



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA

MEREZILDA BARRETO GONÇALVES

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DE INIBIDORES
DE TIROSINASE EM EXTRATOS ETANÓLICOS DA TORTA DE
CASTANHA (*BERTHOLLETIA EXCELSA*)**

BELÉM - PA

2019

MEREZILDA BARRETO GONÇALVES

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DE INIBIDORES
DE TIROSINASE EM EXTRATOS ETANÓLICOS DA TORTA DE
CASTANHA (*BERTHOLLETIA EXCELSA*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química industrial da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Química industrial.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho

BELÉM - PA

2019

MEREZILDA BARRETO GONÇALVES

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DE INIBIDORES
DE TIROSINASE EM EXTRATOS ETANÓLICOS DA TORTA DE
CASTANHA (*BERTHOLLETIA EXCELSA*)**

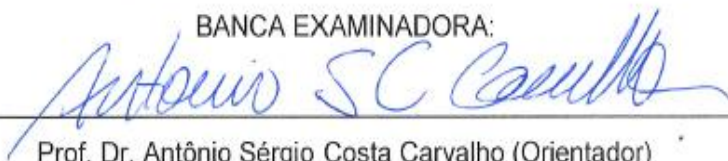
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Química industrial da Universidade
Federal do Pará como requisito parcial para
obtenção do grau de bacharel em Química industrial.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho

Conclusão: EXCELENTE


Aprovado em 08/04/2019

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho (Orientador)

Faculdade de Biotecnologia-UFPA



Prof. Dr. José Rogério de Araújo Silva (Examinador)

Faculdade de Química-UFPA



Prof. MSc. Orivan Maria Marques Teixeira (Examinador)

Instituição-Embrapa Amazônia Oriental

BELÉM - PA

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele eu não seria nada e aos meus pais e irmãos por todo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo fôlego de vida e por ter me dado saúde e forças para terminar mais essa jornada.

Aos meus pais, Marivalda Barreto Gonçalves e Messias Ferreira Gonçalves, por acreditarem em mim, me apoiarem e me amarem incondicionalmente.

Aos meus irmãos Merediane Silva, Alessandra Rodrigues e Thiago Gonçalves pela cumplicidade e incentivo.

Ao meu namorado Joedson Soares Gabriel, por toda paciência, amor, dedicação e por me apoiar em todos os momentos.

Aos meus demais familiares de maneira geral por torcerem por mim, em especial ao meu cunhado Vinicius de Moraes que foi muito participativo nessa minha jornada acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho, por seus ensinamentos, amizade, paciência e competência profissional que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora pela disponibilidade e as valorosas contribuições na avaliação escrita deste trabalho.

A todos os amigos que conquistei durante a graduação, em especial ao Jair, Yrvana, Ian, Arnold, Renan e Jamile pela parceria e ajuda nos trabalhos acadêmicos.

À minha orientadora de estágio, Dr. Rafaella Mattietto e meus colegas de laboratório Vânia Brito e William Silva que muito contribuíram em meu crescimento profissional e pessoal.

À empresa Amazon Oil Industry situada no município de Ananindeua que cedeu o material utilizado nessa pesquisa.

Ao laboratório de planejamento e desenvolvimento de fármacos (LPDF) da UFPA, na pessoa do prof. Dr. Cláudio Nahum Alves, pelo espaço e infraestrutura cedido para a execução de parte desse trabalho.

À universidade federal do Pará, por me propiciar a oportunidade de formação no curso de Química Industrial.

Ao PIBIC/CNPq pelo incentivo a pesquisa e apoio financeiro no ano de 2017.

A todos que de alguma maneira contribuíram e fizeram parte, direta ou indiretamente, dessa conquista.

RESUMO

A castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*) é uma amêndoa oriunda da castanheira, uma espécie arbórea tipicamente amazônica. A extração do óleo dessa amêndoa é comumente feita por prensagem e origina um subproduto denominado de torta, que comumente é tratado como resíduo por essas indústrias. Tendo isso em vista, esse trabalho buscou investigar a presença de compostos fenólicos presentes na torta de castanha-do-Pará e realizar a investigação do potencial de atividade antioxidante e inibitória de tirosinase nesse material. Para isso, fez-se uso de um delineamento experimental através de uma análise fatorial 2^3 de modo a verificar a influência das variáveis (tempo, temperatura e razão soluto/solvente) sobre a extração desses compostos. A determinação do teor de fenólicos totais foi feita através do método folin-ciocalteau e a determinação da atividade de inibição de tirosinase foi determinada por método espectrofotométrico. Os melhores resultados de extração de fenólicos foram obtidos quando se aumentou o tempo e diminuiu-se a razão soluto/solvente, inferindo em um melhor rendimento de fenólicos quando submetidos a uma extração a 50°C, por 10 min numa razão soluto/solvente de 1/7. A determinação de atividade antioxidante foi feita pelo método de sequestro de NO e apresentou porcentagens de inibição iguais ou inferiores a 8,0 % para todos os extratos indicando uma baixa atividade antioxidante na torta residual de castanha-do-Pará. A atividade de inibição de tirosinase pelos extratos também foi baixa, apresentando valores entre 4,50 e 25,09 % de inibição de tirosinase monofenolase (Tyrosina) e valores entre 4,37 e 24,77% de inibição de tirosinase difenolase (L-DOPA). A partir do estudo realizado para verificar a relação entre o teor de compostos fenólicos encontrados e os percentuais de inibição de NO e de tirosinase concluiu-se que não houve correlação entre eles.

Palavras-chave: *Bertholletia excelsa*; fenólicos; inibidores de tirosinase; atividade antioxidante

ABSTRACT

The *Bertholletia excelsa* is an almond native to Brazil nut tree, it is a species typically Amazonian. The extraction of the oil from this almond is commonly done by pressing and gives rise to a by-product called pie, which is commonly treated as waste by these industries. This work aimed to investigate the presence of phenolic compounds present in the chestnut pie and to investigate the potential of antioxidant and inhibitory activity of tyrosinase. For this, an experimental design was used through a factorial analysis 2³ in order to verify the influence of the variables (time, temperature and solute / solvent ratio) on the extraction of these compounds. The determination of the total phenolic content was done using the folin-ciocalteau method and the determination of the activity of inhibition of tyrosinase was determined by spectrophotometric method. The best phenolic extraction results were obtained when the time was increased and the solute / solvent ratio decreased, yielding a better yield of phenolics when subjected to extraction at 50 ° C for 10 min at a solute / solvent ratio of 1/7. The determination of antioxidant activity was done by the NO sequestration method and presented inhibition percentages equal to or lower than 8.0% for all the extracts indicating a low antioxidant activity in the brown cake of Pará. The activity of inhibition of tyrosinase by the extracts was also low, with values between 4.50 and 25.09% inhibition of tyrosinase monophenolase (Tyrosine) and values between 4,37and 24,77% inhibition of tyrosinase diphenolase (L-DOPA). In conclusion, was verified the relationship between the content of phenolic compounds found and the percentages of inhibition of NO and tyrosinase, it was concluded that there was no correlation between them.

Keywords: *Bertholletia excelsa*; phenolics; tyrosinase inhibitors; antioxidant activity

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

UV - Ultravioleta

Nm - Nanmetros

C - Graus Celsius

min - Minutos

g - Grama

mL - Mililitro

μ L - Microlitro

N - Normalidade

ER - Equivalente de rutina

NO - xido nítrico

PBS - Phosphate buffered saline

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ppm - Parte por milhão

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Castanheira-do-Pará..... | 15 |
| Figura 2- Ouriços de castanha..... | 15 |
| Figura 3- Mecanismo de reação envolvida no método de Griess..... | 20 |
| Figura 4- Estrutura química dos flavonoides..... | 22 |
| Figura 5- Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos..... | 22 |
| Figura 6- Estrutura química do tocotrienol e tocoferol..... | 23 |
| Figura 7- Espectro de radiação eletromagnética..... | 26 |
| Figura 8- Torta de castanha-do-Pará..... | 27 |
| Figura 9- Extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará..... | 29 |
| Figura 10- fluxograma da determinação de compostos fenólicos totais pelo método folin-ciocalteau..... | 29 |
| Figura 11- Curva analítica para o padrão de Rutina..... | 30 |
| Figura 12- Fluxograma da determinação de atividade antioxidante pelo método de captura de NO..... | 31 |
| Figura 13- Curva padrão de ácido ascórbico..... | 32 |
| Figura 14- Representação gráfica da eficiência de inibição de NO e o teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará..... | 36 |
| Figura 15- Gráfico de correlação entre teor de compostos fenólicos e atividade de sequestro de NO..... | 39 |
| Figura 16- Gráfico de correlação entre teor de compostos fenólicos e o percentual de inibição de tirosinase monofenolase (Tyrosina)..... | 41 |
| Figura 17- Gráfico de correlação entre teor de compostos fenólicos e o percentual de inibição de tirosinase difenolase (L-DOPA)..... | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Planejamento experimental: variáveis utilizadas na extração assistida por ultrassom de compostos bioativos da torta de castanha-do-Pará | 28 |
| Tabela 2- Teor de compostos fenólicos totais em extratos etanólicos da torta de castanha..... | 34 |
| Tabela 3- Percentual de sequestro de NO por extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará..... | 37 |
| Tabela 4- Percentual de atividade inibitória de tirosinase de extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará..... | 40 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 14 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 14 |
| 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO | 15 |
| 3.1 Castanha-do-Pará (<i>Bertholletia excelsa</i>)..... | 15 |
| 3.2 Utilização da castanha-do-pará pelas indústrias alimentícias e de cosméticos... | 16 |
| 3.3 Composição química da castanha-do-Pará..... | 17 |
| 3.4 A produção e reutilização de resíduos da indústria de óleos vegetais..... | 17 |
| 3.5 Antioxidantes..... | 18 |
| 3.6 Radicais Livres e o estresse oxidativo..... | 19 |
| 3.7 Determinação de atividade antioxidante pelo método de sequestro de óxido nítrico..... | 19 |
| 3.8 Compostos fenólicos..... | 20 |
| 3.9 Tipos de compostos fenólicos..... | 21 |
| 3.9.1 Flavonóides..... | 21 |
| 3.9.2 Ácidos fenólicos..... | 22 |
| 3.9.3 Taninos..... | 23 |
| 3.9.4 Tocoferóis..... | 23 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.10 | Determinação de compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu..... | 24 |
| 3.11 | Inibidores de tirosinase..... | 24 |
| 3.12 | Extração assistida por ultrassom..... | 24 |
| 3.13 | Espectrofotometria UV-Visível..... | 25 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 27 |
| 4.1 | Material..... | 27 |
| 4.2 | Planejamento experimental..... | 27 |
| 4.3 | Obtenção dos extratos..... | 28 |
| 4.4 | Determinação de compostos fenólicos totais no extrato alcoólico da torta de castanha-do-Pará..... | 29 |
| 4.5 | Cálculo para a determinação do teor de fenólicos totais do extrato equivalente a rutina..... | 31 |
| 4.6 | Ensaio de captura do óxido nítrico (NO [*])..... | 31 |
| 4.7 | Ensaio de inibição de tirosinase..... | 32 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 34 |
| 5.1 | Teor de compostos fenólicos totais..... | 34 |
| 5.2 | Atividade antioxidante por captura do óxido nítrico (NO [*])..... | 36 |
| 5.3 | Atividade de inibição de tirosinase..... | 39 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 43 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

A Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*), é uma amêndoa oriunda da castanheira, espécie arbórea símbolo da região Amazônica e que representa grande relevância econômica e importância social e ambiental para a região (SILVA et al., 2013). Essas amêndoas, fornecem um óleo de grande interesse comercial em vista de sua qualidade, tendo assim, aplicações em diversos ramos da indústria alimentícia e de cosméticos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2014).

Os óleos vegetais podem apresentar em sua composição teores significativos de compostos bioativos, como compostos fenólicos, tocoferóis e carotenoides, e com isso, atuarem como bons antioxidantes combatendo os danos oxidativos causados pelos radicais livres (COSTA; JORGE, 2011).

De modo geral, os óleos vegetais tais como o óleo da castanha-do-Pará, podem ser obtidos por diversas técnicas, dentre as quais está incluída a técnica de extração por prensagem. No entanto, esse método de extração apresenta a desvantagem de gerar subprodutos que muitas vezes são tratados como resíduos agroindustriais pela indústria de refino de óleos vegetais, como é o caso da torta. A torta é o subproduto obtido após a prensagem do material vegetal e apresenta ainda em sua composição resquícios de óleo, desse modo, torna-se interessante a pesquisa por compostos bioativos que possam estar presentes ainda nesse material.

A tirosinase é uma enzima que atua na biossíntese da melanina e alterações em seu nível pode acarretar em distúrbios pigmentares e desse modo desencadear doenças dermatológicas como despigmentação da pele e cabelo e hiperpigmentação (LOPES, 2015). Desse modo, a busca por novos inibidores tem crescido e, dado que a inibição da tirosinase apresenta relação com substâncias que apresentem estrutura fenólica e que esses compostos são encontrados frequentemente em plantas, a busca por novos inibidores de origem natural tem intensificado por parte de indústrias farmacêuticas e de cosméticas (MACRINI, 2004).

Tendo isso em vista, esse trabalho se propõe a determinar o teor de fenólicos totais e estudar o potencial de atividade antioxidante e inibidores de tirosinase em extratos alcoólicos da torta de Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antioxidante e inibidor de tirosinase, e a relação destes com o teor de compostos fenólicos totais dos extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*).

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a melhor eficiência de extração de compostos bioativos presentes na torta de castanha-do-Pará por meio de extração assistida por ultrassom levando-se em consideração as variáveis: tempo, temperatura e razão soluto/solvente;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais presentes em extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará utilizando o método Folin-Ciocalteu;
- Determinar o potencial antioxidante de extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará utilizando o método de sequestro de óxido nítrico NO;
- Estudar a atividade inibidora de tirosinase em extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará;
- Realizar estudos de correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e os percentuais de inibição de tirosinase e de atividade antioxidante de extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará.

3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*)

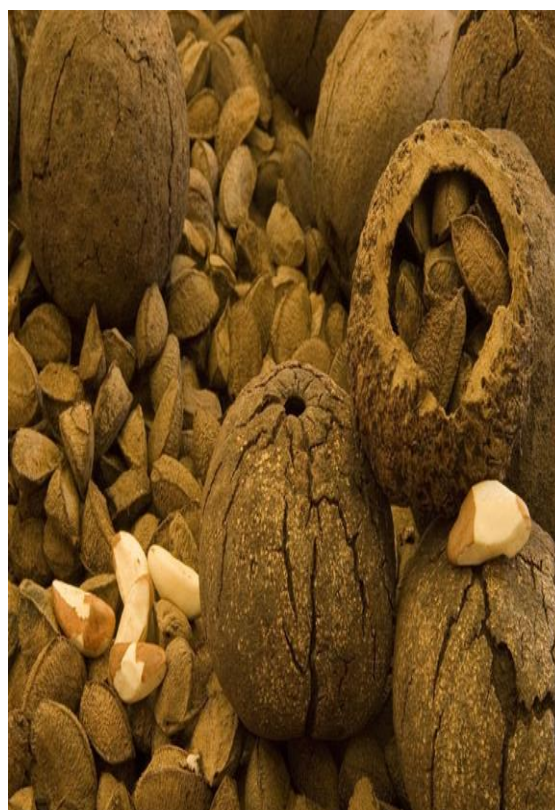
A Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*) é uma espécie arbórea, típica da região amazônica e amplamente distribuídas em castanhais ao longo de florestas não inundadas pelo Brasil, Guianas, Colômbia, Venezuela, Peru e Bolívia. Uma castanheira pode alcançar em média 50 metros de altura e mais de 2 metros de base e dá origem a frutos popularmente conhecidos como ouriços, onde são encontradas em média 18 castanhas em seu interior. (AMAZON OIL INDUSTRY, 2018; SILVA et al. ,2013).

Figura 1- Castanheira-do-Pará¹



Fonte: Página da Embrapa

Figura 2- Ouriços de castanha²



Fonte: Página da Amazon Oil Industry

¹ Imagem disponível em: <https://www.embrapa.br/acre/busca-de-imagens/-/midia/1857001/castanheira>

² Imagem disponível em: <https://www.amazonoil.com.br/castanha-do-para/>

A castanha-do-Pará como o próprio nome sugere, é uma amêndoa típica da região amazônica, mais especificamente do Pará, e apesar de medidas já terem sido propostas com o intuito de modificação do nome para castanha-do-Brasil, o termo castanha-do-Pará perdura (ALMEIDA, 2018).

O fruto da castanheira é conhecido por seu sabor, qualidade nutricional e funcional sendo deste modo, muito apreciada pela população local e estrangeira, o que o torna ainda alvo de grande exportação, sendo considerada um dos produtos não madeireiros de maior relevância para a região amazônica (SILVA JÚNIOR, 2016).

A castanha-do-Pará é consumida nas mais diversas formas, seja ela in natura propriamente dita ou mesmo em sua forma industrializada, o óleo dessas amêndoas, normalmente obtido por prensagem, é tido como um óleo de excelente qualidade. Os ouriços vazios também são de interesse, sendo muitas vezes utilizados na confecção de produtos artesanais e afins (WADT, 2005).

Essa amêndoa possui em sua composição, constituintes tidos como essenciais para uma boa alimentação, dentre os quais está o selênio, que possui características antioxidantes que comumente estão associados a prevenção de doenças tais como as relacionadas ao sistema cardiovascular, entre outras (SOUZA; MENEZES 2004).

3.2 Utilização da castanha-do-pará pelas indústrias alimentícias e de cosméticos

As sementes de castanha são caracterizadas por serem uma excelente fonte lipídica e seu produto extraído é de extrema importância para os setores industriais de cosméticos e alimentos, por conta de seus aspectos qualitativos e quantitativos (SANTOS, 2012).

A castanha-do-pará origina um óleo comestível de alta qualidade muito apreciado pela população local e estrangeira, esse óleo tem aplicação em diversos produtos farmacêuticos e cosméticos tais como: sabonetes, óleos corporais, condicionadores entre outros (LIMA; 2009).

A torta de castanha obtida durante o processamento dessa amêndoa, também pode ser reaproveitada de diversas maneiras dentre as quais pode-se citar a sua

aplicação em produtos alimentícios como pães, bebidas, biscoitos entre outros promovendo o enriquecimento desses produtos (SOUZA; MENEZES 2004).

3.3 Composição química da castanha-do-Pará

A castanha-do-Pará destaca-se por sua composição vitamínica onde inclui-se a vitamina C, e sua composição mineral incluindo, principalmente o selênio, os quais são frequentemente relacionados a excelente atividade antioxidante apresentada por essas amêndoas. (VERAS; AMARAL; AMORIM, 2007).

Entre os principais constituintes da castanha-do-Pará estão o bário, bromo, cobalto, cério, magnésio, níquel, rubídio e, principalmente o selênio. Já em termos de ácidos graxos presentes nessas amêndoas, destacam-se o palmítico, o oleico e o linoleico (MARTINS; SILVA; SILVEIRA, 2008).

BALBI et al. 2014, verificaram em seu estudo sobre a composição química da castanha que essas amêndoas apresentam elevado valor calórico, de proteínas, de lipídeos, carboidratos, fibra alimentar, de selênio. Ele verificou ainda que o teor de aflatoxinas totais foi inferior a 1,00µg/kg o que indica segurança em relação a este metabólito tóxico.

3.4 A produção e reutilização de resíduos da indústria de óleos vegetais

As extrações lipídicas de frutos podem ser feitas através de diversas técnicas, no entanto, ganha-se destaque o uso da técnica de prensagens. No entanto, essa técnica tem a desvantagem de dar origem a subprodutos que muitas das vezes não são reaproveitados pela própria indústria de processamento de óleos e desse modo são tratadas como rejeitos industriais.

Segundo Santos (2012), o processamento de óleos vegetais acarreta em perdas durante as suas etapas, as quais estão relacionadas ao tipo de processamento aplicado, tecnologia, e outras diversas outras variáveis do processo. Santos (2012) relata ainda que a parcela de perdas durante o processo pode girar em torno de 15 a 20%.

Os resíduos gerados pelo processamento de óleos vegetais podem atuar como fontes de antioxidantes naturais, dado que apresentam ainda resquícios de

óleos os quais podem inferir a esse material a presença de compostos bioativos tais como os compostos fenólicos (COSTA; BARROS, 2015).

A partir dessas observações, vem aumentando-se o interesse de pesquisadores e indústrias pelo desenvolvimento de formas de aproveitamento dos rejeitos industriais, de modo a promover a valorização desses resíduos agroindustriais e dessa forma agregar valor aos subprodutos gerados.

3.5 Antioxidantes

Uma substância dita antioxidante, é uma substância que apresenta a capacidade de retardar ou ainda de inibir completamente a oxidação de um substrato, ainda que esta esteja em baixas concentrações se comparadas a um substrato oxidável (DIAS et al., 2015).

As substâncias antioxidantes podem ser classificadas de dois modos, antioxidantes primários ou antioxidantes secundários, e essa classificação depende do modo como a substância em questão atua nas medidas protetivas e em que etapa do processo oxidativo ela atuará (KARLING, 2017).

As substâncias caracterizadas como antioxidantes primários são aquelas que interrompem o processo de propagação da cadeia de radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio ou mesmo de um elétron a um determinado radical. No entanto, dado que a doação do hidrogênio ou do elétron torna o antioxidante oxidável uma espécie de radical é necessário que esse radical antioxidante formado tenha uma baixa energia para que a propagação de radicais seja cessada (DECKER et al., 2010).

Já os antioxidantes ditos secundários, são aqueles que atuam segundo Del Ré e Jorge (2012), na complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete.

3.6 Radicais Livres e o estresse oxidativo

A designação radical livre é dada a estruturas químicas que apresentam em sua estrutura elétrons desemparelhados que ocupam um orbital atômico ou molecular, o que as tornam moléculas altamente reativas de grande instabilidade e tempo de meia vida curto (DALGÊ, 2014).

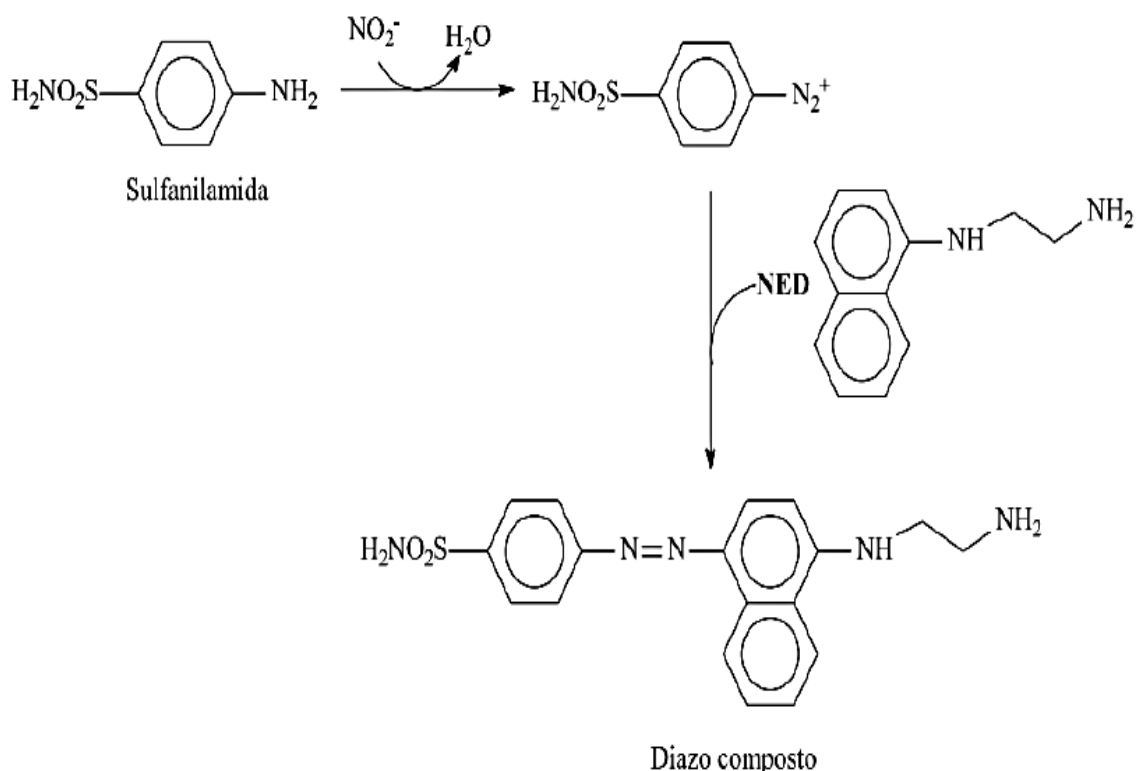
Já o estresse oxidativo é a designação dada ao desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio dar-se quando há a deterioração dos mecanismos de proteção contra essas espécies ou ainda quando ocorre a produção acelerada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) (DALGÊ, 2014).

Substâncias que atuam como antioxidantes são capazes de promover a estabilização ou mesmo desativar por completo a ação dos radicais livres atuando em diferentes pontos do processo de oxidação tais como no sequestro de espécies ERO/ERN; Reparador de danos causados pela ação das espécies ERO/ERN e Quelante de metais (CASTRO, 2012).

3.7 Determinação de atividade antioxidante pelo método de sequestro de óxido nítrico

Na literatura são reportados diversos métodos de determinação de nitrito e nitrato, dentre as quais podemos citar a de determinação espectrofotométrica, do íon nitrito através da reação de Griess. Esse método baseia-se na reação entre o íon nitrito com a sulfanilamida em meio ácido que origina um sal de diazônio que reage por acoplamento com cloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, o qual apresenta uma coloração avermelhada e pode ser detectado espectrofotometricamente em comprimento de onda em torno de 540 nm. A figura 3 representa o mecanismo de reação envolvida no método de Griess (SANTOS, 2013)

Figura 3- Mecanismo de reação envolvida no método de Griess.³



Fonte: SANTOS, 2013.

3.8 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos formados por estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, sendo encontrados na forma simples ou de polímeros, que lhes atribui ação antioxidante. Esses compostos podem ter origem natural ou sintética e estar presentes em vegetais em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos representam um dos mais importantes grupos de metabólitos secundários encontrados em espécies vegetais, e são caracterizados de diversas maneiras como: fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, entre outros. Esses compostos podem auxiliar na proteção da planta contra agressões ambientais,

além de atuar como antioxidante impedindo a oxidação de diversos ingredientes em alimentos, entre os quais destaca-se a peroxidação lipídica (SPEROTTO, 2014).

No que diz respeito a estrutura química, as classes de compostos fenólicos são distinguidas pelo número de anéis aromáticos da cadeia e pelo número de carbonos ligados a esta. Podem ser classificados como fenóis mais simples ou complexos, como exemplos de fenóis ditos mais simples tem-se os ácidos fenólicos e os fenilpropanóides e como exemplo de fenóis mais complexos podemos citar os estilbenos, flavonóides, ligninas e taninos (STAHL, 2011).

3.9 Tipos de compostos fenólicos

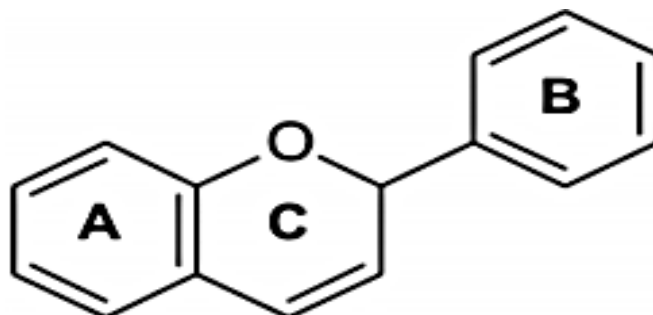
Os compostos fenólicos apresentam uma diversidade de estruturas que são decorrentes da variedade de combinações que ocorrem na natureza originando os ditos polifenóis. A gama de estruturas apresentadas por esses compostos, são classificadas em diferentes classes dentre as quais destaca-se os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007).

3.9.1 Flavonóides

Os flavonoides são uma das classes de compostos fenólicos e são caracterizados por apresentarem em sua estrutura química dois anéis aromáticos que são ligados entre si por meio de uma cadeia de 3 carbonos, o que totaliza 15 carbonos em sua estrutura, sendo estes apresentados normalmente hidroxilados e/ou conjugados com moléculas de açúcar. Apresentam uma série de compostos classificados em diferentes classes como por exemplo: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas e isoflavonóides. Esses compostos podem exercer diferentes propriedades como por exemplo as farmacológicas dentre as quais podemos citar sua ação anti-inflamatória e antioxidante (STAHL, 2011).

A figura 3, representa a estrutura química dos flavonoides. Variações em substituição do anel C resultam em classes de flavonoides e substituições dos anéis A e B são responsáveis pela geração de diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 4- Estrutura química dos flavonóides⁴



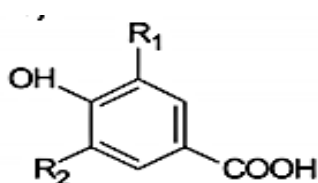
Fonte: ANGELO; JORGE, 2007.

3.9.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos representam uma classe de compostos fenólicos caracterizados por possuir em sua estrutura química um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupos de hidroxilas e/ou metoxila (ANGELO; JORGE, 2007).

Esses compostos são divididos em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzóico nos quais estão incluídos os ácidos, gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico ou derivados do ácido hidroxicinâmico que incluem os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 5- Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos⁵

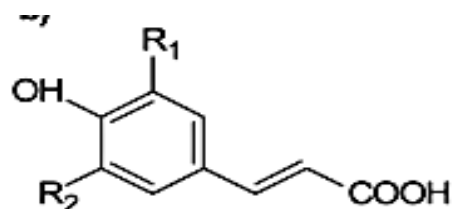


Ácido p-hidroxibenzóico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido protocatecuico: $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido vanílico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = OCH_3$



Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido caféico: $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Fonte: ANGELO; JORGE, 2007.

⁴ Imagem disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>

⁵ Imagem disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>

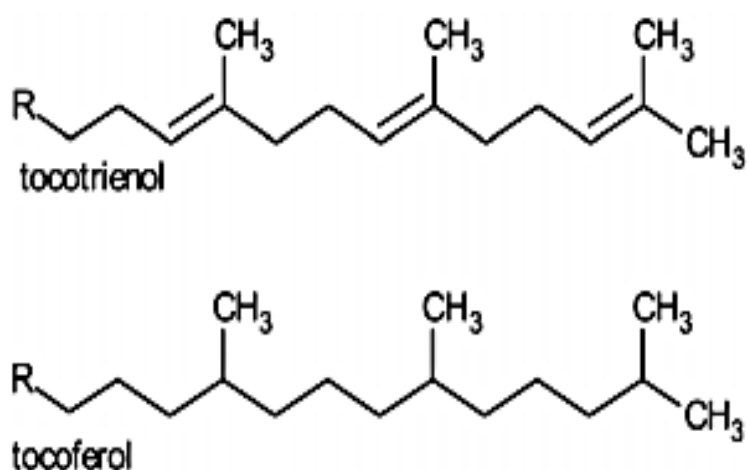
3.9.3 Taninos

Os taninos são divididos em dois grupos, sendo eles: taninos hidrolisáveis ou taninos condensáveis. Apesar de ambos apresentarem molécula poli-hidroxifenóis ou seus derivados, esses grupos apresentam grande diferença estrutural entre si. Os taninos são responsáveis por conferir a frutos, quando presentes em pequenas quantidades, características sensoriais desejáveis ditas “corpo da fruta”, no entanto, quando esses compostos estão presentes em grandes quantidades, conferem aos frutos bem como outros alimentos, características adstringentes (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

3.9.4 Tocoferóis

Dentre as classes de fenólicos, tem-se ainda os chamados tocoferóis, encontrados recorrentemente em espécies vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas. Essa classe é dividida ainda em compostos da série tocóis que possuem cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis e compostos da série tocotrienóis que possuem cadeia insaturada (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 6- Estrutura química do tocotrienol e tocoferol⁶



Fonte: ANGELO; JORGE, 2007.

⁶ Imagem disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>

3.10 Determinação de compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu

Segundo Sá et al. (2012), a determinação de fenólicos totais é frequentemente determinada através do método de utilização do reagente folin-ciocalteu. Esse reagente é composto pela mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotungstúico onde o molibdênio e o tungstênio apresentam estado de oxidação +6 e quando entram em contato com agentes ditos redutores dão origem a formação de molibdênio e tungstênio azul, cujo estado de oxidação se encontra entre +5 e +6. A mudança de coloração é o que permite determinar-se a concentração de substâncias redutoras.

3.11 Inibidores de tirosinase

A tirosinase é a enzima que atua no processo de biossíntese da melanina, pigmento responsável por inferir algumas de nossas características físicas tais como a cor da pele e dos cabelos. A tirosinase é uma enzima que contém cobre e reconhece diversos compostos fenólicos como substrato, dando assim formação a um complexo enzimático cúprico-proteico (MIRANDA; CASTRO; SILVÉRIO, 2014).

A inibição da atividade dessa enzima pode ser alcançada por meio de agentes redutores que atuam na redução da dopaquinona dentre os quais estão incluídos o ácido ascórbico, e alguns compostos fenólicos que atuam como substratos alternativos para essa enzima, além de inativadores não específicos tais como ácidos ou base que desnaturam a enzima, ou ainda inativadores específicos para essa enzima como é o caso de substratos suicidas (FREITAS, 2015).

Os compostos inibidores e ativadores da tirosinase são de elevada importância em produtos farmacológicos e cosméticos, podendo ser empregados em medicamentos e cosméticos com ação clareadores quando atuantes como inibidores de tirosinase ou ainda atuarem na proteção da pele humana contra os raios-UV através da ação de ativadores de tirosinase (SILVÉRIO; CASTRO; MIRANDA, 2013).

3.12 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom é uma técnica muito utilizada devido sua fácil operação e baixo custo além de não exigir complexidade no preparo das amostras e nem necessitar de altas temperaturas e pressão. Essa técnica de extração baseia-se na ação de ondas mecânicas de baixa frequência que dão origem a formação e

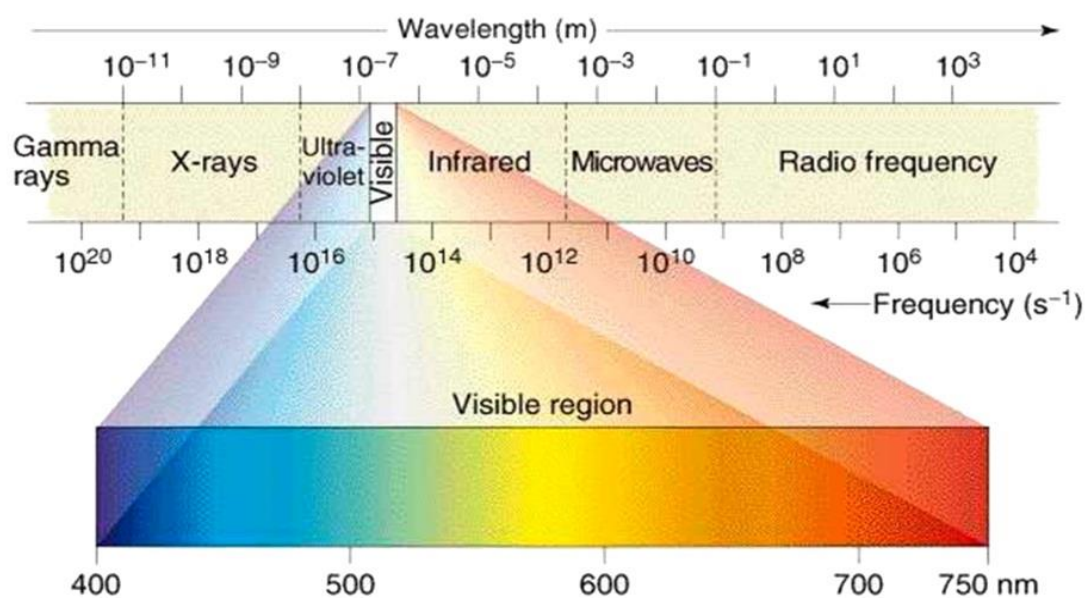
colapso de microbolhas que promovem alta pressão e temperatura em áreas pontuais na solução. Desse modo, promove uma maior facilidade de extração de elementos, quebra de células vegetais ou ainda a sedimentação de material particulado ou em suspensão (FERREIRA et al., 2014).

Alguns dos efeitos causados na matriz vegetal pelo uso de ultrassom estão relacionadas com a cavitação acústica que promovem uma maior facilidade de penetração do solvente na parede celular da matriz vegetal fazendo assim com que haja liberação do conteúdo presente dentro das células, além de que a agitação no solvente facilita o contato entre o solvente e o soluto, permitindo assim uma penetração mais eficiente do solvente na matriz vegetal. Com isso, conclui-se que a extração assistida por ultrassom possui muitas vantagens dentre as quais podemos destacar a redução de tempo de extração e de solvente ou ainda o fato de não precisar de altas temperaturas durante a extração evitando assim com que haja a degradação de determinados componentes presentes nos extratos (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2014).

3.13 Espectrofotometria UV-Visível

Dentre os métodos analíticos mais convencionais de determinações analíticas está a espectrofotometria visível e ultravioleta. Esse método é frequentemente utilizado para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos como, por exemplo, identificação de fármacos (LEMOS et al., 2009).

A região ultravioleta do espectro é representada na faixa de 200 a 400 nm, já a visível é encontrada na faixa de 400 a 800 nm. O pico de absorção pode apresentar correlação com o tipo de ligação existente na espécie analisada, já que a absorção da região visível e ultravioleta mantém uma relação de dependência com o número e arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes (LEMOS et al., 2009).

Figura 7- Espectro de radiação eletromagnética⁷

Fonte: Página do departamento de Química - UFMG

⁷ Imagem disponível em: <http://zeus.qui.ufmg.br/~qgeral/?author=1&paged=2>

4 METODOLOGIA

4.1 Material

O resíduo agroindustrial (torta de castanha-do-Pará) utilizado para a realização do trabalho foi cedido pela empresa Amazon Oil Industry, situada no município de Ananindeua, no estado do Pará.

Figura 8- Torta de castanha-do-Pará



4.2 Planejamento experimental

O extrato alcoólico da torta de castanha-do-Pará foi obtido através do método de extração por ultrassom com uso do solvente etanol. Foram utilizados diferentes parâmetros para a extração de compostos bioativos presentes na torta. Para isso, realizou-se um planejamento experimental fatorial 2^3 , levando-se em consideração as seguintes variáveis: Temperatura, Tempo e Razão soluto/solvente.

As variáveis utilizadas para a realização da extração de compostos bioativos presentes na torta de castanha-do-Pará foram descritas na tabela 1.

Tabela 1- Planejamento experimental: variáveis utilizadas na extração assistida por ultrassom de compostos bioativos da torta de castanha-do-Pará

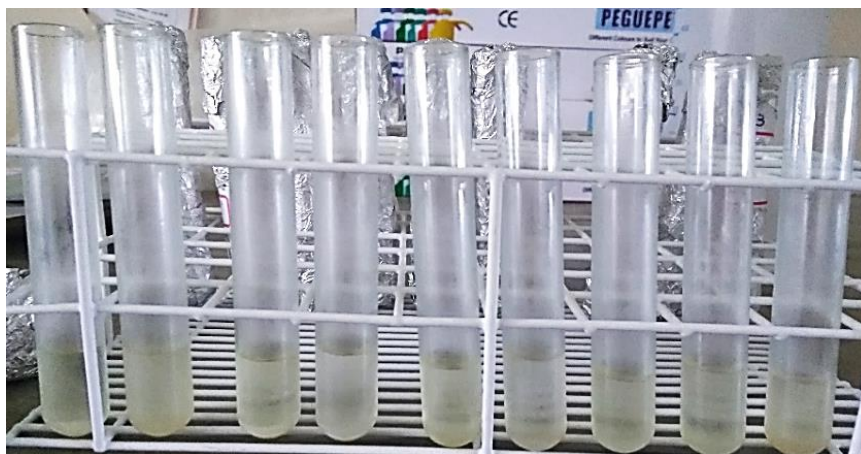
| Ensaio | Variável 1: temperatura (°C) | Variável 2: tempo (min) | Variável 3: razão (soluto/solvente) |
|---------------|---|------------------------------------|--|
| 1 | 40 | 5 | 1/10 |
| 2 | 40 | 5 | 1/4 |
| 3 | 40 | 15 | 1/10 |
| 4 | 40 | 15 | 1/4 |
| 5 | 60 | 5 | 1/10 |
| 6 | 60 | 5 | 1/4 |
| 7 | 60 | 15 | 1/10 |
| 8 | 60 | 15 | 1/4 |
| 9 | 50 | 10 | 1/7 |

4.3 Obtenção dos extratos

Inicialmente, pesou-se valores de massas de 0,50; 0,71 e 1,25g da torta de castanha-do-Pará para cada ensaio, correspondente as razões soluto/solvente delimitada pelo planejamento experimental fatorial 2³ (tabela 1) para um volume final de 5 mL de álcool etílico. Em seguida, cada mistura (torta de castanha/solvente) foi

submetida a extração em ultrassom nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e nos tempos de 5, 10 e 15 min, de acordo com a tabela 1. Com auxílio de uma seringa a qual fora acoplada algodão a ponta, realizou-se a filtração dos extratos que por fim foram armazenados em frascos âmbar sob refrigeração até o momento das análises.

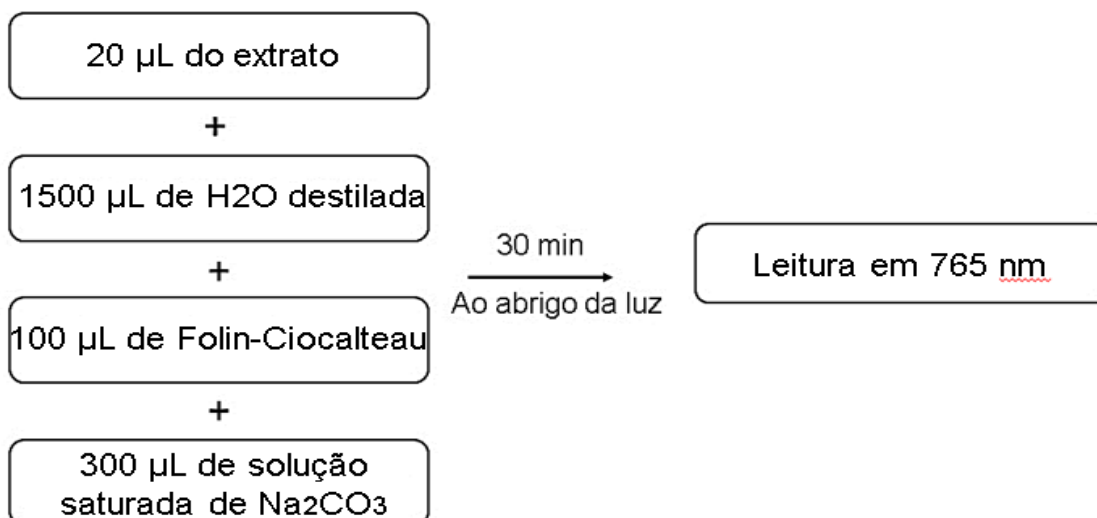
Figura 9- Extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará



4.4 Determinação de compostos fenólicos totais no extrato alcoólico da torta de castanha-do-Pará

A determinação do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará, deu-se conforme o fluxograma representado na figura 10.

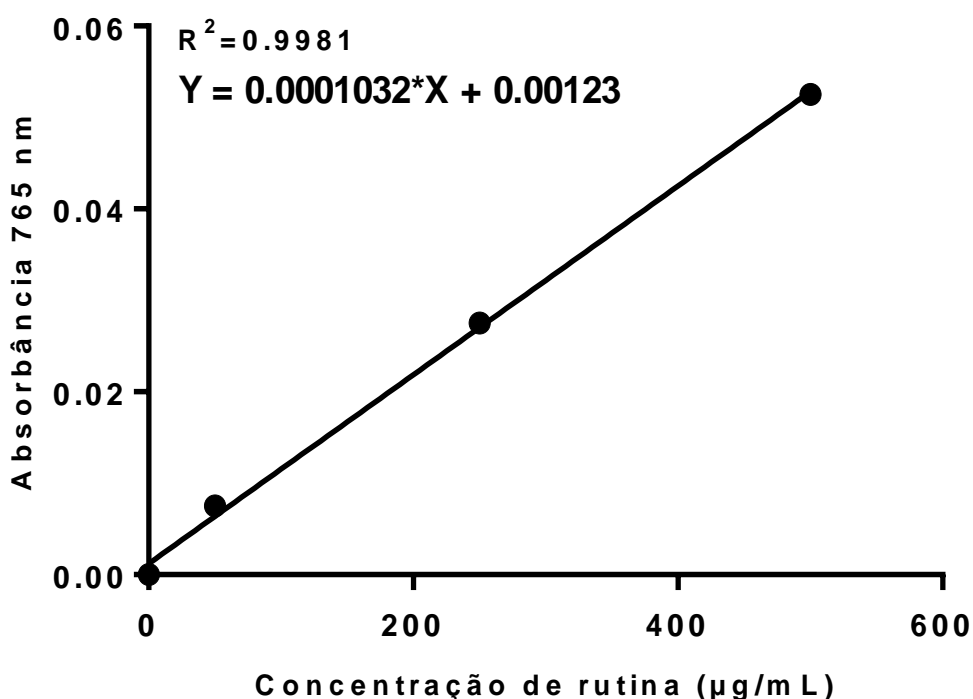
Figura 10- fluxograma da determinação de compostos fenólicos totais pelo método folin-ciocalteau



A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada através da metodologia descrita por Sperotto (2014), com modificações. Inicialmente, adicionou-se a tubos de ensaio 20 μL do extrato a ser analisado, 1500 μL de água destilada, 100 μL de Folin-Ciocalteu 1N e 300 μL de solução saturada de carbonato de sódio, em seguida, agitou-se em agitador vortex por 15 segundos e manteve-se a reação em ambiente escuro por 30 minutos. Após esse tempo, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV-Visível na faixa de 765 nm.

Para a quantificação do teor de fenólicos totais, foi plotado um gráfico da curva de calibração (figura 11) feita a partir de diferentes concentrações do padrão Rutina, de modo a obter-se a equação da reta necessária para calcular-se as concentrações das amostras.

Figura 11- Curva analítica para o padrão de Rutina



A partir das concentrações obtidas através da equação da reta e da leitura das absorbâncias para as amostras, foi possível determinar o teor de fenólicos totais através da equação representada no tópico 4.5.

4.5 Cálculo para a determinação do teor de fenólicos totais do extrato equivalente a rutina

$$\text{Teor de fenólicos totais} \left(\frac{\text{g}}{100\text{g}} \text{ de resíduo} \right) = \frac{C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times V(\text{mL}) \times 100}{m (\mu\text{g})}$$

Onde C representa a concentração do extrato, V o volume final da solução utilizado na extração e m representa a massa total de torta de castanha utilizada para a extração.

4.6 Ensaio de captura do óxido nítrico (NO*)

A determinação da ação antioxidante dos extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará por meio da ação de captura de NO, deu-se conforme o fluxograma representado na figura 12.

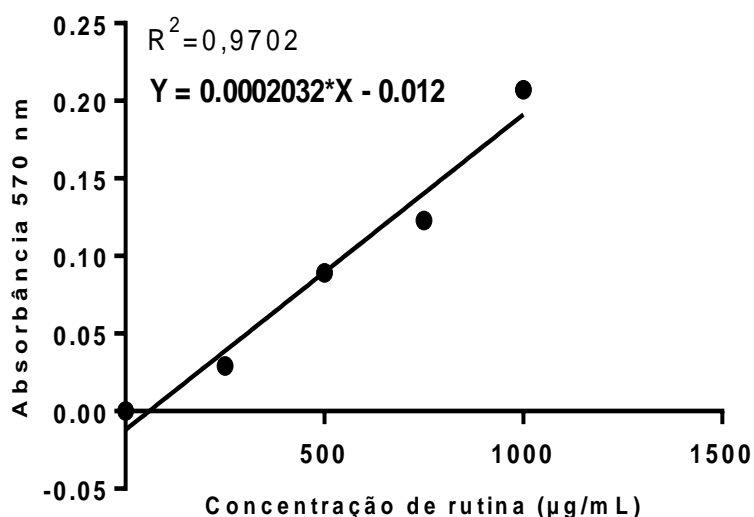
Figura 12- Fluxograma da determinação de atividade antioxidante pelo método de captura de NO



O efeito de captura do óxido nítrico foi medido de acordo com metodologia descrita por Rocha (2014), com adaptações. As análises foram realizadas em tampão PBS, pH 7.2 e Nitroprussiato de sódio 10 Mm. Foram adicionados em tubos de ensaio 300 µL dos diferentes extratos e 300 µL de Nitroprussiato de sódio em tampão PBS, e em seguida incubou-se os tubos contendo os extratos ao abrigo da luz por 90 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300 µL do reagente de Griess a cada tubo de ensaio e encubou-se novamente os tubos ao abrigo da luz por 15 minutos. Foi feito um ensaio para controle sem a adição de amostra. Por fim, realizou-se as leituras das absorvâncias no espectrofotômetro UV-Visível na faixa de 570 nm.

Na ação dos extratos estudados sobre o óxido nítrico foi determinado, através do gráfico da curva de calibração de ácido ascórbico (figura 13), o nível de NO* liberado na hidrólise do nitroprussiato de sódio em função da oxidação do reagente de Griess.

Figura 13- Curva padrão de ácido ascórbico



A partir das concentrações obtidas através da equação da reta representada na figura 13, e da leitura das absorbâncias para os extratos, foi possível determinar-se o poder de inibição de NO para as amostras.

4.7 Ensaio de inibição de tirosinase

A atividade de inibição de tirosinase para os extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará foi determinada por método espectrofotométrico conforme descrito por Khatib (2005), com adaptações. Foram preparadas 3 soluções: uma contendo 500 µL de tampão fosfato (pH 7,0), 2mL da tirosinase de cogumelo (270 U / mL) e 50 µL da amostra da solução com extrato etanólico da castanha do Pará, como amostras do teste. O segundo meio reacional contendo 500 µL de tampão fosfato (pH 7,0), 2 mL da tirosinase de cogumelo (270 U / mL) e 50 µL de etanol, para controle do experimento. A terceira solução contendo 500 µL de tampão fosfato (pH 7,0), 2mL da tirosinase de cogumelo (200 U / mL) e 50 µL de ácido Kójico (1000 ppm), como controle positivo. Após 5 minutos a 25°C, foram adicionados 100 µL de solução de L-tirosina. Após 20 minutos de reação a 25°C, a absorbância foi medida a 450 nm em

leitor automático de microplacas (Beckman Coulter, modelo DTX 800, Lagerhausstrasse - Austria). Para o branco do extrato foram preparadas amostras contendo solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), extrato de *M. nigra* e L-tirosina, substituindo a enzima pela solução tampão utilizada no ensaio, mantendo o mesmo volume final em todos os poços (200 μ L), com a finalidade de eliminar variações relacionadas à absorvância da coloração característica do extrato vegetal e variações relacionadas à absorvância da coloração de L-tirosina, mantendo o mesmo volume final em todos os poços (200 μ L), com a finalidade de eliminar variações relacionadas à absorvância da coloração característica do extrato vegetal e variações relacionadas à absorvância da coloração de L-tirosina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de compostos fenólicos totais

Os valores referentes ao teor de compostos fenólicos determinados pelo método folin-ciocalteau nos extratos foram descritos na tabela 2.

Tabela 2- Teor de compostos fenólicos totais em extratos etanólicos da torta de castanha

| Ensaio | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Razão soluto/solvente | Teor de fenólicos totais (gER/100g extrato) |
|--------|------------------|-------------|-----------------------|---|
| 1 | 40 | 5 | 1/10 | 0,45 ± 0,01 |
| 2 | 40 | 5 | 1/4 | 0,27 ± 0,01 |
| 3 | 40 | 15 | 1/10 | 0,61 ± 0,02 |
| 4 | 40 | 15 | 1/4 | 0,41 ± 0,01 |
| 5 | 60 | 5 | 1/10 | 0,39 ± 0,01 |
| 6 | 60 | 5 | 1/4 | 0,28 ± 0,01 |
| 7 | 60 | 15 | 1/10 | 0,62 ± 0,00 |
| 8 | 60 | 15 | 1/4 | 0,28 ± 0,07 |
| 9 | 50 | 10 | 1/7 | 1,05 ± 0,02 |

Na tabela 2 é mostrado o teor de fenólicos totais observados para os diferentes extratos obtidos a partir da torta de castanha-do-Pará. É possível observar que os extratos apresentaram um baixo teor de compostos fenólicos em sua composição, porém, os teores de fenólicos variaram significativamente entre os ensaios realizados, apresentando valores entre $0,27 \pm 0,01$ e $1,05 \pm 0,02$ g/100g ER para os ensaios 2 e 9, respectivamente.

Observa-se ao analisar a tabela que a variação de temperatura no geral não alterou significativamente o teor de fenólicos observados, diferindo dessa observação

apenas quando comparados o ensaio 4 e o ensaio 8, onde o teor de fenólicos apresentou uma queda significativa quando submetida ao aumento da temperatura de 60 °C, o que pode representar o início de uma degradação dos compostos fenólicos presentes nesse extrato.

Observa-se ainda que o aumento simultâneo do tempo e da razão soluto/solvente diminuiu o rendimento do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos. Com isso, dado que os ensaios 4 e 8 foram realizados em maior tempo e razão soluto/solvente, e que isso por si só acarretaria numa diminuição de rendimento, ao combinar-se esse fato ao aumento de temperatura que pode ocasionar a oxidação dos compostos fenólicos, há grandes chances de esses compostos terem sofrido degradação ocasionando uma diminuição no teor de fenólicos totais.

Nota-se também, que o teor de compostos fenólicos sofreu alterações significativas quando submetidos a diferentes razões de soluto/solvente, apresentando aumento considerável quando submetidos as condições de 1/10 e de 1/7, o que é compreensivo já que um volume maior de solvente em relação a amostra aumenta a eficiência de extração. SANTOS (2016), em seu estudo com cascas de pinhões, observou que o aumento na quantidade de sólidos para um mesmo volume de solvente acarretou em um efeito negativo para a resposta de fenólicos, o que segundo ele é explicado pelo fato de o aumento de sólidos tornar a mistura extratora menos fluida impedindo o solvente de atuar de maneira homogênea em todos os pontos.

Ao avaliar a influência do tempo de extração no teor de fenólicos totais, nota-se que o aumento do tempo contribui positivamente para o aumento da concentração de fenólicos nos extratos, o que era esperado já que o aumento no tempo de extração acarreta num maior período de contato entre o soluto e o solvente aumentando com isso a eficiência de extração dos compostos fenólicos. No entanto, ao combinar-se o aumento do tempo ao aumento da razão soluto/solvente simultaneamente, notou-se uma menor eficiência na extração desses compostos indicando novamente a interferência negativa do aumento da razão soluto/solvente para o rendimento.

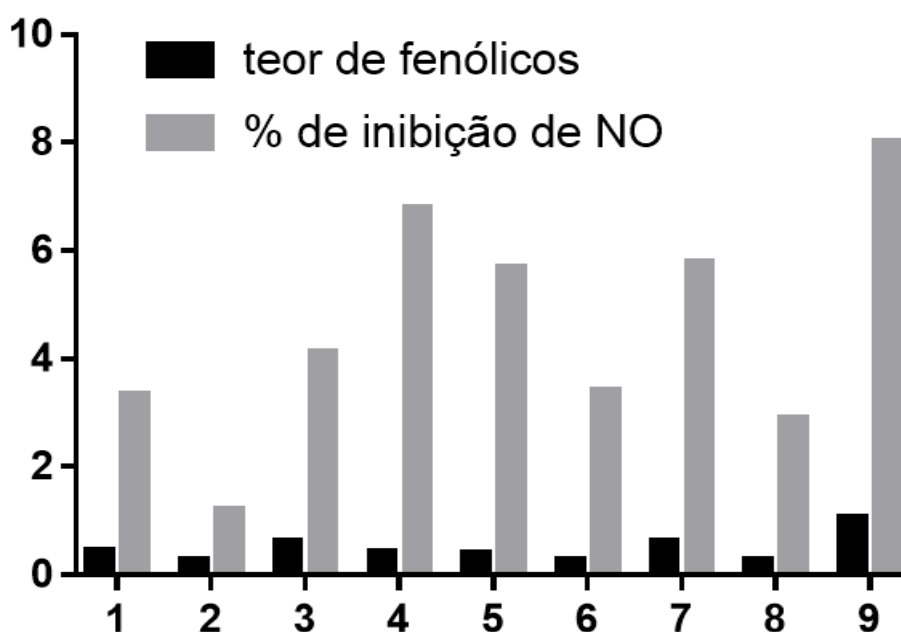
Com isso, dado que a temperatura por si só, não causou grandes alterações no rendimento de fenólicos, e que o aumento do tempo e a diminuição da razão soluto/solvente contribuíram positivamente na concentração final desses compostos, tanto quando avaliados separadamente quanto em sua relação quando mantidos a uma temperatura constante, pode-se dizer que os parâmetros mais indicados na extração desses compostos na torta de castanha-do-Pará, seria os observados no ensaio 9, onde a houve ligeiro aumento no tempo de extração e diminuição na razão soluto/solvente que quando combinados a temperatura de 50°C aumentaram consideravelmente o teor de fenólicos totais, sem provocar a degradação desses compostos presentes no extrato.

5.2 Atividade antioxidante por captura do óxido nítrico (NO*)

A partir das concentrações obtidas através da equação da reta e da leitura das absorbâncias para os extratos, foi possível determinar-se o poder de inibição de NO para os extratos.

A figura 14, representa graficamente a eficiência de inibição de NO e o teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará.

Figura 14- Representação gráfica da eficiência de inibição de NO e o teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará



Os resultados referentes a atividade antioxidante dos diferentes extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará por meio da ação de sequestro de óxido nítrico foram descritos na tabela 3.

Tabela 3- Percentual de sequestro de NO por extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará

| Ensaio | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Razão soluto/solvente | % inibição de NO |
|---------------|-------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1 | 40 | 5 | 1/10 | 3,34± 0,11 |
| 2 | 40 | 5 | 1/4 | 1,20± 0,45 |
| 3 | 40 | 15 | 1/10 | 4,13± 0,24 |
| 4 | 40 | 15 | 1/4 | 6,78± 0,78 |
| 5 | 60 | 5 | 1/10 | 5,68± 0,82 |
| 6 | 60 | 5 | 1/4 | 3,40± 0,56 |
| 7 | 60 | 15 | 1/10 | 5,78± 0,94 |
| 8 | 60 | 15 | 1/4 | 2,90± 0,32 |
| 9 | 50 | 10 | 1/7 | 8,00± 0,97 |

Os ensaios apresentaram percentuais de inibição de NO iguais ou inferiores a 8%, logo, a eficiência de captura de óxido nítrico pelos extratos foi pequena, indicando uma baixa atividade antioxidante na torta de castanha-do-Pará. Essa ocorrência pode ter relação com a baixa concentração de fenólicos observados para os extratos conforme demonstrado na figura 14, já que esses compostos contribuem

positivamente para a ação antioxidante da castanha-do-Pará. Castro (2012) em estudo sobre atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras, observou uma baixa atividade de sequestro de óxido nítrico, com percentuais de inibição nulos ou inferiores a 50% para as amostras de frutas analisadas, e justificou o fato a grande instabilidade do radical óxido nítrico, que dificulta a captura do mesmo, o que desse modo pode ter contribuído também para os baixos percentuais de captura de óxido nítrico encontrados para os extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará.

A partir dos dados descritos na tabela 3, nota-se que a capacidade antioxidante por meio da ação de sequestro de NO, dos diferentes extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará variaram entre si, apresentando valores de inibição de NO entre 1,2% para o ensaio 2 e 8,0 % para o ensaio 9. Os ensaios 4 e 9 foram os que apresentaram as maiores capacidades antioxidantes frente ao radical óxido nítrico, apresentando percentuais de inibição de NO de 6,78 e 8,0 %, respectivamente.

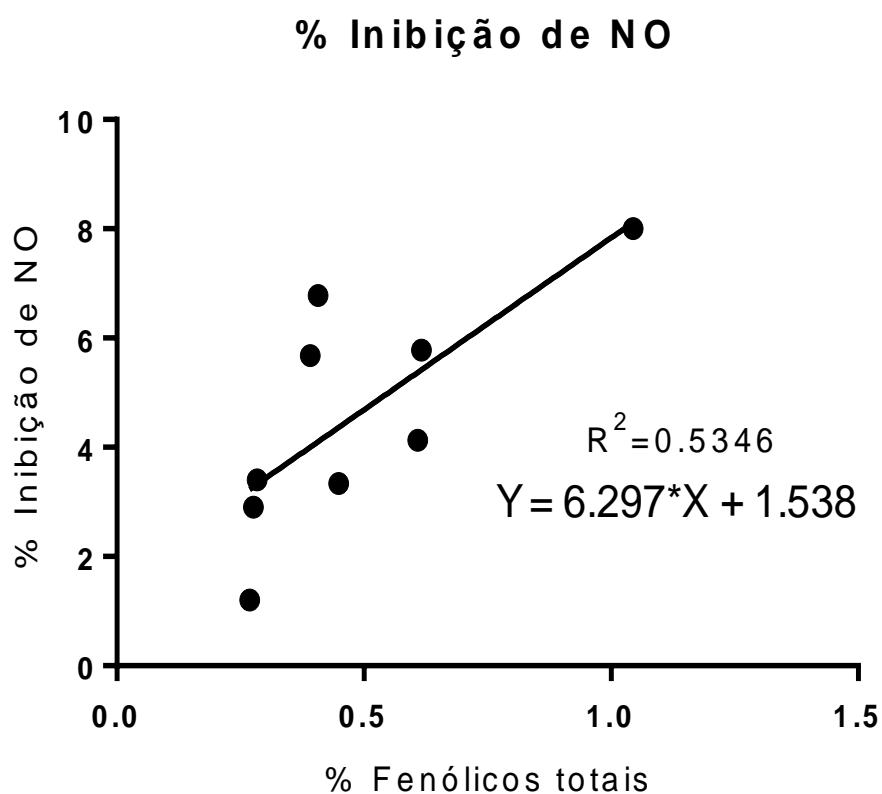
A interferência das variáveis tempo, razão e temperatura sobre a atividade antioxidante determinada pelo método de sequestro de NO foi avaliada para cada ensaio. Notou-se que em média o aumento da temperatura e do tempo contribuíram positivamente na capacidade de inibição de NO pelos extratos, enquanto que o aumento da razão soluto/solvente contribui negativamente. Quando comparados em sua relação, notou-se que ao aumentar-se a relação tempo e razão, e temperatura e razão houve diminuição no percentual de inibição de NO, enquanto que para o aumento da relação tempo e temperatura ocorreu um aumento desse percentual. Com isso, conclui-se que a extração mais eficiente seria aquela submetida a um maior tempo e temperatura e uma menor razão soluto/solvente o que explica o percentual mais elevado encontrado para os ensaios 4 e 9.

O gráfico representado na figura 15 foi plotado com o intuito de verificar a correlação existente entre o teor de fenólicos totais e o percentual de captura de NO encontrados para os extratos alcoólicos de torta de castanha-do-Pará.

Ao observar-se o gráfico representado na figura 15, nota-se que o mesmo apresentou um $R^2=0,5346$ evidenciando que não houve correlação entre o teor de fenólicos totais presentes nos extratos da torta de castanha e seu potencial antioxidante frente ao sequestro de NO. Isso pode ser explicado pelo fato de que, embora a atividade antioxidante tenha grande contribuição do teor de fenólicos

encontrados na castanha-do-Pará, há outros constituintes que também contribuem para esta ação tais como as vitaminas C, E, beta-caroteno e o selênio que são considerados bons agentes antioxidante, podendo atuar como bons sequestrantes de radicais livres.

Figura 15- Gráfico de correlação entre teor de compostos fenólicos e atividade de sequestro de NO



5.3 Atividade de inibição de tirosinase

Os resultados referentes a atividade de inibição de tirosinase dos diferentes extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará foram descritos na tabela 4.

Tabela 4- Percentual de atividade inibitória de tirosinase de extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará

| Ensaio | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Razão soluto/solvente | % inibição de tirosinase monofenolase (Tyrosina) | % inibição de tirosinase Difenolase (L-Dopa) |
|---------------|-------------------------|--------------------|------------------------------|---|---|
| 1 | 40 | 5 | 1/10 | 11,58± 0,09 | 4,37± 0,66 |
| 2 | 40 | 5 | 1/4 | 10,88± 0,75 | 18,45± 0,77 |
| 3 | 40 | 15 | 1/10 | 13,51± 0,82 | 9,97± 0,39 |
| 4 | 40 | 15 | 1/4 | 4,50± 0,06 | 24,45± 0,88 |
| 5 | 60 | 5 | 1/10 | 24,06± 0,07 | 24,77± 0,75 |
| 6 | 60 | 5 | 1/4 | 17,99± 0,92 | 18,88± 0,70 |
| 7 | 60 | 15 | 1/10 | 25,09± 0,73 | 16,75± 0,86 |
| 8 | 60 | 15 | 1/4 | 19,10± 0,94 | 16,82± 0,77 |
| 9 | 50 | 10 | 1/7 | 3,33± 0,36 | 4,95± 0,97 |

Ao observar-se a tabela 4, nota-se que os extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará apresentaram um baixo percentual de inibição de tirosinase por parte das amostras de extrato alcoólico da torta de castanha-do-Pará, no entanto, esses valores variaram significativamente entre si, apresentando valores entre 4,50 e 25,09 % de inibição da tirosinase monofenolase (Tyrosina) e valores entre 4,37 e 24,77 % para tirosinase difenolase (L-DOPA).

Miranda; Castro; Silvério (2014), ao avaliarem a atividade de inibição da tirosinase em extratos etanólicos de folhas de jatobá, observaram um percentual de inibição de 48% para os extratos o que é considerado baixo e uma completa inibição da enzima pelo ácido kójico e concluíram que, dado que o ácido kójico é uma substância com poder inibitório do tipo incompetitivo, ou seja, age como quelante de cobre, a inibição da enzima apresentada no extrato etanólico das folhas não ocorreram por ação de inibidores incompetitivos por quelação de cobre.

Fatores como o baixo percentual de fenólicos encontrados poderiam ter contribuído para os baixos percentuais de inibição de tirosinase, no entanto, dado que não houve uma correlação expressiva entre eles (figuras 16 e 17), conclui-se que outras substancias pertencentes a outras classes de metabolitos presentes na torta de castanha-do-Pará possam estar relacionadas a ação de inibição de tirosinase nos extratos.

Os gráficos representados nas figuras 16 e 17 foram plotados com o intuito de verificar a correlação existente entre o teor de fenólicos totais e o percentual de inibição de tirosinase monofenolase (Tyrosina) e difenolase (L-Dopa), respectivamente, encontrados para os extratos alcoólicos de torta de castanha-do-Pará.

Figura 16: Gráfico de correlação entre teor de compostos fenólicos e o percentual de inibição de tirosinase monofenolase (Tyrosina)

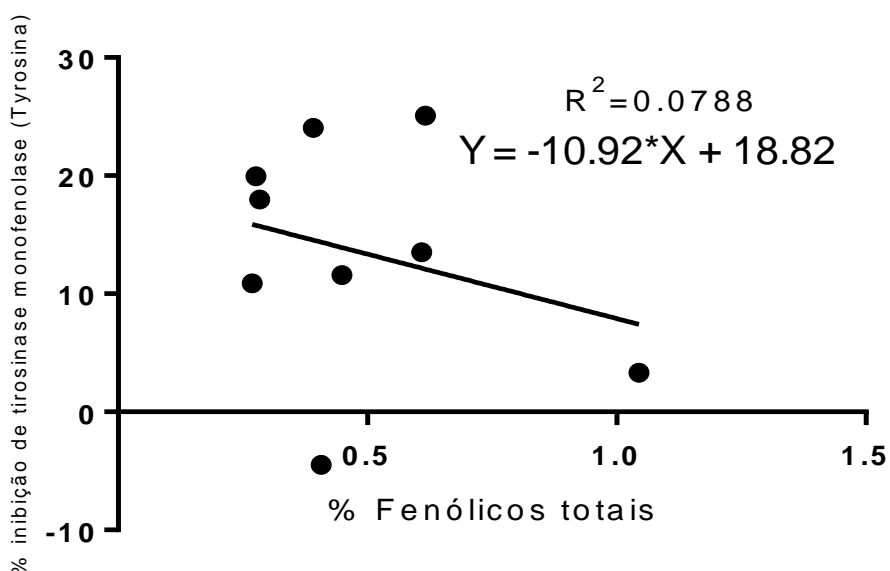
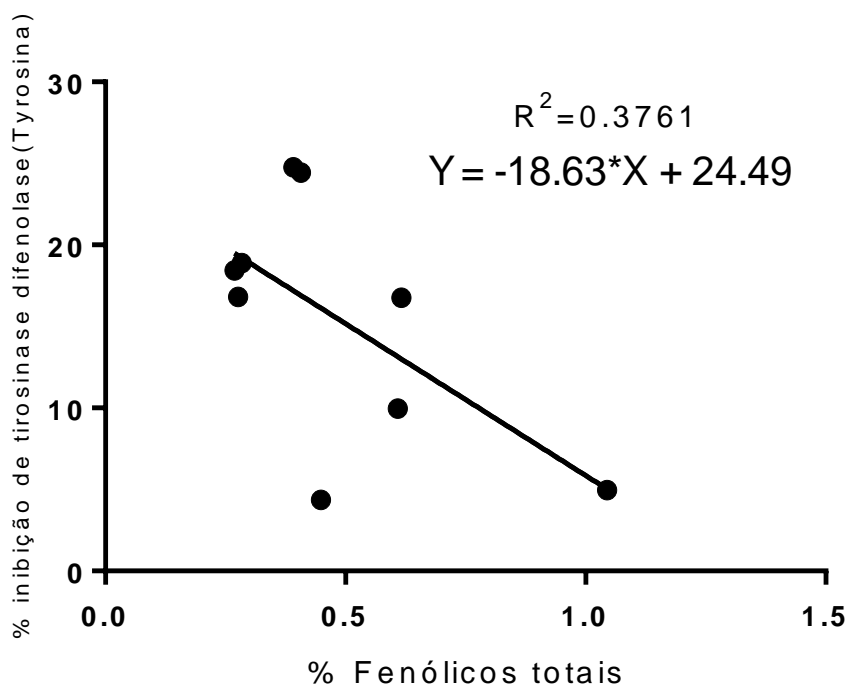


Figura 17: Gráfico de correlação entre teor de compostos fenólicos e o percentual de inibição de tirosinase difenolase (L-DOPA)



Ao observar-se os gráficos, da relação entre o teor de fenólicos totais e o percentual de inibição de tirosinase monofenolase (Tyrosina) e difenolase (L-Dopa) representados nas figuras 16 e 17, respectivamente, nota-se que ambos não apresentaram correlação com o teor de compostos fenólicos observados.

A não correlação encontrada pode ser explicada pelo fato de que, apesar de os compostos fenólicos, segundo Vieira et al. (2015), serem responsáveis por parte da ação de agentes despigmentantes, por conta de sua estrutura química que apresentam compostos que se assemelham ao da tirosina, tem-se outros compostos que também atuam como agentes inibidores de tirosinase como por exemplo os lipídios de cadeia longa tais como os triacilgliceróis que revelam um poder inibitório equivalente ao do ácido Kójico (LOPES, 2015). Tendo em vista que a torta de castanha é um resíduo proveniente da extração do óleo da castanha-do-Pará, e que este ainda apresenta em sua composição resquícios desse óleo, isso pode implicar na presença triacilgliceróis nos extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará o que pode ter influenciado na capacidade de inibição de tirosinase por parte dos extratos analisados.

6 CONCLUSÃO

Ao analisar o delineamento experimental, concluiu-se que a temperatura não interferiu significativamente no teor de fenólicos totais extraídos e que o aumento do tempo e a diminuição da razão soluto/solvente contribuíram positivamente na concentração final desses compostos, com isso, verificou-se que os parâmetros mais indicados para a extração desses compostos na torta de castanha-do-Pará, foram os utilizados no ensaio com temperatura de 50 °C no tempo de 10 minutos e razão soluto/solvente de 1/7.

Os resultados mostraram que os extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará apresentaram baixos teores de fenólicos totais, porém com diferenças consideráveis entre os teores obtidos para os extratos, apresentando valores entre $0,27 \pm 0,01$ e $1,05 \pm 0,02$ g/100g ER.

Os ensaios apresentaram percentuais de inibição de NO iguais ou inferiores a 8%, logo, a eficiência de captura de óxido nítrico pelos extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará foi pequena, indicando uma baixa atividade antioxidante na torta de castanha-do-Pará.

. Os resultados deste trabalho mostraram que os extratos alcoólicos da torta de castanha-do-Pará, também apresentaram um baixo percentual de inibição de tirosinase. No entanto, esses valores variaram significativamente entre si, apresentando resultados entre 4,50 e 25,09 % de inibição da tirosinase monofenolase (Tyrosina) e valores entre 4,37 e 24,77% para tirosinase difenolase (L-DOPA).

Por fim, o estudo de correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e as porcentagens de captura de NO e inibição de tirosinase para os extratos etanólicos da torta de castanha-do-Pará mostraram-se negativas, indicando que não há correlação entre eles.

Como sugestão para continuidade deste trabalho propõe-se realizar o monitoramento e isolamento das substâncias presentes na torta de castanha-do-Pará que possam apresentar potencial antioxidante e inibitório de tirosinase, pertencentes as outras classes de metabolitos. Além disto, sugere-se também que seja feita a realização de um estudo com o óleo da castanha-do-Pará para a verificação do

potencial da atividade antioxidante desse óleo frente a captura do radical NO, complementando os resultados, outra sugestão é que seja feita também a utilização do solvente hexano para a verificar o potencial antioxidante e inibitório de tirosina

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, José Jonas. **Os Primórdios da Exploração Comercial da Castanha-do-Pará**. Disponível em: <http://www.encontro2016.sp.anpuh.org/resources/anais/48/1467738721_ARQUIVO_OsPrimordiosdaExploracaodaCastanha-do-Para.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2018.

AMAZON OIL INDUSTRY. **Castanha do Pará**. 2018. Disponível em: <<https://www.amazonoil.com.br/castanha-do-para/>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, 2007. Disponível em < <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>>. Acesso em 15 dez. 2018.

BALBI, M. E. et al. Castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* Bonpl.): composição química e sua importância para saúde. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 2, p.51-63, jun. 2014. ISSN 1518-8361.

CASTRO, Juliana Fernanda Almeida. **Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

COSTA, Renata dos Santos Oliveira; BARROS, Valéria Araújo. **Busca por frações com potencial antirradicalar do resíduo agroindustrial da andiroba da Coopemaflima, Região Marajó-Pará**. 2015. 79 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

COSTA, Tainara; JORGE, Neuza. Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes. **Unopar Cient Ciênc Biol Saúde**, São Paulo, v. 13, n. 3, p.195-203, mar. 2011.

DALGÊ, Jéssica Jamila. **Estudo da capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-hemolítica do gengibre (*Zingiber officinale*)**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências da engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo, 2014.

Decker E.A., Chen B., Panya A., Elias R.J., 10 - Understanding antioxidant mechanisms in preventing oxidation in foods, Editor(s): Eric A. Decker, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications, Woodhead Publishing, 2010, Pages 225-248, ISBN 9781845696481, <https://doi.org/10.1533/9780857090447.2.225>.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan - Jun/2004.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 14, p. 389-399, 2012.

DIAS, Tiago et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfogenéticos. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.782-787, maio 2015. (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140098>.

FERREIRA, Bruno Luís et al. Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.236-242, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.1514>.

FREITAS, Marcela Medeiros de Freitas. **Obtenção de extratos padronizados em ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina a partir de folhas de Morus nigra L.: inibição de tirosinase e citotoxicidade.** 2015. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências da saúde, Brasília, conferido pela Universidade de Brasília. 2015.

KARLING, Mariéli. **Isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante do coproduto bagaço de uva.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.

KHATIB, S.; NERYA, O.; MUSA, R.; SHMUEL, M.; TAMIR, S.; VAYA, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 433-441, 2005.

LEMOS, A. M. et al. **Espectroscopia visível e ultravioleta**. Rio Grande do Sul, 2009.

LIMA, Cibele Rosana Ribeiro de Castro. **Identificação de ácidos graxos presentes no óleo de castanha do Brasil em emulsões cosméticas**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LOPES, Ana Alexandra Santos. **Inibidores de tirosinase e novas técnicas laboratoriais de separação de produtos naturais bioativos**. 2015. 44 f. Tese (Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2015.

MACRINI, Daclé Juliani. **Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto à atividade inibitória da tirosinase**. 2004. 64 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MARTINS, Lilliane; SILVA, Zenobio Perelli Gouveia e; SILVEIRA, Breno Carrillo. **PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DA CASTANHA DO BRASIL (BERTHOLLETIA EXCELSA, H.B.K) NO ESTADO DO ACRE- BRASIL, 1998-2006**, Rio Branco. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (Castanha-do-pará, castanha, castanha-do-brasil, *Bertholletia excelsa* H.B.K.) / Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília: MAPA/ACS, 2014. 41 p. (Série: Cadernos de Boas Práticas para o Extrativismo Sustentável Orgânico)

MIRANDA, A.R; CASTRO, C.F.S.; SILVÉRIO, M.D.O.. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 16, n. 31, p.693-699, 2014. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_035.

ROCHA, Maria Isabel Póvoa. **Salt marsh plants as source of bioactive compounds**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Algarve, Faro, 2014.

SÁ, Pedro Guilherme Sousa de et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Francisco, v. 33, n. 4, p.561-566, 2012.

SANTOS Jorge Luís Oliveira. **Estratégias analíticas para determinação de nitrito e nitrato em matrizes ambientais e alimentícias, empregando análise de imagens digitais**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013

SANTOS, Carlos Henrique Koslinski. **Otimização multiobjetivo da extração de antioxidantes do resíduo da casca de pinhão (*araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze)**. 2016. 50 p. dissertação (mestre em Tecnologia de Alimentos) Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, CAMPO MOURÃO, 2016.

SANTOS, Orquídea Vasconcelos dos. **Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos**.2012. 214 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA JÚNIOR, Ediu Carlos da. **SELÊNIO NA CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*) E EM SOLOS DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SILVA, Adriano Araújo et al. Potencial do Extrativismo da Castanha-do-Pará na Geração de Renda em Comunidades da Mesorregião Baixo Amazonas, Pará. **Floresta e Ambiente**, [s.l.], v. 20, n. 04 p.500-509, 2013. <http://dx.doi.org/10.4322/floram.2013.046>.

SILVA, Camila da; GARCIA, Vitor Augusto dos Santos; FRANCISCATO, Lidaiane Mariah Silva dos Santos. Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Lichia Peels (*Litchi Chinensis* Sonn.). **Ciências Exatas e Naturais**, Umuarama, v. 18, n. 1, p.81-96, 2016.

SILVÉRIO, M.D.O; CASTRO, C.F.S; MIRANDA, A. R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Rev. Bras. Pl. Med**, Rio Verde, v. 15, n. 1, p.59-65, 2013.

SOUZA, Maria Luzenira de; MENEZES, Hilary Castle de. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.120-128, mar. 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612004000100022>.

SPEROTTO, Raul Antonio. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. 1 ed.lajeado: univates, 2014. 329 p.

STAHL, Juliana Marin. **Análise de compostos fenólicos de 10 variedades de uva**. 2011. 25 f. Monografia (TCC) - Curso de Ciências Biológicas, UNESP, Botucatu, 2011.

VERAS filho, J.; AMARAI, A.; AMORIM, E.L.C. **Castanha-do-pará: alimento ou medicamento?** 2007. disponível em: < <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/7/7-464-448.htm> >. Acesso em: 05 dez. 2018.

VIEIRA, L. M. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.521-527, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/13_033.

WADT, Lúcia Helena de Oliveira. **Manejo da Castanheira (*Bertholletia excelsa*) para Produção de Castanha-do-brasil**/Secretaria de extrativismo e produção familiar. - 2005. 42p (Seprof. Documento Técnico, 3).