanum vulgare* leaves using response surface methodology. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p.389-396, 2016.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.12, p. 3444-3452, 2002.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.S.; ROSALEN, O.L. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species, **Food Chemistry**, v.181, p. 160 -169, 2015.

MUSHTAQ, M.; SULTANA, B.; BHATTI, H.N.; ASGHAR, M. RSM based optimized enzyme-assisted extraction of antioxidant phenolics from underutilized watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) rind. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.8, p. 5048–5056, 2015.

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R.M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 306-312, 2016.

PACKER, V.G.; MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; SELANI, M.M.; VILLANUEVA, N.D.M.; ALENCAR, S.M.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J. Chemical characterization, antioxidant activity and application of beetroot and guava residue extracts on the preservation of cooked chicken meat. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.52, n.11, p.7409-7416, 2015.

PERICIN, D.; KRIMER, V.; TRIVIC, S.; RADULOVIC, L. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. **Food Chemistry**, v. 113, n.2., p.450-456, 2009.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.6076-6082, 2009.

RODRIGUES S., FERNANDES F.A.N., DE BRITO E.S., SOUSA A.D., NARAIN N. Ultrasound extraction ofphenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. **Industrial Crops and Products,** v.69, p. 400–407, 2015.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, pp. 152-178, 1999.

STOICA, R.; SENIN, R.M.; RODICA-MARIANA, I. Ethanol Concentration Effect on the Extraction of Phenolic Compounds from *Ribes nigrum* Assessed by Spectrophotometric and HPLC-DAD Methods. **Revista de Chimie**, v.64, p. 620–624, 2013.

TORMA, P.C.M.R.; BRASIL, A.V.S.; CARVALHO, A.V.; JABLONSKI, A.; RABELO, T.K.; MOREIRA, J.C.F.; GELAIN, D.P.; FLÔRES, S.H.; AUGUSTI, P.R.; RIOS, A.O. Hydroethanolic extracts from different genotypes of açaí (Euterpe oleracea) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Food Chemistry**, v.222, p. 94-104, 2017.

WANG, Y.; ZHAO, L.; WANG, D.; HUO, Y.; JI, B. Anthocyanin-rich extracts from blackberry, wild blueberry, strawberry, and chokeberry: Antioxidant activity and inhibitory effect on oleic acid-induced hepatic steatosis *in vitro*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.2494-2503, 2016.

ZŁOTEK, U.; MIKULSKA, S.; NAGAJEK, M.; ŚWIECA, M. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n.5, p.628-633, 2016.

4. CARACTERIZAÇÃO FENÓLICA POR LC-ESI-QTOF-MS E POTENCIAL BIOATIVO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE AÇAÍ E INAJÁ

Resumo

As atividades agroindustriais geram diariamente grandes quantidades de resíduos sólidos, geralmente descartados no meio ambiente. Porém, alguns destes materiais, como o resíduo da extração mecânica de óleo de frutos oleaginosos (denominado torta), podem constituir fontes naturais de substâncias bioativas com potencial de aplicação industrial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fenólica pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS) e as atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana de extratos de tortas de açaí-do-Pará (*Euterpe oleracea* Mart.) e inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude). A determinação da composição fenólica por LC-ESI-QTOF-MS indicou a presença de 20 compostos no extrato de torta de açaí, dentre os quais estão apigenina-7-O-glucosídeo IV, escoparina, cianidina e malvidina; e de 6 no extrato de resíduo de inajá, dentre os quais estão epicatequina e dímeros de procianidinas B1/B2. Quanto à atividade antioxidante, o extrato da torta de açaí destacou-se para a capacidade de desativar os radicais peroxila (975,7 ± 69,0 µmol Trolox/g) e superóxido (EC_{50} de 37,1 ± 1,9 mg/mL), enquanto que o extrato de torta de inajá apresentou a maior capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau (640,4 ± 61,0 mg EAG/g). Ambos os extratos não apresentaram diferença significativa para a atividade sequestrante do radical ácido hipocloroso, sendo o EC_{50} igual a 0,34 ± 0,0 mg/mL para as duas amostras. Os extratos ainda apresentaram elevada capacidade de redução do íon Fe^{+3} (986,0± 22,0 e 414,6 ± 55,1 µmolSF/g para torta de açaí e de inajá, respectivamente) e alta capacidade sequestrante do radical ABTS (820,0 ± 36,4 e 515,4 ± 16,2 µmol Trolox/g para as tortas de açaí e de inajá, respectivamente). A análise de citotoxicidade indicou que o extrato da torta de açaí não reduziu a viabilidade celular para a cultura de macrófagos RAW 264.7 nas concentrações de 1, 10, 100 µg/mL, enquanto que para o de inajá não foi verificada redução da viabilidade nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL ($p>0,05$). Os extratos de tortas de açaí e de inajá foram capazes de inibir em aproximadamente 100% e 40%, respectivamente, a ativação do fator de transcrição NF-κB responsável pela iniciação do processo inflamatório. Os ensaios de atividade antimicrobiana mostraram que o extrato de torta de açaí agiu contra 3 cepas de bactérias patogênicas, porém, deve ser considerado um agente de atividade inibitória fraca devido às altas concentrações da CIM encontradas para os patógenos avaliados. Portanto, os extratos dos resíduos apresentam atividades antioxidante e anti-inflamatória, propriedades estas relacionadas aos compostos fenólicos identificados.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais; LC-ESI-QTOF-MS; Compostos fenólicos; Atividade anti-inflamatória

Abstract

The agroindustrial activities generate large amounts of solid residues daily, which are generally discarded in the environment. However, some of these materials, such as the residue

of the mechanical pressing of oleaginous fruits (denominated "cake"), can consist in natural sources of bioactive compounds with potential for industrial application. The aim of this work was to evaluate the phenolic composition by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS), as well as the antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory and antimicrobial activities, of *açaí-do-Pará* (*Euterpe oleracea* Mart.) and *inajá* (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude) cakes extracts. The determination of the phenolic composition by LC-ESI-QTOF-MS indicated the presence of 20 compounds in the *açaí* cake extract, among which are apigenin-7-O-glucoside, scoparin, cianidin and malvidin; and 6 in the *inajá* cake extract, among which are epicatechin and procyanidin B1/B2 dimers. Regarding antioxidant activity, the *açaí* cake extract stood out for deactivating the free radicals peroxil (975,7 ± 69,0 µmol Trolox/g) and superoxide (EC_{50} de 37,1 ± 1,9 mg/mL), while *inajá* cake extract showed the highest capacity on reducing the Folin-Ciocalteau reagent (640,4 ± 61,0 mg EAG/g). The extracts also showed high reducing capacity of the ion Fe^{+3} (986,0± 22,0 e 414,6 ± 55,1 µmolSF/g for *açaí* and *inajá* cakes, respectively) and high ABTS radical scavenging (820,0 ± 36,4 e 515,4 ± 16,2 µmol Trolox/g for açaí and inajá cakes, respectively). The cytotoxicity analysis showed the *açaí* cake extract didn't decrease the viability of RAW 264.7 macrophages culture in the concentrations 1, 10 and 100 µg/mL, while for *inajá* cake extract it wasn't observed the viability decrease in the concentrations 1, 10, 100 and 1000 µg/mL ($p>0,05$). The *açaí* and *inajá* cakes extracts were able to inhibit in approximately 100% and 40%, respectively, the activation of the transcription factor NF-κB, which is responsible for the initiation of the inflammatory process. The antimicrobial assays showed that the açaí cake extract acted against 3 pathogenic bacterial strains, nevertheless, it must be considered an agent with weak inhibitory activity due to the high concentrations of MIC found for the evaluated pathogens. Therefore, the residues extracts present high antioxidant and anti-inflammatory activities, properties related to the phenolic compounds identified.

Keywords: Agroindustrial residues; LC-ESI-QTOF-MS; Phenolic compounds; Anti-inflammatory activity

4.1. Introdução

O setor agroindustrial brasileiro é fortemente influenciado pelas atividades do agronegócio, o qual impacta o PIB do país e é de grande importância para a balança comercial nacional (BRASIL, 2016; CEPEA, 2017). A atividade agroindustrial traz como resultados tanto uma grande variedade de produtos quanto expressivas quantidades de resíduos sólidos gerados ao longo da cadeia de processamento. Um exemplo desta atividade é a extração de óleos vegetais de frutos nativos, como o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e o inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), destinados tanto à indústria alimentícia quanto às indústrias farmacêutica e cosmética.

A extração mecânica (por prensagem) do óleo destes frutos gera um subproduto denominado "torta", geralmente descartado no meio ambiente como resíduo ou destinado à alimentação animal. O acúmulo destes resíduos no ambiente sem tratamento adequado pode provocar diversos problemas, como a contaminação do solo e de lençóis freáticos. Com o

objetivo de adotar práticas mais sustentáveis, foi aprovada e implementada no ano de 2010 a Política Nacional de Resíduos Sólidos por meio da Lei nº 12.305, que reúne diretrizes e práticas relativas à gestão e gerenciamento dos resíduos sólidos (BRASIL, 2010). Com isso, há um aumento da necessidade de estratégias multidisciplinares para o estudo do reaproveitamento destes materiais.

A comunidade científica tem desenvolvido vários estudos para a determinação da composição química e atividades biológicas de resíduos agroindustriais, bem como sua aplicação tecnológica. Estes materiais ainda são subvalorizados, todavia, podem constituir fontes naturais de compostos bioativos, como os polifenóis, compostos com atividades antioxidante, anti-inflamatória e atimicrobiana (MATTHÄUS, 2002; PERICIN et al., 2009; DENNY et al., 2013; DENNY et al., 2014; PACKER et al., 2015; MELO et al., 2015; DE CAMARGO et al., 2017).

Os compostos fenólicos são conhecidos como agentes antioxidantes importantes, pois são capazes de desativar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) responsáveis por provocar efeitos deletérios no organismo, quando a condição de estresse oxidativo está estabelecida (HALLIWELL et al., 1995; GOMES et al., 2007; ALVES et al., 2010). Além desta atividade, possuem propriedades anti-inflamatórias expressivas e capacidade de inibição do crescimento de cepas patogênicas, sendo importantes no controle de microrganismos resistentes a antibióticos sintéticos, como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MELHORANÇA FILHO; PEREIRA, 2012; BONOMO et al., 2014; FAZELI et al., 2017; KAČÁNIOVÁ et al., 2017; DIAS-SOUZA et al., 2018).

A polpa do açaí-do-Pará (*Euterpe oleracea* Mart.) tem sido frequentemente analisada com o objetivo de se determinar os compostos bioativos, principalmente as substâncias antioxidantes, o que confere ao fruto a possibilidade de ser utilizado como um alimento e/ou ingrediente funcional (HOGAN et al., 2010; SCHRECKINGER et al., 2010; RUFINO et al., 2011; WONG et al., 2013; BONOMO et al., 2014). Contudo, não existem estudos acerca da caracterização e determinação das atividades biológicas da torta deste fruto.

O inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude), no entanto, ainda é um fruto pouco explorado em relação ao seu potencial bioativo, não sendo encontrado na literatura estudos sobre a determinação das atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica, bem como sobre a caracterização fenólica deste resíduo.

A substituição de ingredientes sintéticos por naturais é uma preocupação recorrente das indústrias, principalmente da alimentícia e da cosmética, que buscam compostos de

origem natural seguros e com múltiplas propriedades. Considerando esta necessidade, o objetivo deste trabalho foi avaliar extratos das tortas de açaí e de inajá quanto às suas atividades biológicas (antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana), além da caracterização fenólica pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS), visando uma futura aplicação industrial.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Preparo das amostras e obtenção dos extratos de resíduos de frutos amazônicos

As amostras de tortas dos frutos açaí e inajá (Figura 8), originários do estado do Pará, foram fornecidas pela empresa Citróleo, localizada no município de Torrinha, interior do estado de São Paulo. Foram recebidos 5 kg de cada torta, sendo a torta de açaí proveniente de Santa Luzia do Pará (Comunidade do Fuzil, 1°41´11,24´´S 46°51´16,20´´O) e a de inajá proveniente de Santo Antonio do Tauá (Comunidade do Remédio, 1°05´27,86´´S 48°11´18,26´´O), ambas localizadas na região nordeste do Pará. A coleta da torta de açaí foi realizada pela empresa no início do mês de novembro de 2016, e recebida neste mesmo período. Já a torta de inajá foi obtida em coleta realizada no mês de abril de 2017 e recebida no mesmo mês. Os materiais recebidos foram homogeneizados, porcionados, acondicionados em sacos plásticos bem fechados, e armazenados em freezer à temperatura de - 18°C até o momento das análise

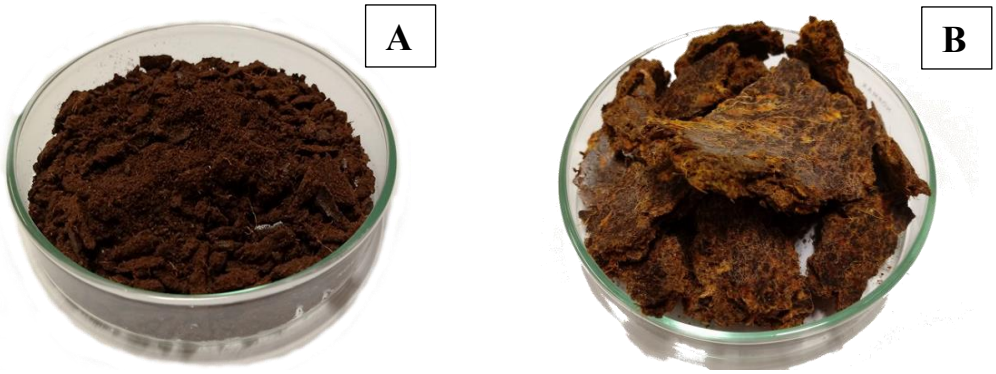


Figura 8. Aspectos originais das amostras de tortas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (A) e de inajá (*Maximiliana maripa* Aubl. Drude) (B).

Os extratos dos resíduos de açaí e de inajá foram obtidos de acordo com as condições determinadas pelo planejamento experimental, e descritas no Capítulo 3. Assim, os extratos obtidos na condição ótima foram evaporados à baixa pressão, congelados a -18°C, liofilizados e armazenados à temperatura de -18°C. Para a determinação da composição fenólica por LC-ESI-QTOF-MS, os açúcares dos extratos liofilizados foram removidos em coluna de sílica (*clean up*), sendo a fração purificada novamente liofilizada, e posteriormente redissolvida em metanol:água 50% (v/v).

Para a determinação das atividades biológicas, os extratos liofilizados foram redissolvidos nos solventes apropriados para cada análise para as seguintes avaliações: capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau, atividade antioxidante *in vitro* por diferentes métodos, citotoxicidade, atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana.

4.2.2. Caracterização da composição fenólica das tortas por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI–QTOF-MS)

4.2.2.1. Purificação das amostras

Previamente à injeção das amostras no espectrômetro de massas de alta resolução (LC-ESI–QTOF-MS), os extratos foram purificados pela técnica de extração em fase sólida (SPE-LC18) para a remoção de açúcares e interferentes. Esta técnica tem sido muito utilizada porque é rápida, eficiente, e requer pequenos volumes de amostras e solventes. Cartuchos de SPE LC-18 (2 g, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) foram condicionados com metanol e água ácida (pH 2,0). Em seguida, 500 mg dos extratos liofilizados de cada resíduo foram redissolvidos em água ácida até o volume original (5 mL), e então centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos. Na sequência foi feita a filtração e o pH ajustado para 2,0 com uma solução de HCl (5 M). Posteriormente, alíquotas de 5 mL foram adicionados aos respectivos cartuchos já condicionados com metanol e água ácida (pH 2,0). Após a eluição da amostra pela coluna procedeu-se a lavagem com água ácida suficiente para remover os açúcares e outros interferentes. Os compostos de interesse foram eluídos com metanol, e coletados em tubos Falcon de 15 mL. Em seguida foi feita a evaporação sob fluxo de nitrogênio gasoso, obtendo assim extratos sem açúcares e interferentes, os quais foram acondicionados em vials e armazenados a -22 ºC até o momento das análises.

4.2.2.2. Injeção e análise da composição química

A análise por cromatografia líquida foi realizada utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Co, Tokyo) equipado com uma bomba quaternária LC-30AD, detector de arranjo de fotodiodos (PDA) SPD-20 A e um auto-injetor SIL-30AC. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Phenomenex Luna C18 (4.6 x 250 mm x 5 µm). Foram injetados 20µL na concentração de 8,9 mg/mL para ambos os extratos.

O espectrômetro de massas de alta resolução MAXIS 3G – Bruker Daltonics (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) estava equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI), operando em modo negativo para ambos os extratos de tortas de açaí e inajá, com uma resolução de 30.000 a 400 m/z. As condições de operação foram: Nebulizador: 2 Bar, Dry gas: 8 L/min, Temp: 200 °C, HV: 4500 V.

O extrato de torta de açaí foi avaliado nos modos de operação positivo e negativo, enquanto o extrato de torta de inajá foi avaliado somente no modo negativo. Para os modos de operação negativo e positivo, a fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de água e ácido fórmico 0,25% e (B) acetonitrila 80%, ácido fórmico 0,25% e água 19,75%, sendo a vazão da fase móvel de 1,0 mL/min. O gradiente foi iniciado em 10% do solvente B, passando a 20% de B em 10 minutos, 30% de B aos 20 minutos, 50% de B aos 30 minutos, 50% de B aos 32 minutos, 90% de B aos 38 minutos, retomando novamente a 10% de B aos 45 minutos e finalizando a corrida aos 55 minutos.

Antes das análises foi realizada uma calibração externa para verificar a precisão das massas acuradas. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* MAXIS 3G – Bruker Daltonics 4.3. A identificação dos compostos foi feita por comparação das massas exatas, espectro de massas MS/MS e fórmulas moleculares encontradas com as disponíveis na literatura.

4.2.3. Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau

A capacidade de redução do reagente de Folin-Ciocalteau foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Singleton; Orthofer; Lamuela (1999), com algumas modificações. Para a análise, 20µL do padrão ou da amostra e 100µL da solução de Folin-Ciocalteau em água (10%, v/v) foram pipetados em microplaca de 96 poços. Após 5 minutos, foram adicionados 75 µL da solução de carbonato de sódio em água (7,5%, v/v). Após 40 minutos de reação ao abrigo da luz, a placa foi inserida em uma leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) e, a leitura da

absorbância realizada em comprimento de onda 740 nm. As leituras foram feitas em triplicata e os resultados expressos em miligramas de equivalentes ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), calculado por meio do ajuste de uma curva de calibração (20 a 120 µg/mL).

4.2.4. Atividade sequestrante do radical DPPH$^{\bullet}$

A determinação da atividade sequestrante do radical DPPH foi feita de acordo com o método descrito por Al-Duais; Muller; Jetschke (2009), com algumas modificações. A curva de calibração foi obtida a partir de diferentes concentrações do padrão Trolox (2,5 mM), variando de 20 a 140 µM. Alíquotas de 66 µL do padrão ou da amostra foram misturadas a 134 µL da solução de DPPH (150 µM em etanol) e pipetadas em cada poço da microplaca de 96 poços. O controle foi composto por 66 µL de etanol em substituição à amostra, e o branco analítico, apenas por 200 µL de etanol. Após 45 minutos de incubação a 25°C e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida a 517 nm em leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA). A atividade antioxidante foi expressa em micromoles de equivalentes ao Trolox por grama de extrato (µmol Trolox/g).

4.2.5. Atividade sequestrante do radical ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS foi utilizado o método descrito por Al-Duais; Muller; Jetschke (2009), com modificações.

Para a análise foram pipetados 20 µL da amostra ou padrão e 220 µL da solução do radical ABTS ajustada à absorbância de 0,7 ± 0,02 com tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,4). A solução do radical foi obtida a partir da mistura das soluções ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (140 mM), ambas em água destilada, que reagiu por 16h ao abrigo da luz. O branco da análise foi composto por 240 µL do tampão fosfato e a curva padrão foi obtida a partir de diferentes concentrações de soluções de Trolox, variando de 12,5 a 200 µM. Após 6 minutos de reação ao abrigo da luz, as absorbâncias das amostras foram lidas em leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) em comprimento de onda de 734 nm. Os resultados foram expressos em micromoles equivalentes ao Trolox por grama de extrato (µmol Trolox/g).

4.2.6. Atividade antioxidante pelo método de redução do Fe^{+3} (FRAP)

O método FRAP consiste na capacidade do antioxidante em reduzir Fe^{+3} a Fe^{+2}, e foi realizado conforme o descrito por Griffin; Bhagooli (2004), com algumas adaptações. Alíquotas de 20µL do padrão ou amostra, 30 µL de água destilada e 200 µL do reagente FRAP foram pipetadas em cada poço da microplaca. O reagente FRAP foi obtido pela mistura de 10 partes de solução tampão acetato de potássio (0,3M, pH 3,6), 1 parte de solução cloreto férrico (20mM em água) e 1 parte de solução TPTZ (10 mM em solução de HCl 40 mM). O branco da análise foi composto por 50 µL de água e 200 µL do reagente FRAP.

A microplaca foi agitada e incubada a 37°C durante 8 minutos. Após o tempo de incubação, a absorbância foi medida em comprimento de onda 595 nm em leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA). A curva de calibração foi construída a partir de diferentes concentrações de soluções de sulfato ferroso, que variaram de 100 a 700 µM. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de sulfato ferroso por grama de extrato (µmol SF/g).

4.2.7. Sequestro do radical peroxila ($ROO^{\bullet}$)

Para análise do sequestro do radical peroxil foi monitorado o efeito dos extratos no decaimento da fluorescência, provocado pela oxidação da fluoresceína induzida pelo radical peroxil, conforme descrito por Melo et al. (2015). O radical foi formado pela termodecomposição do AAPH (2,2`-azobis amidinopropano). Alíquotas de 30µL do padrão, do controle ou da amostra, 60 µL da solução de fluoresceína 508,25 nM (obtida a partir da solução estoque a 4,066 mM) e 110 µL da solução de AAPH 76 mM foram pipetadas sequencialmente em cada poço da microplaca. As soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4, também utilizado na análise como branco.

A microplaca foi agitada e incubada a 37°C, e as leituras de fluorescência foram feitas a cada minuto durante 2 horas em uma leitora de microplacas Spectra Max M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA), nos comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão igual a 528 nm. Para a construção da curva de calibração, utilizou-se soluções de Trolox em concentrações que variaram de 12,5 a 400 µM. A curva foi obtida por meio das equações 2 e 3. Os valores de AUCnet (eixo x) foram plotados com os valores das concentrações (eixo y) do Trolox, e os resultados foram expressos em micromoles de equivalentes ao Trolox por grama de extrato (µmol Trolox/g).

$$AUC = 1 + (f1 + f2 + f3 + \ldots + fi/f0) \quad (2)$$

$$AUCnet = AUCamostra\ ou\ padrão - AUCcontrole \ (3)$$

4.2.8. Sequestro do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical superóxido foi feita de acordo com Melo et al. (2015). O radical superóxido foi gerado pelo sistema NADH/PMS, sendo a capacidade de sequestro determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos das tortas de açaí e de inajá na redução do NBT para diformazana. O volume final do meio reacional em cada poço da microplaca foi de 300 µL, sendo composto por 100 µL de diferentes concentrações do padrão e dos extratos de tortas, 50 µL de NBT, 50 µL de PMS e 100 µL de NADH, todos dissolvidos em tampão fosfato de potássio (19 mM, pH 7,4). A microplaca foi então agitada e as absorbâncias lida a 560 nm em uma leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) a cada minuto, durante um tempo total de 5 minutos. Os resultados foram expressos em EC_{50}, que equivale à concentração (mg/mL) do extrato necessária para inibir em 50% a atividade dos radicais livres no meio reacional.

4.2.9. Sequestro do radical ácido hipocloroso (HOCl)

A determinação da atividade antioxidante pelo sequestro ácido hipocloroso foi conduzida de acordo com Melo et al. (2015). A capacidade de sequestro do HOCl foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos sobre a oxidação da dihidrorodamina 123 (DHR) para rodamina 123, induzida pelo ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso foi preparado a partir do ajuste do pH de uma solução de NaOCl 1% (pH 6,2), com adição de uma solução de H_2SO_4 10% (v/v). A concentração do HOCl foi determinada no comprimento de onda de 235 nm, empregando o coeficiente de absorção molar de 100 M/cm e diluição em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,4). O volume final do meio reacional continha 100µL tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), 100 µL dos extratos em diferentes concentrações, 50 µL de solução DHR (7,5 µM) e 50 µL de HOCl (30 µM), compondo um volume final de 300 µL. O ensaio foi conduzido a 37 °C em uma leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA), sendo a fluorescência medida no comprimento de emissão de 528±20 nm e de excitação de 485±20 nm. Os resultados foram expressos em EC_{50}.

4.2.10. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

4.2.10.1. Cultura celular

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 transfectados com o gene NF-κBpLUC foram cultivados em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL) e glutamina (2 mM) à temperatura de 37°C em atmosfera contendo 95% de O_2 e 5 % de CO_2.

4.2.10.2. Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT

Os extratos das tortas foram analisados quanto ao método do MTT descrito por Franchin et al. (2016). Macrófagos foram semeados (2 x 10^5 células/mL) em placas de 96 poços e incubados *overnight* em estufa a 37 °C em atmosfera contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2. No dia seguinte, as células foram tratadas com os extratos das tortas nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL e novamente incubadas por 24 horas, em condições previamente descritas. Transcorrido este tempo, o sobrenadante foi removido e o meio RPMI com MTT (1 mg/mL) foi adicionado nos poços, sendo as microplacas incubadas por 3 horas. O sobrenadante, então, foi removido e as células ressuspensas em 200 µL de etanol absoluto. A absorbância foi mensurada a 540 nm utilizando uma leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA).

4.2.10.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

Macrófagos foram semeados (3× 10^5 células/poço) por 24 h em placas de 24 poços e incubadas overnight (37 °C sob atmosfera contendo 5% de CO_2). As células receberam extratos das tortas de açaí e inajá nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL por 30 minutos, antes da estimulação com LPS (lipopolissacarídeo) (100 ng/mL) por 4 h. O grupo controle negativo recebeu solução salina 0,9 % (veículo). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado, e as células lisadas com tampão de lise (TNT) e alíquotas da suspensão (10 µL) foram adicionadas a 25 µL do reagente para o ensaio da luciferase contendo luciferina (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A quantificação da luminescência foi realizada usando leitora de microplaca para luminescência SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) (FRANCHIN et al., 2016).

4.2.11. Atividade antimicrobiana

As cepas de microrganismos utilizadas neste estudo foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. aureus MRSA* (ATCC 33591), *Escherichia coli* EHEC (ATCC 43895), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (MYA 2876), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (ATCC 2019), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) *S. sanguinis* (SK36) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 27736). Os meios de cultura utilizados para as bactérias e para as leveduras foram, respectivamente, o Müeller-Hinton e o RPMI.

As cepas congeladas a - 20ºC foram repicadas em meio Brain Heart Infusion (BHI), permanecendo em temperatura de 37ºC por 24 horas. A partir dessas culturas os inóculos foram preparados em solução salina (0,9 %) estéril nas concentrações de 2,5 a 5 x 106 UFC/mL. Em seguida, foram diluídos em meio RPMI/ Müeller-Hinton respectivamente para a obtenção de uma concentração final de aproximadamente 104 UFC/mL para leveduras e 105 UFC/mL para bactérias.

Alíquotas de 100 µL dos inóculos foram distribuídas nas fileiras de 2 a 12 de placas de 96 poços, onde estão as substâncias em diferentes concentrações, obtidas por diluição seriada, que serão avaliadas quanto à atividade antimicrobiana. Desta forma, a concentração do inóculo passou a ser 10^3 UFC/mL para as leveduras e 10^4 UFC/mL para as bactérias. Os controles positivos utilizados foram os antimicrobianos para cada microrganismo, e o controle negativo, o mesmo veículo utilizado no preparo dos extratos. Estes ensaios foram realizados segundo os documentos do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), M27 A3 para leveduras e M7 A6 para as bactérias, com algumas adaptações (CLINICAL AND LABORATORY..., 2006).

4.2.11.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios para a determinação da CIM foram realizados por meio do método de microdiluição, preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLINICAL AND LABORATORY..., 2006), e conduzidos em microplacas de 96 poços. Os extratos foram preparados na concentração de 30 mg/mL, pesando-se 30 mg de cada extrato liofilizado das tortas e adicionando-se 1 mL de solução salina esterilizada (0,9%) ou de dimetilsulfóxido (DMSO) (50%, v/v). Após a total dissolução, alíquotas de 67 µL foram pipetadas nos poços da segunda fileira da microplaca e, em seguida, 100 µL foram pipetados

sequencialmente de cada poço da fileira anterior de modo a diluir os extratos líquidos nos caldos de cultura para a obtenção de concentrações finais na faixa de 9,76 a 5000 µg/mL, em um volume final de 200µL. A inoculação foi então realizada com as suspensões dos microrganismos, sendo as microplacas incubadas por 24 horas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO_2.

Após o tempo de incubação observou-se a ocorrência de crescimento ou não dos microrganismos inoculados. Adicionou-se 50 µL do corante resazurina (0,01%) em todos os poços, e em seguida a microplaca foi coberta com papel alumínio e incubada a 37°C por 2h. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano, observado a olho nu e/ou pela mudança de cor do corante resazurina. A mudança de cor de azul escuro (original da resazurina) para rosa indica que as células dos microrganismos ainda mostram-se viáveis. A predominância da cor original indica morte do microrganismo inoculado no meio. O controle positivo utilizado foi o digluconato de clorexidina (0,12%) e o controle negativo o mesmo veículo utilizado no preparo dos extratos.

4.2.11.2. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Com base nos resultados obtidos nos experimentos de CIM, a CBM foi determinada tanto pela observação da mudança de cor do corante resazurina (0,01%), após aplicação no meio inoculado contendo os extratos e posterior incubação por 2h a 37°C, quanto pela inoculação, com perfuração, de 10 µL das suspensões provenientes dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI ágar). Este inóculo foi cultivado em meio por 48h, sendo a CBM a menor concentração em que não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado, o que indica 99,9% de morte bacteriana (CLINICAL AND LABORATORY..., 2006).

4.2.11.3. Concentração Fungicida Mínima (CFM)

O ensaio para determinar a Concentração Fungicida Mínima foi realizado com a finalidade analisar a ação da substância no crescimento celular, ou seja, determinar a menor concentração dos extratos das tortas com ação fungicida. Para isso, após a leitura do resultado da CIM, 10 µL de cada concentração do inóculo da microplaca de 96 poços foi transferida com perfuração em placa contendo ágar BHI, as quais foram incubadas a 37ºC e analisadas visualmente quanto ao crescimento de colônias após 24 horas de incubação (CLINICAL AND LABORATORY..., 2006).

4.2.12. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em média ± desvio padrão. Para a comparação das médias foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o *software* SAS 9.0 (SAS Institute Inc. Cay, NC, USA).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Avaliação do perfil de compostos fenólicos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI–QTOF-MS)

Os extratos de tortas de açaí e de inajá foram analisados por LC-ESI-QTOF-MS visando caracterizar de maneira abrangente o perfil de compostos fenólicos de cada amostra.

O extrato de torta de açaí foi analisado pela técnica hifenada de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução no modo negativo para a identificação de compostos fenólicos e, no modo postivo, para a identificação de antocianinas. Já o extrato de torta de inajá foi analisado somente no modo negativo. Os compostos foram identificados comparando suas massas exatas, espectros MS/MS e fórmula molecular com a literatura (DEGENHARDT; KNAPP; WINTERHALTER, 2000; AABY; EKEBERG; SKREDE, 2007; BYSTROM et al 2008; ROSSO et al 2008; GORDON et al 2012; MULABAGAL; CALDERON, 2012; YE et al 2012; BENAYAD; GÓMEZ-CORDOVÉS; ES-SAFI, 2014; BRITO et al 2014; MA et al., 2014; KOLNIAK-OSTEK; ABU-REIDAH et al., 2015; BOCHI;GODOY;GIUSTI, 2015; IBRAHIM et al., 2015; BRUNSCHWIG et al 2016; CHEN et al 2016; MELO et al., 2016; BERGANTIN et al 2017; SASOT et al. 2017; YASIR et al., 2016). No extrato de torta de inajá foram identificados 6 compostos, e no de torta de açaí, 20 compostos, os quais são apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9.Compostos identificados em extrato de torta de inajá por LC-ESI-QTOF-MS.

Compostos	tr (min)	Fórmula molecular	Massa exata	$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)	Fragmentos (ms/ms)
Procianidina dímera (tipo B1 ou B2)	10,1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,1416	577,1338	-0,692	289,0711; 407,0749
Epicatequina	12,1	$C_{15}H_{14}O_6$	290,0788	289,0710	-0,689	205,0476; 206,5832
Procianidina dímera (tipo B1 ou B2)	13,4	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,1428	577,1350	1,384	289,0711; 407,0749
(+)-Catequina / (-)-Epicatequina	14,7	$C_{15}H_{14}O_6$	290,0793	289,0715	1,034	203,0736; 245,5072; 161,0624
Tanino não identificado	16,2	-	577,1338	576,1260	-	289,0647; 425,0562; 451,5950
trans-Piceatannol	21,9	$C_{14}H_{12}O_4$	244,0740	243,0662	0,000	159,0440; 199,0708

Legenda: tr=tempo de retenção em minutos

Tabela 10. Compostos identificados em extrato de torta de açaí por LC-ESI-QTOF-MS.

Compostos	tr (min)	Fórmula molecular	Massa exata	$[M-H]^-$ m/z	$[M-H]^+$ m/z	Erro (ppm)	Fragmentos (ms/ms)
Cianidina3-rutinosídeo	11,4	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594,1574	-	595,1652	-1,346	287,0556
Ácido clorogênico	12,3	$C_{16}H_{18}O_9$	354,0968	353,089	-	5,083	191,0562; 179.034
6,8-di-C-hexosil apigenina	14,5	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594,1581	593,1503	-	0,168	383,0763; 353,0662
Ácido-4-cafeoil chiquímico	15,3	$C_{16}H_{16}O_8$	336,085	335,0772	-	2,975	179,0347; 135,0464
Di-hidroquercetina-3-glucosídeo	15,9	$C_{21}H_{22}O_{12}$	466,1103	465,1025	-	-1,502	465,1025; 285,0409
6-C-glicosil luteolina(isoorientina)	16,9	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1002	447,0924	-	-1,785	447,0924; 357,0610; 327,0505
Cianidina3-glucosídeo	16,9	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1018	-	449,1096	-13,836	287,0548
6-C-glicosil luteolina(isoorientina)	17,4	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1007	447,0929	-	-0,669	447,0929; 357,0617; 327,0499
6-C-glicosil luteolina(isoorientina)	17,6	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,0988	447,091	-	-4,910	447,0910; 357,0588; 327,0488
Eriodictiol-7-O-glucosídeo	18,4	$C_{21}H_{22}O_{11}$	450,1157	449,1079	-	-0,666	269,0441; 259,0616
6-C-glicosil apigenina (isovitexina)	19,0	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432,1053	431,0975	-	-1,620	431,0975; 311,0557; 283,0602
Rutina	19,0	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610,1513	609,1435	-	-2,786	255,0312;271,0206, 301,0328
Delfinidina-3-rutinosídeo	19,0	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610,1528	-	611,1606	-0,656	303,0505
Pelargonidina 3-*O*-glucosídeo	19,3	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432,1058	-	433,1136	1,389	271,0607
Peonidina 3-*O*-rutinosídeo	19,7	$C_{28}H_{32}O_{15}$	608,1736	-	609,1814	-0,987	301,0725
Escoparina	20,1	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462,1160	461,1082	-	0,000	341,0667; 371,0776; 298,0483
Escoparina	20,4	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462,1155	461,1077	-	0,000	341,0667; 371,0895; 298,0483
Peonidina 3-*O*-glucosídeo	23,1	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462,1165	-	463,1243	0,649	301,0722
Malvidina-3-glucosídeo	23,1	$C_{23}H_{24}O_{12}$	492,1268	-	493,1346	-0,813	331,0822
Ramnocitrina	33,2	$C_{16}H_{12}O_6$	300,0633	299,0555	-	1,000	299; 284; 256; 227

Legenda: tr=tempo de retenção em minutos

Os compostos identificados em ambos os extratos (Tabelas 9 e 10) pertecem, em sua maioria, à classe dos flavonoides. Os cromatogramas obtidos para cada extrato são apresentados na seção Apêndice. Múltiplas atividades biológicas benéficas ao organismo podem ser associadas aos flavonoides e seu consumo, como, por exemplo, atividade anti-inflamatória (D'MELLO et al., 2011), menor risco de câncer (GROSSO et al., 2016), menor prevalência de diabetes tipo 2 (WEDICK et al., 2012) e efeitos vasodilatadores, entre outros (PEREZ et al., 2014).

Dentre os flavonoides identificados estão as procianidinas, encontradas no extrato de torta de inajá (m/z 577,1338 no tempo de retenção de 10,1 minutos, e m/z 577,1350 aos 13,4 minutos) (Tabela 9). Os espectros MS/MS resultantes do íon m/z 577 apresentaram fragmentos ms/ms 289,0711 e 407,0749, o que representa diferentes formas isoméricas de variação no posicionamento das unidades flavan-3-ol monoméricas após a fissão de retro-Diels-Alder (SASOT et al., 2017). O fragmento MS/MS a 289 pode ter sido formado pela quebra da ligação C-C entre duas unidades de catequina. A epicatequina (m/z 289,0710) também foi identificada no extrato de torta de inajá, sendo os fragmentos encontrados MS/MS 205 e 206 (BYSTROM et al., 2008) (Tabela 9). Este composto é caracterizado por apresentar o íon molecular [M-H- = 289]-, no entanto, também pode consistir na catequina, seu estereoisômero (MELO et al., 2016).

No extrato de torta de inajá ainda foi identificado, pela primeira vez, o trans-Piceatannol, composto pertencente à classe dos estilbenos cuja estrutura é derivada do resveratrol e do tipo (C6–C2–C6), com uma cadeia carbônica composta por dois anéis aromáticos associados a uma ligação de etileno. Os estilbenos são encontrados principalmente em vinhos e uvas tintas, sendo o piceatanol um monômero derivado do resveratrol e que apresenta boa atividade de inibição da formação de fibrilas de β-amiloide (TEMSAMANI et al., 2016), além de proteção ao DNA contra danos causados por radicais hidroxila (OVESNÁ et al., 2006).

Outra classe de compostos fenólicos importantes são os ácidos fenólicos, os quais são metabólitos secundários de plantas e podem ser divididos em três grupos: o grupo dos ácidos benzóicos (cuja estrutura é do tipo C6-C1), ácidos cinâmicos (cuja estrutura é do tipo C6-C3 e são amplamente encontrados nas matrizes vegetais) e as cumarinas (derivadas do ácido cinâmico) (HERAS et al., 2016).

Os ácidos fenólicos estão relacionados às atividades biológicas de produtos naturais, como a antioxidante e a anti-inflamatória. Um exemplo é o ácido cafeico, o ácido hidroxicinâmico mais abundante na dieta humana, e amplamente estudado quanto à sua

atividade antioxidante. Este ácido é relatado como um dos compostos que possui atividade contra células cancerosas do cólon (HASHIM et al., 2008), além de atuar contra a peroxidação de membranas lipídicas e prevenindo danos celulares causados por íons de ferro e outros metais de transição, sendo um antioxidante mais eficiente em meios hidrofóbicos (GENARO-MATTOS et al., 2015).

Na torta de açaí foram encontrados compostos pertencentes à classe dos ácidos fenólicos e subclasse dos ácidos cinâmicos: ácido clorogênico (um éster do ácido caféico e do ácido quínico), e ácido 4-cafeoil chiquímico, cujos íons precursores [M-H]- m/z são respectivamente 353,0890 e 335,0722 (Tabela 10).

Dentre os flavonoides identificados no extrato de torta de açaí (Tabela 10) estão as flavonas apigenina e luteolina, cujos derivados apresentaram os seguintes íons precursores: $[M-H]^-$ m/z 593,1503 (6,8-di-C-hexosil apigenina), $[M-H]^-$ m/z 431,0975 para isovitexina (6-C-glicosil apigenina), $[M-H]^-$ m/z 673,1050 (6,8-di-C-hexosil apigenina sulfato) e $[M-H]^-$ m/z 447,0924, 447,0929 e 447,091 para a isoorietina (6-C-glicosyl luteolina). De acordo com a literatura, a apigenina possui atividade anti-inflamatória pela inibição da ativação do fator nuclear NF-κB e redução do influxo de neutrófilos no lavado pulmonar em modelo *in vivo* (SHUKLA et al., 2015; CARDENAS et al., 2016), além de desempenhar papel protetor contra a peroxidação lipídica sobre o sistema antioxidante em ratos com quadro de carcinogênese hepatocelular (SINGH et al., 2004).

A luteolina, que está presente sob a forma glicosilada no extrato de torta de açaí, também é relatada como um composto bioativo com múltiplos efeitos *in vivo*, dentre os quais atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticancerígena (KIM; LEE; YUN, 2014; FRANCISCO et al, 2014; MENG et al., 2016). A literatura ainda mostra que a formação do complexo de luteolina com manganês (II) aumenta as atividades biológicas deste flavonoide em comparação ao composto atuando isoladamente (DONG et al., 2017).

A rutina ($[M-H]^-$ m/z 609,1435) encontrada no extrato de torta de açaí (Tabela 10) é associada com diversas atividades biológicas, dentre as quais a antimicrobiana, antifúngica e antioxidante. A literatura ainda aponta que este flavonoide possui outros efeitos benéficos à saúde, pois auxilia no tratamento de doenças crônicas como diabetes, hipertensão e câncer (SHARMA et al., 2013).

Um composto pertencente à subclasse das flavanonas foi identificado na torta de açaí, o eriodictiol glicosídeo ($[M-H]^-$ m/z m/z 449,1079), caracterizado pela perda de 162 unidades de uma unidade de açúcar, já identificado em suco de açaí (DIAS et al., 2013).

Antocianinas também foram identificadas pelo espectrômetro de massas operando em modo positivo (Tabela 10). Estes compostos compõem os pigmentos de frutos e flores, variando de azul a vermelho, e possuem propriedades bioativas importantes, dentre as quais destaca-se a alta atividade antioxidante (FRAIGE; PEREIRA-FILHO; CARRILHO, 2014). As antocianinas identificadas no extrato de torta de açaí foram : cianidina- 3-rutinosídeo ($[M-H]^+$ m/z 595,1652), malvidina-3-glucosídeo ($[M-H]^+$ m/z 493,1346), pelargonidina 3-O-glucosídeo ($[M-H]^+$ m/z 433,1136), delfinidina 3-rutinosídeo ($[M-H]^+$ m/z 611,1606), peonidina 3-O-rutinosídeo ($[M-H]^+$ m/z 609,1814) e peonidina 3-O-glucosídeo ($[M-H]^+$ m/z 463,1243), cujo fragmento MS/MS 301 corresponde à peonidina aglicona, como resultado da perda de uma hexose $[M-H]^+$ m/z 162) (GARZÓN et al., 2017).

Estas antocianinas estão presentes no açaí e também foram encontradas por outros autores (GORDON et al., 2012; GARZÓN et al., 2017; PETRUK et al., 2017), sendo responsáveis por promover efeitos benéficos ao organismo como proteção celular contra o estresse oxidativo (HUANG et al. 2016), peroxidação lipídica, efeitos anti-hipertensivos (PETRUK et al., 2017) e até mesmo favorecer a morte de células de leucemia por indução ao estresse oxidativo (FENG et al., 2007). A cianidina-3-glucosídeo, pelargonidina, pelargonidina-3-glucosídeo, pelargonidina-3-rutinosideo, foram isoladas de extratos de morango e apresentaram atividades antiproliferativas em células cervicais, de cólon, da próstata e da cavidade oral (ZHANG et al., 2008). A cianidina-3-glucosídeo e a delfinidina-3-glucosídeo também foram encontradas em casca de uva, e quando isoladas, promoveram a inibição do crescimento de células tumorais de mama (FERNANDES et al., 2010).

4.3.2. Redução do reagente Folin-Ciocalteau e atividade antioxidante *in vitro*

O poder redutor total determinado pelo método de Folin-Ciocalteau, bem como a atividade antioxidante dos extratos das tortas de açaí e de inajá, obtidos na condição ideal de temperatura e concentração de solvente do extrator (Capítulo 3), estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Atividades antioxidantes dos extratos dos resíduos das tortas de açaí e inajá pelos métodos de Folin-Ciocalteau, FRAP, DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$ e capacidade de desativação do ânion superóxido (O_2^-), do radical peroxila (ROO$^{\bullet}$) e do ácido hiplocoroso (HOCl).

	Atividade antioxidante						
Resíduos	CR (mg EAG/g extrato liofilizado)	FRAP (µmolSF/g extrato liofilizado)	DPPH$^{\bullet}$ (µmol Trolox/g extrato liofilizado)	ABTS$^{\bullet+}$ (µmol Trolox /g extrato liofilizado)	ROO$^{\bullet}$ (µmol Trolox /g extrato liofilizado)	O_2^- superóxido (EC_{50} em mg extrato liofilizado /mL)	HOCl (EC_{50} em mg extrato liofilizado /mL)
Torta de açaí	88,4 ± 0,4 ^{B}	986,0± 22,0 ^{A}	40,1 ± 1,1 ^{A}	820,0 ± 36,4 ^{A}	975,7 ± 69,0 ^{A}	37,1± 1,9 ^{A}	0,34 ± 0,0 ^{A}
Torta de inajá	640,4 ± 61,0 ^{A}	414,6 ± 55,1 ^{B}	5,0 ± 0,3 ^{B}	515,4 ± 16,2 ^{B}	768,4 ± 34,2 ^{B}	58,6 ± 8,4 ^{B}	0,34 ± 0,0 ^{A}

Os resultados são expressos em médias das triplicatas seguidas do desvio padrão. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa entre os resultados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As atividades antioxidantes dos extratos das tortas de açaí e de inajá foram determinadas por diferentes métodos, os quais possuem princípios e fundamentos distintos. De acordo com a literatura, o emprego de um número limitado de métodos pode subestimar ou superestimar a atividade antioxidante (BARROS et al., 2017). Assim, foram empregados métodos que se baseiam na redução de íons (FRAP), sequestro de radicais sintéticos (ABTS e DPPH), poder redutor total (compostos fenólicos totais) e desativação de ERO (radicais peroxila, superóxido e ácido hipocloroso).

A atividade antioxidante de extratos da polpa de *Euterpe precatoria* Mart. (EP), conhecida como “açaí-do-Amazonas” ou “açaí solteiro”, e de *E. oleracea* Mart. (EO), o açaí-do-Pará, foram avaliadas por Kang et al. (2012) por diferentes métodos analíticos. A atividade para o sequestro do radical peroxila para o EP foi superior ao encontrado para EO, com atividades de 1.828,4 e 1.014,0 µmol Trolox/g de extrato seco, respectivamente (KANG et al., 2012). No presente trabalho, a atividade antioxidante obtida para a torta de *E. oleracea*, determinada pelo mesmo método, foi igual a 975,7 ± 69,0 µmol Trolox /g de extrato seco, o que mostra que esse material ainda é uma boa fonte de compostos antioxidantes para a desativação do radical peroxila (Tabela 11). Por se tratar de um resíduo, pode-se sugerir que a atividade antioxidante do extrato da torta de açaí para desativar o radical peroxila foi tão boa quanto à encontrada para o extrato da polpa. Porém, deve-se considerar que a otimização do método de extração utilizado nesse estudo pode ter favorecido a extração dos compostos fenólicos, uma vez que a mistura de solventes com diferentes polaridades é mais eficiente na

extração dessas substâncias de interesse (ZŁOTEK et al., 2016). É também possível que uma maior razão amostra:solvente da torta poderia apresentar atividade antioxidante próxima ou mesmo superior ao resultado da polpa de *E. oleracea* (1.828,4 µmol Trolox/g) encontrado Kang et al. (2012) e, portanto, esta deve ser uma variável a ser considerada em estudos futuros.

A capacidade antioxidante da polpa de açaí, determinada pelos métodos de sequestro do radical sintético DPPH e poder redutor pelo método de Folin-Ciocalteau, também foi avaliada por Kang et al. (2012). Para o DPPH, os resultados obtidos foram significativamente superiores ao encontrado no presente estudo para a torta: 133,4 ± 11,2 µmol Trolox/g extrato de EO liofilizado, ao passo que neste trabalho o valor encontrado para a torta de açaí foi de 40,1 ± 1,1 µmol Trolox /g extrato liofilizado (Tabela 11), cerca de três vezes menor ao encontrado pelos autores. Com relação à capacidade de reduçaão do reagente Folin-Ciocalteau, os resultados deste trabalho, 88,4 mg EAG/g extrato, mostraram-se superiores ao encontrado por Kang et al. (2012) para extrato de polpa de *E. oleracea* (31,2 mg EAG/g).

A composição fenólica e a atividade de extratos metanólicos de açaí colombiano foram investigadas por Garzón et al. (2017), os quais determinaram o teor de compostos fenólicos totais pela redução do reagente Folin-Ciocalteau e a atividade antioxidante pelo sequestro dos radicais DPPH e ABTS. O resultado encontrado para o teor de fenólicos totais foi de 47,86 ± 18,80 mg EAG/g de massa seca. Ainda encontraram para o sequestro dos radicais ABTS e DPPH os valores de 0,24 ± 0,11 e 210,49 ± 30,71 µmol Trolox /g, respectivamente. Os extratos de tortas de açaí e inajá apresentaram atividade antioxidante sobre o radical ABTS superior (820,0 e 515,5 µmol Trolox/g, respectivamente) ao encontrado por Garzón et al. (2017) para a polpa de açaí. No entanto, a atividade sequestrante do radical DPPH foi expressivamente menor para ambos os extratos (40,1 e 5,0 µmol Trolox/g para o açaí e inajá, respectivamente). As diferenças observadas com a literatura são devidas a diversos fatores, dentre os quais se destaca a própria natureza dos diferentes materiais analisados e comparados (polpa e resíduo de açaí). Além disso, os métodos de extração utilizados, bem como a concentração dos extratos, podem influenciar significativamente as respostas.

A polpa liofilizada de açaí também foi analisada por Batista et al. (2016) quanto ao teor de compostos fenólicos totais e antocianinas, com e sem o uso da técnica de extração supercrítica. Sem o uso da extração supercrítica, a polpa liofilizada apresentou o valor 55,20 ± 0,01 mg EAG/ g e um teor de antocianinas de 0,97 ± 0,00/g de amostra. Com a aplicação da extração supercrítica os autores obtiveram concentrações que variaram de 54,57 a 75,65 mg

EAG/g de amostra para compostos fenólicos, e de 0,96 a 1,38 mg/g para antocianinas. A extração supercrítica favoreceu o aumento da concentração dos compostos bioativos, indicando que a utilização deste método pode ser interessante para aplicação industrial (BATISTA et al., 2016), uma vez que não gera resíduos tóxicos e também é capaz de extrair compostos bioativos termossensíveis (CAVALCANTI et al., 2012). Apesar disto, a extração com a otimização de um sistema de solvente não tóxico, como o desenvolvido no presente trabalho, mostrou um resultado para a extração de compostos fenólicos para a torta (88,4 mg EAG/g) (Tabela 11) ainda superior ao resultado encontrado por Garzón et al. (2017) para a polpa de açaí (47,86 mg EAG/g).

Comparando-se a atividade antioxidante dos extratos das tortas com extratos de resíduos de uvas viníferas, observa-se que os resíduos de açaí e inajá apresentam atividade antioxidante frente o radical ABTS superior ao encontrado no bagaço de três cultivares de uvas. A atividade sequestrante do radical ABTS para o extrato de açaí foi igual a 820,0 ± 36,4 µmol Trolox/g, superior ao determinado para os extratos de bagaço das cultivares *Chenin Blanc* (218 ± 17 µmol Trolox/g), *Petit Verdot* (626 ± 9 µmol Trolox/g) e *Syrah* (653 µmol Trolox/g), sendo que o extrato da torta de inajá apresentou atividade superior à do bagaço de *Chenin Blanc* (MELO et al., 2015).

Os extratos das tortas de açaí e de inajá apresentaram ainda concentrações de compostos fenólicos e atividade antioxidante superiores aos encontrados por Infante et al. (2016), para frutas da Mata Atlântica. O teor de compostos fenólicos presente no extrato da torta de açaí foi superior ao determinado para os extratos de folhas, sementes e polpa dos frutos de *Eugenia involucrata* e *E. brasiliensis*; para extratos de sementes de *E. myrcianthes*, e extrato da polpa de *E. leitonii*. Já o extrato da torta de inajá apresentou teor de fenólicos superior a todos os extratos analisados por aqueles autores. O extrato hidroetanólico das folhas de *E. involucrata* apresentou a maior atividade antioxidante para o sequestro do radical peroxila, igual a 1.393,3 ± 69,6 µmol Trolox/g. Com exceção das folhas desta espécie, a atividade antioxidante para o sequestro desse radical pelos extratos das tortas de açaí e inajá foram superiores a todas as outras espécies de frutas analisadas por Infante et al. (2016).

A produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela cadeia respiratória ocorre de forma espontânea, porém, a concentração deste radical pode aumentar quando na ocorrência de processos inflamatórios. Esse radical livre pode ainda ser transformado espontaneamente em peróxido de hidrogênio por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), o qual pode interagir com metais de transição e gerar o radical hidroxila. Esta nova espécie altamente

oxidante é iniciadora da peroxidação lipídica, e sua interação com os ácidos graxos gera o radical peroxila (GOMES et al., 2007). Os extratos das tortas de açaí e inajá apresentaram uma menor capacidade de desativação do ânion superóxido (EC_{50} 37,1 e 58,6 mg/mL, respectivamente) do que quando comparados com os extratos de folhas, sementes e polpa de frutas avaliados por Infante et al. (2016). Porém, a torta de açaí apresentou quase o dobro da atividade da de inajá (Tabela 11).

O ácido hipocloroso (HOCl) é uma outra ERO altamente oxidante e produzida no interior dos neutrófilos em resposta ao ataque de microrganismos. Essa espécie reativa é produzida a partir da oxidação de íons cloreto pelo peróxido de hidrogênio, por meio da enzima mieloperoxidase. Embora possua efeitos benéficos no sistema de defesa, o ácido hipocloroso pode ser altamente nocivo quando em excesso no organismo vivo (HALLIWELL et al., 1995; ALVES et al., 2010). No caso do HOCl, as tortas de açaí e inajá apresentaram a mesma atividade (EC_{50} 0,34 mg/mL), atividade esta menor do que as encontradas por Infante et al. (2016) para frutas nativas.

De maneira geral a atividade antioxidante dos extratos das tortas de açaí e inajá foi superior a encontrada por Rufino et al. (2011) para extratos aquosos-orgânicos de açaí "BRS Pará", bem como para extratos aquosos e metanólicos (60%, v/v) de resíduos dos frutos nativos araçá-boi, achachairu e bacaba (BARROS et al., 2017).

Dentre os compostos fenólicos presentes no açaí e responsáveis pela desativação do $ROO^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$ e HOCl estão as antocianinas, lignanas e os flavonoides. Os flavonoides atuam tanto como agentes sequestrantes ou quelantes de ERO, quanto como inibidores de enzimas capazes de catalisar as reações de formação de tais espécies reativas (PIETTA, 2000; KANG et al., 2011). Portanto, estes resultados demonstram que mesmo sendo resíduos, estes materiais são ricos em substâncias bioativas capazes de desativar ERO de alta reatividade e importância biológica, e assim, podem ser considerados boas fontes naturais de compostos bioativos passíveis de utilização pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

4.3.3. Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória *in vitro*

Pelo fato da literatura ser escassa com relação à determinação da citotoxicidade de resíduos de frutas, se faz necessário a realização de ensaios de citotoxicidade nestas amostras, uma vez que os mesmos podem constituir agentes com ação funcional e/ou de ingredientes com potencial aplicação industrial. Assim, os resultados da citotoxicidade dos extratos de tortas de açaí e inajá avaliadas pelo método do MTT estão apresentados na figura 9.

De acordo com os resultados obtidos, o extrato de torta de açaí não promoveu redução da viabilidade celular nas concentrações de 1, 10, 100 µg/mL ($p>0,05$), mantendo a viabilidade das células em 100% tal como o observado para o controle (V) (Figura 9). Em relação ao extrato de torta de inajá não foi verificada redução da viabilidade para a cultura de macrófagos nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL ($p>0,05$). Nas concentrações de 1 e 10 µg/mL para o extrato de torta de açaí e de 100 µg/mL para a torta de inajá, foi constatada aumento da proliferação das células ($p<0,05$), efeito possivelmente causado devido a fatores nutricionais provenientes das tortas. Na maior concentração testada para o extrato de torta de açaí (1000 µg/mL) houve redução da viabilidade celular ($p<0,05$), o que indica que o extrato nesta concentração pode ser tóxico para as células (Figura 9).

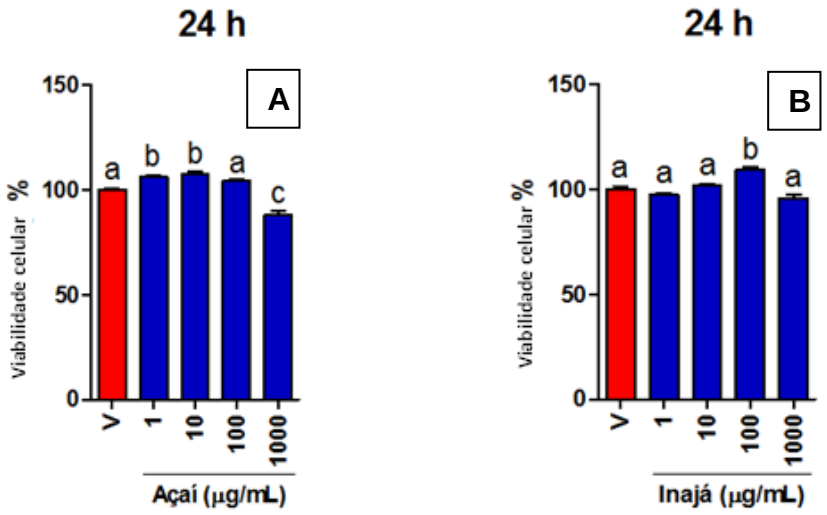


Figura 9. Atividade citotóxica de extratos de tortas de açaí (A) e de inajá (B). V = grupo controle de células que receberam somente o meio de cultura (100% de viabilidade). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

Avaliando a toxicidade de açaí, Sprenger et al. (2016) constataram que os extratos hidroetanólicos de folhas, polpa e sementes não apresentaram efeito tóxico nas concentrações de LC_{50} iguais a 2.033, 1.053 e 1.310 µg/mL, respectivamente. Em outro estudo, a citotoxicidade do extrato de polpa de açaí produzido com metanol 80 % (v/v) foi avaliada contra células de carcinoma hepático (DIAS-SOUZA et al. 2018). Os autores verificaram que os extratos na concentração de 15,62 µg/mL, diminuíram a proliferação destas células cancerosas e também foram considerados seguros por não promoverem alteração significativa na viabilidade das células utilizadas como controle, o que corrobora com o resultado obtido no presente estudo.

A inflamação é um processo que ocorre em resposta à invasão de microrganismos e outros antígenos em tecidos do organismo ou na corrente sanguínea, e também à condições de morte celular, lesão de tecidos, e à doenças como o câncer. No presente estudo, foi avaliada a atividade dos extratos de tortas de açaí e inajá sobre a modulação do fator de transcrição NF-κB em macrófagos estimulados com LPS (Figura 10). Neste estudo foram utilizadas as concentrações comuns a ambos os extratos que não apresentaram atividade citotóxica, ou seja, 1, 10 e 100 µg/mL.

De acordo com os resultados, o extrato da torta de açaí apresentou atividade inibitória nas concentrações de 10 e 100 µg/mL ($p<0,05$), sendo que na maior concentração a inibição da ativação de NF-κB foi o suficiente a reduzir a níveis basais. Em relação ao extrato da torta de inajá, foi verificada ação inibitória apenas na concentração de 100 µg/mL ($p<0,05$). Esses resultados indicam que ambos os extratos são ativos na inibição do NF-κ-B sem reduzir a viabilidade celular, todavia, a atividade do extrato da torta de açaí foi mais eficiente do que o extrato de torta de inajá na mesma concentração.

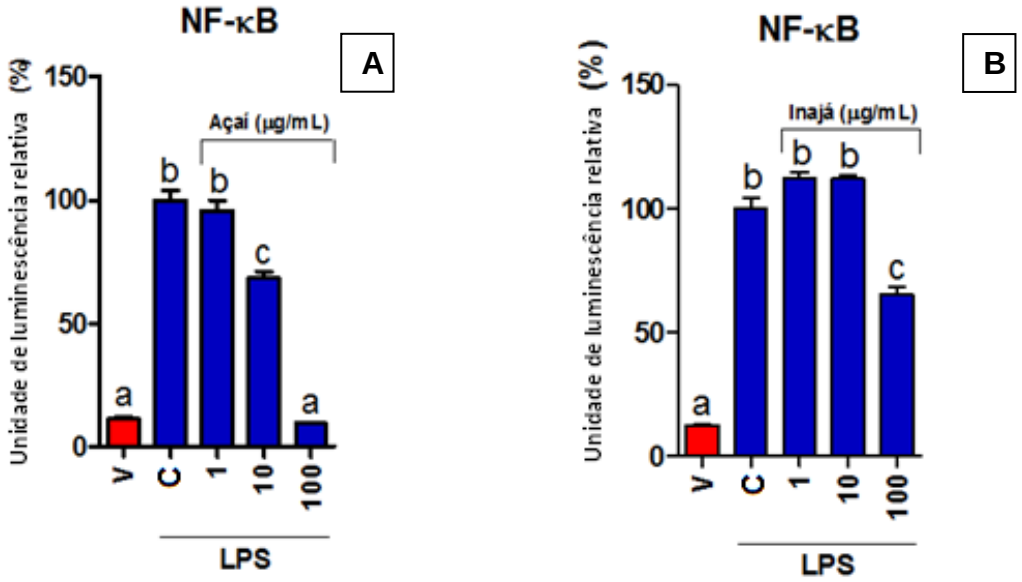


Figura 10. Gráficos das atividades anti-inflamatórias dos extratos de tortas de açaí (A) e de inajá (B): V = veículo), LPS = lipopolissacarídeo e açaí e inajá nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p< 0,05$).

Extratos das espécies de açaí *Euterpe oleracea* e *E. precatoria*, obtidos com acetato de etila foram analisados quanto à atividade anti-inflamatória por Kang et al. (2012). Foi observado que o extrato de *E. precatoria* inibiu a ativação de NF-κB por estímulo com LPS em 23% na concentração de 20 µg/mL, enquanto que os extratos de *E. oleracea* não apresentaram qualquer atividade. Apesar disto, no presente estudo foi encontrada forte

atividade de inibição do fator NF-κB da torta de açaí da espécie *E. oleracea* (Figura 10), indicando assim que pode haver a concentração de compostos bioativos na torta, ou que ainda o solvente utilizado pelos autores na etapa de extração não tenha sido eficiente para extrair os compostos bioativos, justificando-se a atividade nula dos extratos de *E. oleracea* analisados (KANG et al., 2012).

Estudos indicam que extratos da polpa do açaí e do suco desta fruta possuem atividade anti-inflamatória devido à capacidade de inibição da ativação do NF-κB. Assim, a atividade desta fruta poderia estar relacionada com a iniciação e progressão de doenças como a aterosclerose. A velutina, flavonoide presente no açaí, é um dos compostos que pode atuar como um potente anti-inflamatório capaz de inibir a produção de citocinas inflamatórias e de inibir a ativação de NF-κB (KANG et al., 2011; XIE et al., 2012; BRITO et al., 2017).

Por fim, conforme os resultados obtidos no presente estudo, pode-se constatar que as tortas destas frutas nativas são importantes fontes de substâncias anti-inflamatórias que, futuramente, podem ser utilizados pela indústria para a formulação de medicamentos, cosméticos e/ou alimentos funcionais.

4.3.4. Atividade antimicrobiana

Os resultados da análise de atividade antimicrobiana dos extratos de açaí e inajá são apresentados na Tabela 12.

O extrato de torta de açaí apresentou atividade antimicrobiana contra três importantes cepas de microrganismos (*S. aureus*, *S. aureus MRSA* e *P. aeruginosa*). As bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus MRSA* foram inibidas e mortas quando foi utilizado o extrato na concentração 2.500 µg/mL, enquanto *S. aureus* foi inibida e morta na concentração de 1.250 µg/mL. Nestas concentrações os extratos apresentam, aproximadamente, 0,22 mg e 0,11 mg de equivalentes ao ácido gálico, respectivamente, de acordo com a determinação da capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteau. Já o extrato de inajá não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 12).

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos liofilizados de tortas de açaí e inajá. Microrganismos Gram-positivos são identificados por (+), e Gram-negativos, por (-).

Microrganismos	Gram	Torta de açaí CIM/CBM (µg/mL)	Torta de inajá CIM/CBM (µg/mL)	Controles
S. aureus	+	1.250/1.250	_	Vancomicina (0,5 µg/mL)
S. aureus MRSA	+	2.500/2.500	_	Vancomicina (0,5 µg/mL)
S. salivarius	+	_	_	Clorexidina (0,01%)
S. sanguinis	+	_	_	Clorexidina (0,05%)
P. aeruginosa	-	2.500/2.500	_	Ciprofloxacina (1,25 µg/mL)
E. coli	-	_	_	Ceftriaxone (1,25 µg/mL)
K. pneumoniae	-	_	_	Ciprofloxacina (1,25 µg/mL)
A. baumanii	-	_	_	Ciprofloxacina (2 µg/mL)
C. albicans	+	_	_	Anfotericina B (0,5 µg/mL)
C. tropicalis	+	_	_	Anfotericina B (0,5 µg/mL)
C. glabrata	+	_	_	Anfotericina B (0,5 µg/mL)
C. parapsilosis	+	_	_	Anfotericina B (0,5 µg/mL)

Legenda: Campos identificados por (_) indicam crescimento microbiano, ou seja, os valores de CIM e CBM são maiores do que 5000 µg/mL.

O extrato de açaí apresentou atividade antimicrobiana contra três importantes cepas de microrganismos (*S. aureus*, *S. aureus MRSA* e *P. aeruginosa*). As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus MRSA* foram inibidas e mortas quando foi utilizado o extrato na concentração 2.500 µg/mL, enquanto *S. aureus* foi inibida e morta na concentração de 1.250 µg/mL. Já o extrato de inajá não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações testadas.

A bactéria Gram-positiva *S. aureus* é uma das maiores causadoras de toxi-infecções transmitidas por alimentos, podendo ser encontrada na pele, nos cabelos, nas unhas e nas mucosas nasais. Logo, sua presença em alimentos indica contaminação devida à falta de higiene durante as práticas de manipulação, e sua ingestão pode provocar quadros severos de infecção alimentar com sintomas variando desde vômitos até severas gastroenterites (LIAN et al., 2012). Tal bactéria ainda pode ser encontrada em ambiente hospitalar, principalmente em lesões sépticas e em materiais utilizados para transportar pacientes (SOLBERG, 2000). Este microrganismo pode ainda provocar quadros de infecção, quando as células são ingeridas, e/ou de intoxicações quando sua toxina é ingerida, gerando diversos sintomas que incluem náuseas, vômitos intensos, diarreia, e que podem levar à hospitalização de indivíduos debilitados ou em grupos de risco (crianças e idosos) (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; LIAN et al., 2012).

O controle da bactéria *S. aureus* é basicamente realizado com antibióticos, no entanto, a resistência adquirida por este microrganismo tem dificultado sua prevenção e controle. Além disso, a utilização de conservantes sintéticos em alimentos vem sendo indesejada pelos consumidores, o que implica na busca pela indústria de substitutos naturais, por exemplo.

O suco de açaí neutralizado (pH 7,0) demonstrou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, inibindo o microrganismo em 3,6 % após um período de 24h de incubação, e em 4,5% após 48h, mostrando uma ação inibitória deste microrganismo superior aos sucos de morango e de framboesa. A presença da atividade antimicrobiana após a neutralização da acidez (pH 7,0) indica que esse fator não foi responsável pela inibição bacteriana, mas sim os compostos fenólicos (LIAN et al., 2012).

Outro estudo avaliou a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de folhas, frutos e sementes de açaí e de cupuaçu. As concentrações dos extratos utilizadas para a determinação da CIM pelo teste de difusão em ágar variaram de 10 a 2.560 µg/mL, sendo os discos adicionados de 10 µL de cada extrato. Os extratos de polpa apresentaram-se como potentes agentes inibidores frente a *Clostridium perfringens* e *S. aureus*, cujos valores de CIM foram correspondentes a 320 e 80 µg/mL. O extrato das sementes de açaí também demonstrou atividade inibitória relevante sobre *S. aureus* em concentração inferior a 500 µg/mL (CIM igual a 320 µg/mL), o que ratifica o potencial antimicrobiano da espécie avaliada (DUARTE et al., 2007; SPRENGER et al., 2016).

O óleo extraído da semente do açaí também foi avaliado quanto à capacidade de inibição de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O teste de difusão em ágar indicou que a amostra não apresentou atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa*, pois não houve a formação dos halos de inibição. Porém, o óleo de açaí foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* após 24h da impregnação dos discos, efeito inibitório que se estendeu até 48h (MELHORANÇA FILHO; PEREIRA, 2012).

Extratos metanólicos da polpa de açaí avaliados quanto à CIM e CBM em concentrações que variaram de 7,8 a 1000 µg/mL apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações de 7,81 e 62,5 µg/mL, as quais foram capazes de, respectivamente, inibir e matar *S. aureus* (DIAS-SOUZA et al., 2018). A literatura ainda aponta que o extrato aquoso de açaí na concentração de 100 mg/mL possui atividade antimicrobiana sobre *E. coli* OP50, e que essa propriedade não eleva o estresse oxidativo, o estresse osmótico, e também não influencia na capacidade do extrato em modular o estresse oxidativo (BONOMO et al., 2014).

Compostos fenólicos como os falvan-3-ols, flavonois, taninos e antocianinas são relatados como compostos com atividade antimicrobiana superior a outros polifenóis. Os mecanismos de ação antimicrobiana são diversos, incluindo alteração da permeabilidade da membrana, inibição da formação de biofilmes, neutralização de toxinas bacterianas, complexação de macro ou micronutrientes, além do sinergismo com antibióticos e/ou outras substâncias antimicrobianas de origem natural (DAGLIA et al., 2012; NILE;PARK, 2014). Esses compostos foram encontrados no extrato de torta de açaí, e ratificam as propriedades biológicas dos polifenóis provenientes do resíduo analisado.

A propriedade antimicrobiana dos compostos fenólicos pode ser influenciada pela solubilidade, afinidade pelas membranas celulares dos microrganismos e pelos grupos funcionais presentes. O grupo hidroxila, por exemplo, pode interagir com componentes da membrana dos microrganismos e promover o seu rompimento com consequente extravasamento do conteúdo intracelular (XUE; DAVIDSON; ZHONG, 2013). A posição deste grupo na molécula também pode influenciar a atividade antimicrobiana, além de afetar o gradiente de cargas presente nas membranas e a diferença de potencial da membrana, causando uma diminuição do pool de adenosina trifosfato intracelular até provocar a morte celular (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso e acidificado de açaí foi avaliada sobre os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P.aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* (GONÇALVES; SANTOS; SREBERNICH, 2011). No entanto, os resultados foram negativos para esta atividade e contrários ao apresentado pelo presente trabalho, no qual o extrato da torta de açaí apresentou atividade contra patógenos importantes e resistentes a diversos antibióticos. Enquanto os autores utilizaram a polpa dos frutos de açaí para a elaboração de um extrato aquoso acidificado, este trabalho obteve um extrato hidroetanólico de torta de açaí rico em compostos antioxidantes a partir de uma condição ideal de extração previamente determinada. Além disso, os extratos utilizados para as análises de atividade antimicrobiana estavam liofilizados, o que pode contribuir para a concentração e conservação das substâncias fenólicas ativas.

A atividade antimicrobiana de produtos naturais pode ser classificada em fraca, moderada ou alta, dependendo do valor de CIM obtido. Embora o extrato de açaí tenha sido capaz de inibir o crescimento dos referidos microrganismos, as concentrações de CIM são consideravelmente altas, o que o classifica como um agente de atividade inibitória moderada para *S. aureus* (CIM entre 600 e 1.500 µg/mL) e atividade inibitória fraca para *S. aureus MRSA* e *P. aeruginosa*, pois o valor de CIM foi superior a 1600 µg/mL. De acordo como

Duarte et al. (2007), para ser considerado um potente agente antimicrobiano é desejável que o extrato bruto apresente CIM até 500 µg/mL.

Estudos sobre a atividade antimicrobiana do açaí e do inajá são escassos, sendo que para o inajá e seus resíduos não foram encontrados nenhum relato na literatura. A atividade antimicrobiana de extratos de produtos vegetais pode sofrer influência de diversos fatores, dentre os quais estão a sazonalidade, a época e o local de cultivo das espécies vegetais, época de colheita, além de fatores envolvidos na análise laboratorial, como a polaridade e a concentração do solvente utilizado no extrato, proporção massa/solvente adotada, combinação a outros agentes antimicrobianos (de origem natural ou não), entre outros. Os compostos fenólicos presentes nos vegetais são indicados como os principais responsáveis pela ação antimicrobiana dos extratos de produtos naturais, o que motiva a realização de novas pesquisas com vistas a estudar a utilização industrial destes extratos de origem natural

4.4. Conclusão

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que os extratos de tortas de açaí e de inajá podem ser considerados boas fontes de compostos bioativos com múltiplas propriedades. Os extratos apresentaram alta atividade antioxidante *in vitro* e capacidade de reduzir a ativação do fator nuclear NF-κB, embora tenham desempenhado fraca ação antimicrobiana nas condições analisadas. A determinação da composição fenólica por LC-ESI-QTOF mostrou que as tortas são materiais de composição complexa, no entanto, observou-se a presença de diversos compostos fenólicos importantes relacionados às atividades biológicas determinadas, principalmente da classe dos flavonoides (dentre os quais estão derivados do ácido caféico, apigeninas e cianidinas), ratificando o potencial bioativo desses resíduos.

Referências

AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.4395-4406, 2007.

ABU-REIDAH, I.M.; ALI-SHTAYEH, M.S.; JAMOUS, R.M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p.179-191, 2015.

AL-DUAIS, M; MULLER, L; BOHM, V; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Techonology**, v. 228, p. 813-821. 2009.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M., DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; C.Q.A; AGUIAR, R.M. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS. **Química Nova**, v. 33, n. 10, pp. 2202-2210, 2010.

ARGUDÍN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p.1751-1773, 2010.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A.N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules**, v.21, n.10, p.1321, 2016.

BARROS, R.G.C.; ANDRADE, J.K.; DENADAI, M.; NUNES, M.L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. **Food Research International** , v.102, p.84-92, 2017.

BATISTA, C.C.R.; OLIVEIRA, M.S.; ARAÚJO, M.E.; RODRIGUES, A.M.C.; BOTELHO, J.R.S.; FILHO, A.P.S.S.; MACHADO, N.T.; JUNIOR, R.N. Supercritical CO2 extraction of açaí (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp. **Journal of Supercritical Fluids**, v.107, p.364-369, 2016.

BENAYAD, Z.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; ES-SAFI, N.E. Characterization of Flavonoid Glycosides from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Crude Seeds by HPLC–DAD–ESI/MS Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p.20668-20685, 2014.

BERGANTIN, C.; MAIETTI, A.; CAVAZZINI, A.; PASTI, L.; TEDESCHI, P.; BRANDOLINI, V.; MARCHETTI, N. Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*). **Journal of Functional Foods**, v.33, p.94-102, 2017.

BOCHI, V.C.; GODOY, H.T.; GIUSTI, M.M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food Chemistry**, v.176, p. 234–243, 2015.

BONOMO, L.D.F.; SILVA, D.N.; BOASQUIVIS, P.F.; PAIVA, F.A.; GUERRA, J.F.C.; MARTINS, T.A.F.; TORRES, A.G.J.; PAULA, I.T.B.R.; CANESCHI, W.L.; JACOLOT, P.; GROSSIN, N.; TESSIER, F.J.; BOULANGER, E.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; OLIVEIRA, R.P. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms. **Plos One**, v. 9, n. 3, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Projeções do Agronegócio.** Brasil 2015/16 a 2025/26. Projeções de Longo Prazo. Brasília, 2016. Disponível em:< http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/proj_agronegocio2016.pdf/view>. Acesso em: 18 jan. 2018.

BRITO, A.; RAMIREZ, J.E.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M.J. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, p.17400-17421, 2014.

BRITO, C.; STAVROULLAKIS, A.; OLIVEIRA, T.; PRAKKI, A. Cytotoxicity and potential anti-inflammatory activity of velutin on RAW 264.7 cell line differentiation: Implications in periodontal bone loss. **Archives of Oral Biology**, v. 83, p.348-356, 2017.

BRUNSCHWIG, C.; LEBA, L.J.; SAOUT, M.; MARTIAL, K.; BEREAU, D.; ROBINSON, J.C. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Euterpe oleracea* Roots and Leaflets. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.61, 2017.

BYSTROM, L.M.; LEWIS, B.Q.; BROWN, D.L.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, R.L. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n.4, p.1017-1024, 2008.

CARDENAS H.; ARANGO, D.; NICHOLAS, C.; DUARTE, S.; NUOVO, G.J.; HE, W.; VOSS, O.H.; GONZALEZ-MEJIA, M.E.; GUTTRIDGE, D.C.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A. et al. Dietary Apigenin Exerts Immune-Regulatory Activity in Vivo by Reducing NF-κB Activity, Halting Leukocyte Infiltration and Restoring Normal Metabolic Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p.323, 2016.

CAVALCANTI, R.N.; NAVARRO-DÍAZ, H.J.; ROSTAGNO, M.A.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Polyphenols from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Leaves: Chemical Composition, Economic Evaluation and Chemometric Approach. **Journal of Food Research**, v. 1, n.3, 2012.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **PIB do Agronegócio–dados de 1996 a 2017.** Piracicaba, 2017. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>.Acesso em 13 jan.2018.

CHEN, G.; LI, X.; SALERI, F.; GUO, M. Analysis of Flavonoids in Rhamnus davurica and Its Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 21, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. 7. CLSI, Wayne, PA, USA; 2006.

D'MELLO, P.; GADHWAL, M.K.; JOSHI, U.; SHETGIRI, P. MODELING OF COX-2 INHIBOTORY ACTIVITY OF FLAVONOIDS. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.4, p.33-40, 2011.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n.2, p. 174-181, 2012.

DE CAMARGO, A.C.; REGITANO-DARCE, M. A. B. ; RASERA, G. B. ; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. ; do PRADO SILVA, L. ; ALVARENGA, V. O. ; SANT'ANA, A. S. ; SHAHIDI, F. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chemistry**, v. 237, p. 538-544, 2017.

DEGENHARDT, A.; KNAPP, H.; WINTERHALTER, P. Rapid isolation of malvidin 3-glucoside from red wine by high speed countercurrent chromatography (HSCCC). **Vitis**, v.39, n.1, p.43-44, 2000.

DENNY, C.; LAZARINI, J.G.; FRANCHIN, M.; MELO, P. S.; PEREIRA, G. E.;MASSARIOLI, A. P.; MORENO, I. A. M. ; PASCHOAL, J.A.R. ; ALENCAR, S. M. ; ROSALEN, P.L.Bioprospection of Petit Verdot grape pomace as a source of anti-inflammatory compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 292-300, 2014.

DENNY, C. ; MELO, P. S. ; FRANCHIN, M. ; MASSARIOLI, A. P. ; BERGAMASCHI, K. B. ; ALENCAR, S. M. ; ROSALEN, P. L. Guava pomace: a new source of anti-inflammatory and analgesic bioactives. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 235, 2013.

DIAS, A.L.S.; ROZET, E.; LARONDELLE, Y.; HUBERT, P.; ROGEZ, H.; QUETIN-LECLERCG, J. Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-anthocyanin flavonoids quantification in *Euterpe oleracea* juice. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n.28, p.9235-9249, 2013.

DIAS-SOUZA, M.V.; SANTOS, R.M.; CERÁVOLO, I.P.; COSENZA, G.; MARÇAL, P.H.F.; FIGUEIREDO, F.J.B. *Euterpe oleracea* pulp extract: Chemical analyses, antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*, cytotoxicity and interference on the activity of antimicrobial drugs. **Microbial Pathogenesis**, v.114, p.29-35, 2018.

DONG, H.; YANG, X.; HE, J.; CAI, S.; XIAO, K.; ZHU, L. Enhanced antioxidant activity, antibacterial activity and hypoglycemic effect of luteolin by complexation with manganese(II) and its inhibition kinetics on xanthine oxidase. **RSC Advances**, v.7, n.84, p. 53385-53395, 2017.

DUARTE M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA; C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n.2, p.197–201, 2007.

FAZELI, H.; AKBARI, R.; MOGHIM, S.; NARIMANI, T.; ARABESTANI, M.R.; GHODDOUSI, A.R. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 17, n.4, p.332-337, 2017.

FENG, R.; NI, H.MIN; WANG, S.Y.; TOURKOVA, I.L.; SHURIN, M.R.; HARADA, H.; YIN, X.MING. Cyanidin-3-rutinoside, a Natural Polyphenol Antioxidant, Selectively Kills Leukemic Cells by Induction of Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n.18, p.13468-13476, 2007.

FERNANDES, I.; FARIA, A.; AZEVEDO, J.; SOARES, S.; CALHAU, C.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol-type phenolics on breast cancer cell proliferation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3785–3792, 2010.

FRAIGE, K.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CARRILHO, E. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 395-403, 2014.

FRANCHIN, M. ; FREIRES, I. A. ; LAZARINI, J. G. ; NANI, B. D. ; CUNHA, M. G. ; COLON, D. ; **ALENCAR, S. M.** ; ROSALEN, P. L. . The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 1-35, 2017.

FRANCHIN, M; ROSALEN, P.L.; DA CUNHA, M.G.;SILVA, R.L.; COLÓN, D.F.; BASSI, G.S.; DE ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA F.Q.; BEUTLER, J.A.; CUNHA, T.M. Cinnamoyl oxymammeisin Isolated from Geopropolis Attenuates Inflammatory Process by Inhibiting Cytokine Production: Involvement of MAPK, AP-1, and NF-κB. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 7, p. 1828-1833. 2016.

FRANCISCO, V.; FIGUEIRINHA, A.; COSTA, G.; LIBERAL, J.; LOPES, M.C.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C.; GERALDES, C.F.G.C.; CRUZ, M.T.; BATISTA, M.T. Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 436-443, 2014.

GARZÓN, G.A.; NARVÁEZ-CUENCA, C.E.; VINCKEN, J.P.; GRUPPEN, H. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 217, p.364-372, 2017.

GENARO-MATTOS, T.C.; MAURÍCIO, A.Q.; RETTORI, D.; ALONSO, A.; HERMES-LIMA, M. Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach. **Plos One**, v.10, n.6, 2015.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A.M.S.; SANTOS, C.M.M.; PINTO, D.C.G.A.; CAVALEIRO, J.A.S.; LIMA, J.L.F.C. 2-Styrylchromones: Novel Strong scavengers of reactive oxigen and nitrogen species. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, n.18, p.6027-6036, 2007.

GONÇALVES, G.M.S.; SANTOS, N.P.; SREBERNICH, S.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis and açai (*Euterpe oleracea* Mart) extracts. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** , v. 32, n.3, p.349-356, 2011.

GORDON, A.; CRUZ, A.P.G.; CABRAL, L.M.C.; FREITAS, S.C.; TAXI, C.M.A.D.; DONANGELO, C.M.; MATTIETTO, R.A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V.M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, p.256-263, 2012.

GRIFFIN, S.P., BHAGOOLI, R. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 302, p. 201–211, 2004.

GROSSO, G. et al. Dietary polyphenols are inversely associated with metabolic syndrome in Polish adults of the HAPIEE study. **European Journal of Nutrition**, p. 1-12, 2016.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7; p.601-617, 1995.

HASHIM, Y. Z. H. Y. et al. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro*. **International Journal of Cancer**, v. 122, n.3, p. 495–500, 2008.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compunds: a review. **Food Chemistry**, v.173, p.501-513, 2015.

HERAS, R. M. LAS; QUIFER-RADA, P.; ANDRÉS, A.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 370–377, 2016.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

HUANG, W.; ZHU, Y.; LI, C.; SUI, Z.; MIN, W. Effect of Blueberry Anthocyanins Malvidin and Glycosides on the Antioxidant Properties in Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

IBRAHIM, R.M.; EL-HALAWANY, A.M.; SALEH, D.O.; NAGGAR, E.M.B.; EL-SHABRAWY, A.E-R.O.; EL-HAWARY, S.S. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p.134–141, 2015.

INFANTE, J.; ROSALEN, P.L.; LAZARINI, J.G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S.M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **Plos One**, v.11, n.4, 2016.

KACˇÁNIOVÁ, M.; TERENTJEVA, M.; VUKOVIC, N.; PUCHALSKI, C.; ROYCHOUDHURY, S.; KUNOVÁ, S.; KLUGA, A.; TOKÁR, M.; KLUZ, M.; IVANIŠOVÁ, E. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.25, p.1108-1116, 2017.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; YUDONG, T.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M.B.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Bioactivities of açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v.133, p.671-677, 2012.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, p.152-157, 2011.

KIM, H.J.; LEE, W.; YUN, J.M. Luteolin Inhibits Hyperglycemia-Induced Proinflammatory Cytokine Production and Its Epigenetic Mechanism in Human Monocytes. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 1383–1391, 2014.

KOLNIAK-OSTEK, J.; OSZMIANSKI, J. Characterization of phenolic compounds in different anatomical pear (*Pyrus communis* L.) parts by ultra-performance liquid chromatography photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS). **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 392, p.154-163, 2015.

LIAN, P. Y., MASEKO, T., RHEE, M.; NG, K. The antimicrobial effects of cranberry against *Staphylococcus aureus*. **Food Science and Technology International**, v. 18, n.2, p.179-186, 2012.

LING, J.; KUMAR, R. Crosstalk between NFkB and glucocorticoid signaling: A potential target of breast cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 322, n.2, p.119–126, 2012.

MA, Y.; KOSINSKA-CAGNAZZO, A.; KERR, W.L.; AMAROWICZ, R.; SWANSON, R.B.; PEGG, R.B. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanched peanut skins by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.1356, p.64-81, 2014.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.12, p. 3444-3452, 2002.

MELHORANÇA FILHO, A.L.; PEREIRA, M.R.R. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS EXTRAÍDOS DE AÇAÍ E DE PUPUNHA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Staphylococcus aureus*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p.598-603, 2012.

MELO, P.S.; ARRIVETTI, L.O.R.; ALENCAR, S.M.; SKIBSTED, L.H. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with a-tocopherol of açaí seed extracts and grape rachis extracts. **Food Chemistry**, v. 213, p.440-449, 2016.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.S.; ROSALEN, O.L. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species, **Food Chemistry**, v.181, p. 160 -169, 2015.

MENG, G.; CHAI, K.; LI, X.; ZHU, Y.; HUANG, W. Luteolin exerts pro-apoptotic effect and anti-migration effects on A549 lung adenocarcinoma cells through the activation of MEK/ERK signaling pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 257, p. 26–34, 2016.

MULABAGAL, V.; CALDERÓN, A.I. Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açaí) dietary supplement raw materials. **Food Chemistry**, v. 134, p.1156-1164, 2012.

NILE, S.H.; PARK, S.W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**, v. 30, p.134-144, 2014.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. **Nature Immunology**, v. 12, p. 695–708, 2011.

OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; BADER, Y.; SAIKO, P.; HANDLER, N.; ERKER, T.; SZEKERES, T. Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. **Oncology Reports**, v. 16, n.3, p.617-624, 2006.

PACKER, V.G.; MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; SELANI, M.M.; VILLANUEVA, N.D.M.; ALENCAR, S.M.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J. Chemical characterization, antioxidant activity and application of beetroot and guava residue extracts on the preservation of cooked chicken meat. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.52, n.11, p.7409-7416, 2015.

PEREZ, A. et al. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. **Pharmacological Research**, v. 89, p. 11-18, 2014.

PERICIN, D.; KRIMER, V.; TRIVIC, S.; RADULOVIC, L. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. **Food Chemistry**, v. 113, n.2., p.450-456, 2009.

PETRUK, G.; ILIANO, A.; DEL GIUDICE, R.; RAIOLA, A.; AMORESANO, A.; RIGANO, M.M.; PICCOLI, R.; MONTI, D.M. Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized fibroblasts. **Journal od Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p.42-51, 2017.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.1035-1042, 2000.

RAYET, B.; GÉLINAS, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. **Oncogene**, v.18, p.6938–6947, 1999.

ROSSO, V.V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 291–299, 2008.

RUFINO, M.S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; OLIVEIRA, M.S.P.; SAURA-CALIXTO, F. Açaí (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100–2106, 2011.

SASOT, G.et al. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. **Food Research International**, 2017.

SCHRECKINGER, M. E.; LOTTON, J.; LILA, M. A.; MEJIA, E. G. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal of Medicinal Food**, v.13,p. 233−246, 2010.

SHARMA, S.; ALI, A.; ALI, J.; SAHNI, J.K.; BABOOTA, S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.22, p.1063-1079, 2013.

SHUKLA, S.; SHANKAR, E.; FU, P.; MACLENNAN, G.T.; GUPTA, S. Suppression of NF-κB and NF-κB-Regulated Gene Expression by Apigenin through IκBα and IKK Pathway in TRAMP Mice. **Plos One**, v. 10, n. 9, 2015.

SINGH, J.P.; SELVENDIRAN, K.; BANU, S.M.; PADMAVATHI, R.; SAKTHISEKARAN, D. Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. **Phytomedicine**, v. 11, n.4, p.309-314,2004.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, pp. 152-178, 1999.

SOLBERG, C.O. Spread of Staphylococcus aureus in hospitals: causes and prevention. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 32, n.6, p.587-595, 2000.

SPRENGER, L.K.; GIESE, E.G.; SANTOS, J.N.; MOLENTO, M.B. *IN VITRO* ANTIBACTERIAL EFFECT OF EUTERPE OLERACEA MART. AND THEOBROMA GRANDIFLORUM HYDROALCOHOLIC EXTRACTS. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n.2, p.21-32, 2016.

TEMSAMANI, H.; KRISA, S.; DECOSSAS-MENDOZA, M.; LAMBERT, O.; MÉRILLON, J.M.; RICHARD, T. Piceatannol and Other Wine Stilbenes: A Pool of Inhibitors against α-Synuclein Aggregation and Cytotoxicity. **Nutrients**, v.8, n.6, 2016.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, p.1561-1568, 2002.

WEDICK, N. M. et al. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2012.

WONG, D.Y.S.; MUSGRAVE, I.F.; HARVEY, B.S.; SMID, S.D.. Açaí (*Euterpe oleraceae Mart.*) berry extract exerts neuroprotective effects against -amyloid exposure *in vitro*. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 221–226, 2013.

XIE, C.; KANG, J. LI, Z.; SCHAUSS, A.G.; BADGER, T.M.; NAGARAJAN, S.; WU, T.; WU, X. The açaí flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF-α and IL-6 production through inhibiting NF-κB activation and MAPK pathway. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n.9, p.1184-1191, 2012.

XUE, J.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n.51, p.12720-12726, 2013.

YASIR, M.; SULTANA, B.; NIGAM, P.S.; OWUSU-APENTEN, R. Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC–ESIMS/MS identification of phenolic components. **Food Chemistry**, v. 199, p. 307-313, 2016.

YE, M.; YANG, W.Z.; LIU, K.D.; LI, B.J.; CHENG, J.; FENG, J.; GUO, D.A.; ZHAO, Y.Y. Characterization of flavonoids in Millettia nitida var. hirsutissima by HPLC/DAD/ESI-MS^n. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n.1, p.35-42, 2012.

ZHANG, Y.; SEERAM, N.P.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, n.3, p. 670–675, 2008.

ZŁOTEK, U.; MIKULSKA, S.; NAGAJEK, M.; SWIECA, M. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, p.628-633, 2016.

5. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, conclui-se que foi possível encontrar uma condição de extração que favorecesse a obtenção de extratos com alta atividade antioxidante, os quais foram posteriormente avaliados quanto às atividades biológicas antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, e à composição fenólica por LC-ESI-QTOF-MS.

Nas condições estudadas ficou demonstrado que os extratos de ambas as tortas apresentaram elevada atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória expressiva, com destaque para o extrato de torta de açaí. A análise da atividade antimicrobiana indicou que o extrato de açaí possui uma fraca capacidade de inibição contra determinados microrganismos, no entanto, este extrato ainda tem potencial para ser um agente antimicrobiano. A determinação da composição fenólica por espectrometria de massas de alta resolução ratificou os resultados das atividades biológicas analisadas e indicou a presença de diversos compostos fenólicos cujas atividades biológicas são de grande importância, principalmente da classe dos flavonoides.

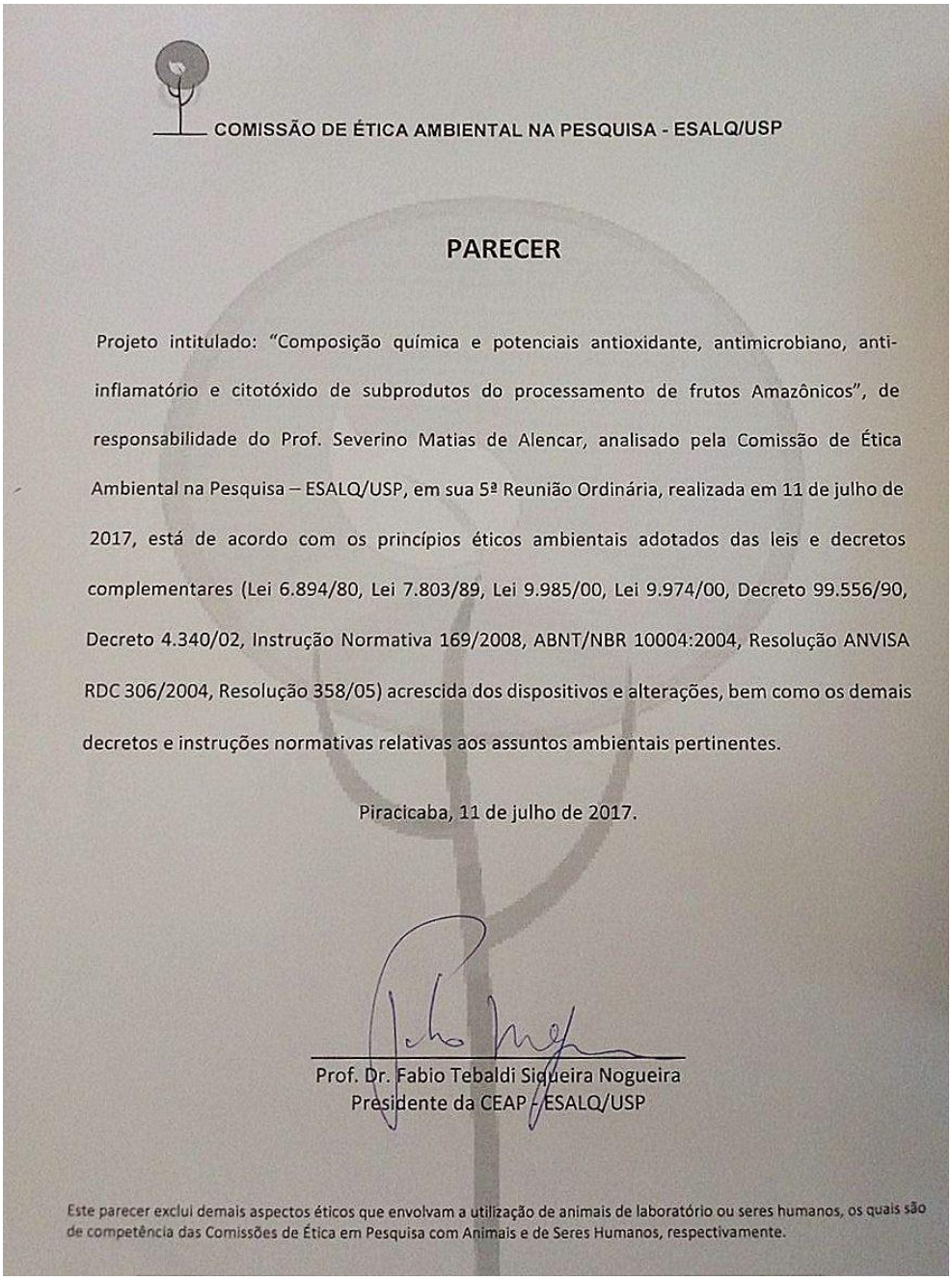
De acordo com os resultados obtidos, tem-se como perspectivas a realização de investigações *in vivo* (modelo animal) para a confirmação das atividades biológicas das tortas de açaí e de inajá podem ser as próximas etapas desenvolvidas. Além disso, o isolamento e a avaliação da biodisponibilidade dos compostos fenólicos dos extratos das tortas de açaí e inajá podem indicar potenciais usos industriais dos extratos ou dos compostos isolados como novos ingredientes naturais com múltiplas propriedades funcionais. Acredita-se, também, que estudos e possíveis interveções de ordem social também podem ser desenvolvidos, com vistas a valorizar tanto as matérias-primas vegetais nativas e os resíduos agroindustriais, quanto a região e a população local e regional dependentes de tais culturas.

6. GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS NO PROJETO

A destinação dos resíduos gerados neste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética Ambiental na Pesquisa da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) (APÊNDICE A). A alteração no título do projeto não implicou em mudanças quanto à geração e destinação dos resíduos. Todos os resíduos gerados nas análises químicas realizadas no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental (ESALQ/USP) foram armazenados no entreposto do Departamento Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP e, posteriormente, destinados a tratamento adequado no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Químicos (ESALQ/USP) e/ou enviados para incineração.

APÊNDICES

APÊNDICE A.



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

PARECER

Projeto intitulado: "Composição química e potenciais antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e citotóxido de subprodutos do processamento de frutos Amazônicos", de responsabilidade do Prof. Severino Matias de Alencar, analisado pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa – ESALQ/USP, em sua 5ª Reunião Ordinária, realizada em 11 de julho de 2017, está de acordo com os princípios éticos ambientais adotados das leis e decretos complementares (Lei 6.894/80, Lei 7.803/89, Lei 9.985/00, Lei 9.974/00, Decreto 99.556/90, Decreto 4.340/02, Instrução Normativa 169/2008, ABNT/NBR 10004:2004, Resolução ANVISA RDC 306/2004, Resolução 358/05) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas relativas aos assuntos ambientais pertinentes.

Piracicaba, 11 de julho de 2017.

Prof. Dr. Fabio Tebaldi Siqueira Nogueira
Presidente da CEAP - ESALQ/USP

Este parecer exclui demais aspectos éticos que envolvam a utilização de animais de laboratório ou seres humanos, os quais são de competência das Comissões de Ética em Pesquisa com Animais e de Seres Humanos, respectivamente.

Figura 1. Comitê de Ética Ambiental na Pesquisa

APÊNDICE B

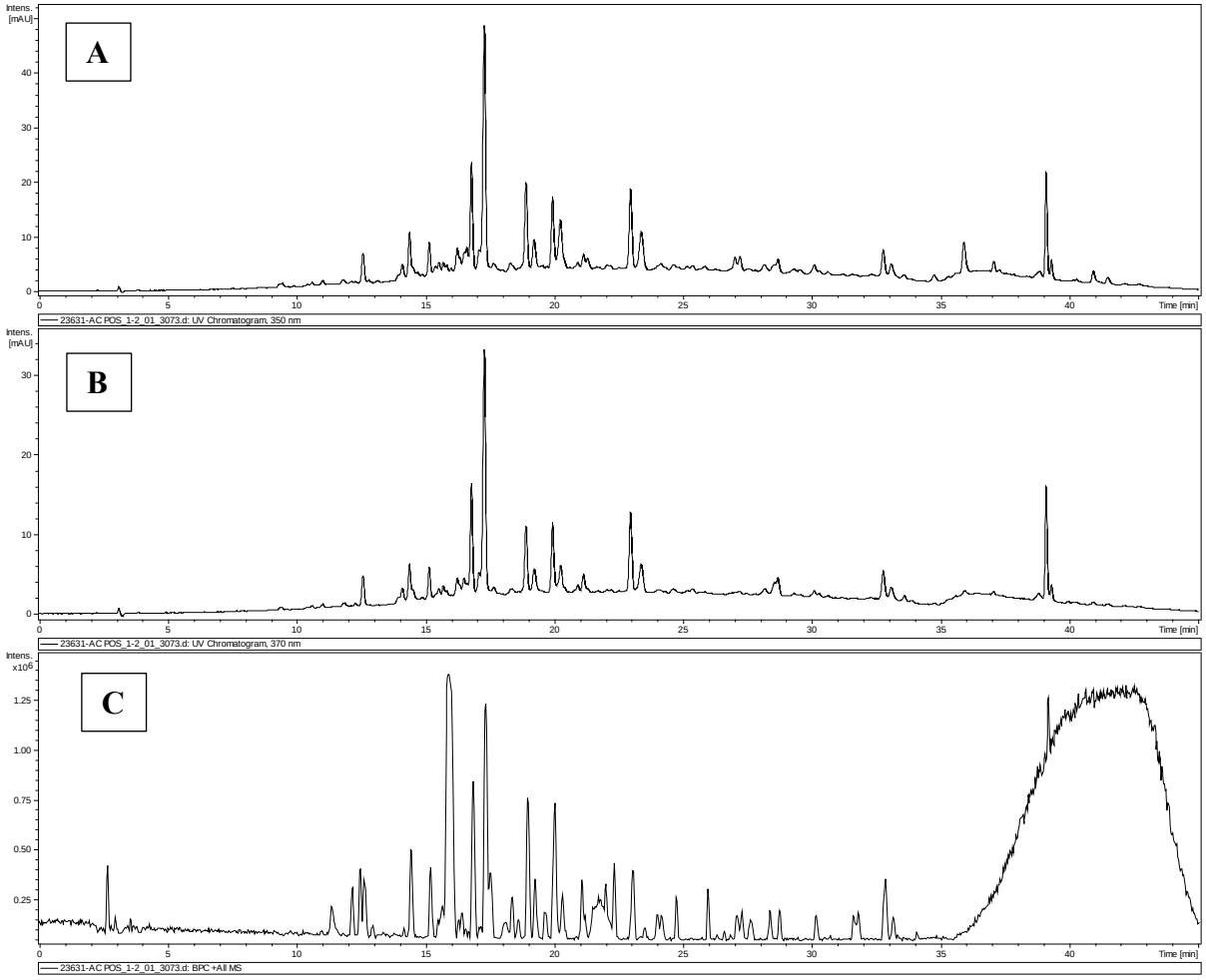


Figura 2. Cromatogramas referentes ao extrato de torta de açaí analisado em modo de operação positivo. A= comprimento de onda 350nm, B=comprimento de onda 370nm, C= interpolação dos gráficos cromatográficos

APÊNDICE C

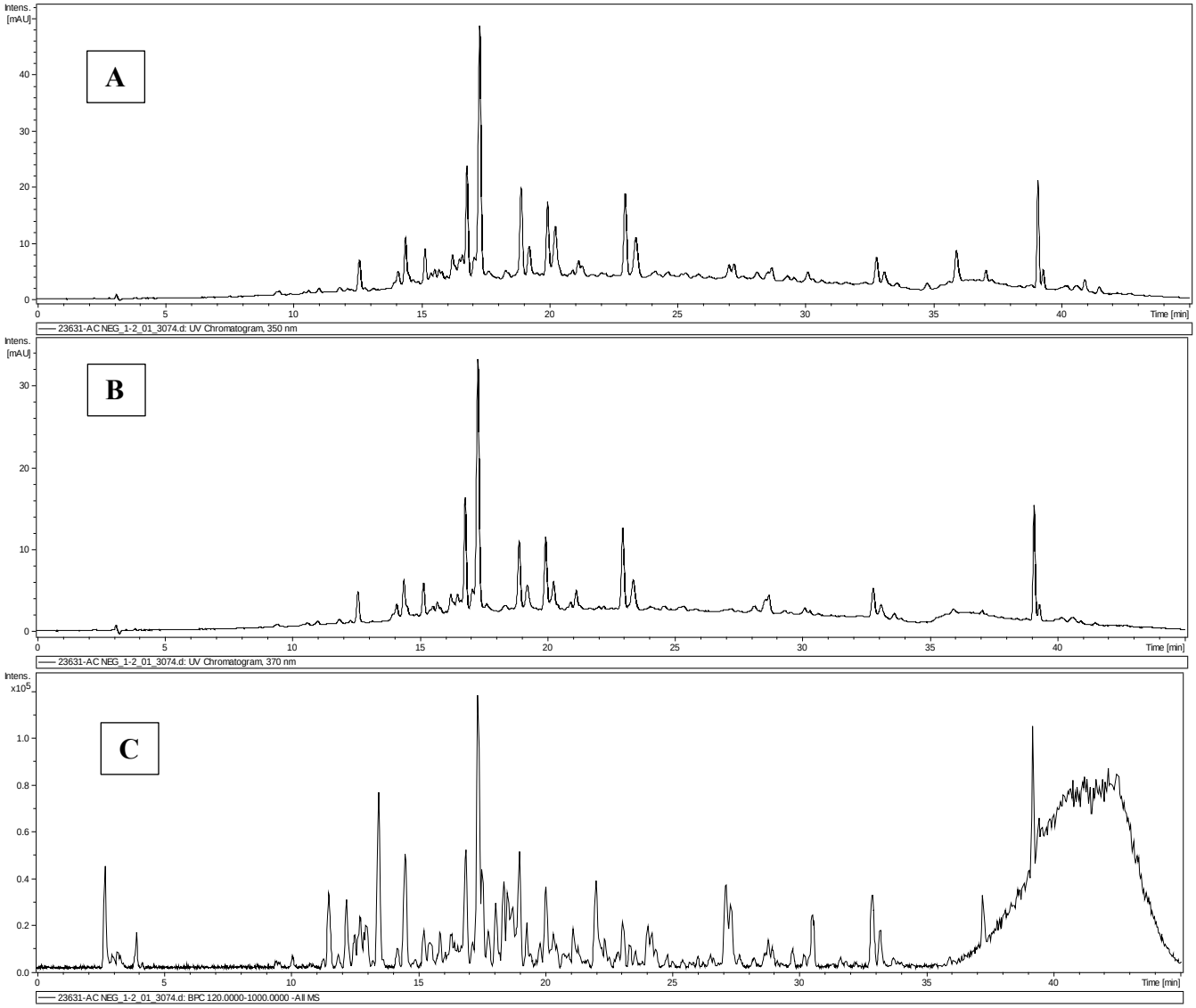


Figura 3. Cromatogramas referentes ao extrato de torta de açaí analisado em modo de operação negativo. A= comprimento de onda 350nm, B=comprimento de onda 370nm, C= interpolação dos gráficos cromatográficos

APÊNDICE D

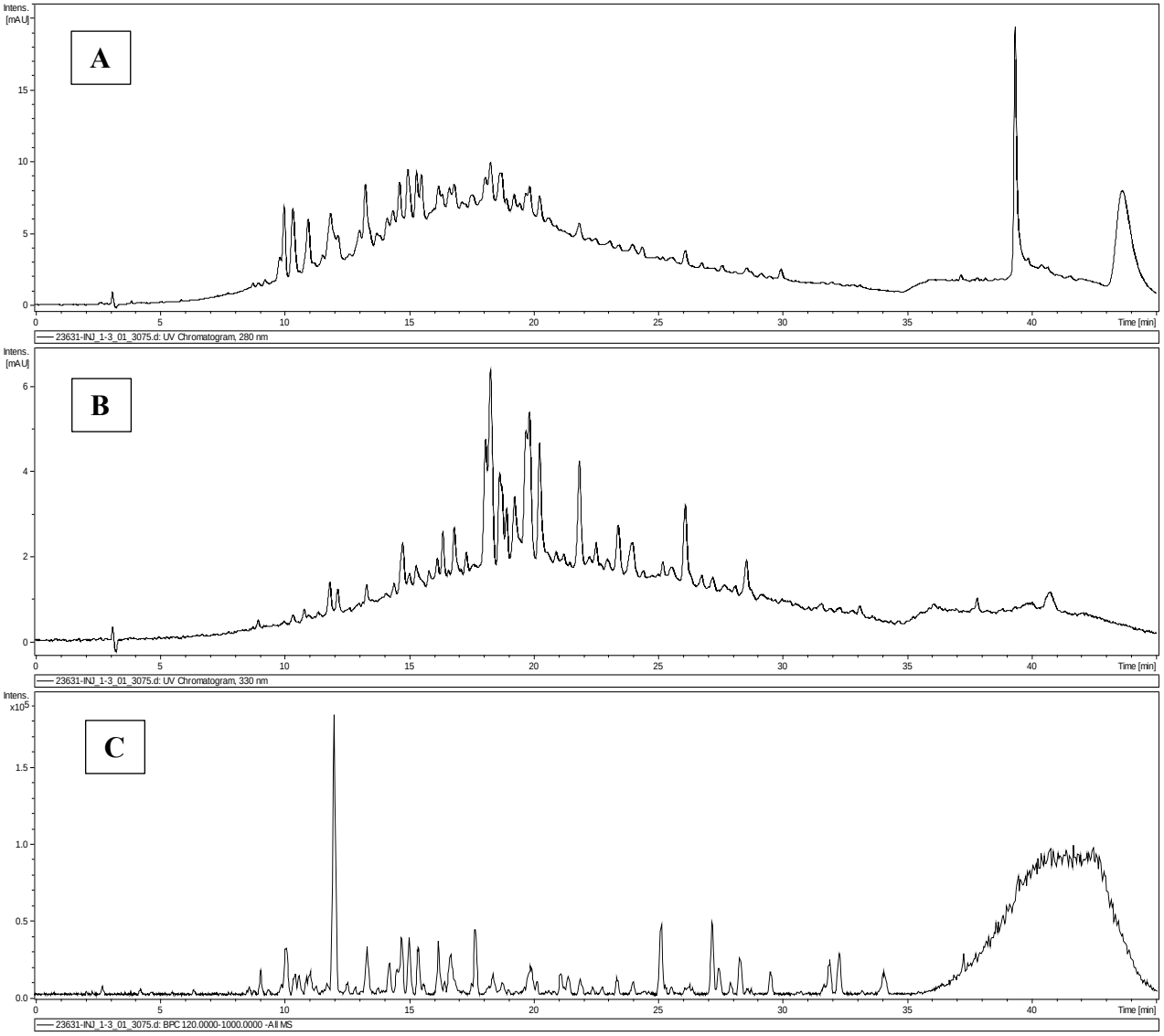


Figura 4. Cromatogramas referentes ao extrato de torta de inajá analisado em modo de operação negativo. A= comprimento de onda 280nm, B=comprimento de onda 330nm, C= interpolação dos gráficos cromatográficos