

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

Déborah Cristina Barcelos Flores

DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE INGÁ (*Inga marginata* Willd), POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE

**Santa Maria, RS
2020**

Déborah Cristina Barcelos Flores

DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE INGÁ (*Inga marginata* Willd), POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Claudia Severo da Rosa

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Flores, Déborah Cristina Barcelos
DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE INGÁ (*Inga marginata* Willd), POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE / Déborah Cristina Barcelos Flores.- 2020.
99 f.; 30 cm

Orientador: Claudia Severo da Rosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2020

1. Toxicidade 2. Extração Convencional 3. Micro-ondas
4. Ultrassom 5. Compostos Fenólicos I. Severo da Rosa, Claudia II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFESM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

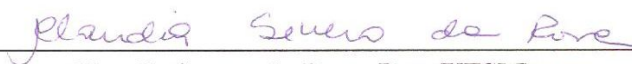
Declaro, DÉBORAH CRISTINA BARCELOS FLORES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Déborah Cristina Barcelos Flores

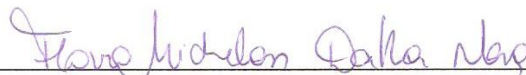
DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE INGÁ (*Inga marginata* Willd), POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

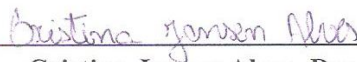
Aprovado em 2 de março de 2020:



Claudia Severo da Rosa, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Flávia Michelin Dalla Nora, Dra (UFSM)



Cristina Jansen Alves, Dra (UFPEL)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer a Deus pela dádiva da vida, por essa grande conquista, por ter essa oportunidade de realizar esse sonho. Por sempre estar comigo abençoando meu caminho, pela força e motivação de não desistir dos meus estudos, me guiando ao longo dessa jornada.

À minha família, meus pais José Vilmar e Mara Cristina por todo amor incondicional, pelo apoio em meus estudos, por serem meus melhores amigos e companheiros, por me ajudarem em todos os momentos, sou muito grata a vocês por tudo que me ensinaram e pelo carinho, por sempre me encorajarem a lutar pelos meus sonhos, o meu muito obrigada, amo vocês. Agradeço a minha irmã Julia, pelo incentivo em meus estudos, amor e compreensão.

Agradeço muito especialmente ao amor da minha vida, meu noivo Tiago Righi, meu melhor amigo para todas as horas, te agradeço por ter me ajudado muito, sempre me apoiando principalmente em meus estudos, me incentivando todos os dias a crescer profissionalmente e pessoalmente, obrigada por ser meu porto seguro, a me ajudar a realizar esse sonho junto comigo, te amo muito eternamente, minha vida.

A todos os meus familiares e amigos que torceram por mim ao longo desta caminhada, em especial aos meus amigos e irmãos do coração Daieli e Cristian que me ajudaram muito, principalmente na hora que mais precisei, agradeço muito a vocês por fazerem parte dessa conquista.

À minha querida orientadora Professora Dra. Cláudia Severo da Rosa, por todo apoio, ajuda e orientação ao longo dessa jornada, por confiar em mim e no meu trabalho, por todas as palavras de incentivo, pela força e amizade, agradeço imensamente por tudo que me ensinou. Obrigada pela sua dedicação nesse trabalho e confiança em mim.

Às professoras membros da banca Dra. Flávia Michelon Dalla Nora e Dra. Cristina Jansen Alves, por compor essa banca, pelas valiosas considerações e sugestões para essa dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, em especial Magé, Marialene e Ricardo, pela amizade e pela ajuda com os materiais.

À minha querida amiga e companheira de todos os momentos Caroline Boeira, por todos seus esforços em me ajudar, por todos os teus ensinamentos, por sua amizade verdadeira, o meu eterno agradecimento. Te agradeço pela força, pelo seu bom humor todos os dias e pelo seu carinho de amiga, devo muito a você, obrigada.

Ao Laboratório de Química do Departamento de Química, ao Herbário do Departamento de Biologia, e ao Laboratório de Farmácia do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria, pela parceria e comprometimento para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de Mestrado.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram e fizeram parte dessa grande conquista, o meu muito obrigada.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE INGÁ (*Inga marginata* Willd), POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE

AUTORA: Déborah Cristina Barcelos Flores

ORIENTADORA: Claudia Severo da Rosa

A associação entre a ingestão de frutos com um estilo de vida saudável reduz muitos tipos de doenças, inclusive as degenerativas devido aos compostos bioativos presentes. O Ingá é considerado um fruto abundante em diversos ambientes, e sabe-se que possui compostos bioativos como os compostos fenólicos (flavonoides como antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas. Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes. Desta forma, este trabalho teve como objetivo determinar os compostos bioativos obtidos por diferentes métodos de extração, além disso foi feita a caracterização do perfil químico e a citotoxicidade da fração casca e polpa e da semente do Ingá. Foi analisada a toxicidade dos extratos na linhagem celular 3T3 pela viabilidade celular através dos testes MTT e NRU. Os extratos hidroetanólicos foram preparados a 70% (v/v) para a extração dos compostos bioativos por extração convencional, ultrassom e micro-ondas focalizado. Foram realizadas as análises de compostos fenólicos totais, flavonoides, DPPH (IC₅₀) e ORAC, avaliando o tempo e temperatura, e a identificação do perfil químico por espectrometria de massas ESI-TOF-MS. O extrato da fração casca e polpa do Ingá em todas as concentrações não foi citotóxico, já o extrato da semente apresentou toxicidade para os dois testes, diante disso a pesquisa foi realizada somente com os extratos da casca e polpa. O extrato obtido através da extração convencional apresentou maior teor de fenólicos totais, flavonoides e maior capacidade antioxidante na condição de 60 °C por 5 minutos. A temperatura teve efeito significativo para todas as determinações já o tempo apresentou efeito significativo somente para a determinação de flavonoides, havendo interação entre o tempo e temperatura. Para a extração por ultrassom, a melhor condição foi na temperatura de 60 °C por 5 minutos, no qual foram obtidos maiores teores dos compostos bioativos. A temperatura teve efeito significativo, o tempo somente teve efeito e interação com a temperatura na determinação dos flavonoides. O extrato obtido pela extração por micro-ondas focalizado apresentou maior teor de fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante na condição de 60 °C por 25 minutos. Neste método de extração, à medida que o tempo e a temperatura foram elevados, maior foi o teor dos compostos extraídos, apresentando efeito significativo e interação entre as variáveis para os fenólicos totais. Além da determinação dos compostos bioativos, foram também caracterizados os extratos obtidos por diferentes métodos de extração, sendo que na extração convencional foram identificados 7 compostos, na extração por ultrassom e micro-ondas focalizado foram encontrados 11 compostos iguais, independentemente do método. Nesse sentido, pode-se inferir que, a fração casca e polpa de Ingá é boa fonte de compostos bioativos com ação antioxidante, sendo de grande interesse na extração destes compostos para aplicação em produtos alimentícios, além de contribuir na redução de resíduos.

Palavras-chave: Toxicidade. Extração Convencional. Micro-ondas. Ultrassom. Tempo e temperatura. Antioxidante. Compostos Fenólicos.

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOACTIVE INGA COMPOUNDS (*Inga marginata* Willd) BY DIFFERENT METHODS OF EXTRACTION, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CYTOTOXICITY

AUTHOR: Déborah Cristina Barcelos Flores

ADVISOR: Dra. Claudia Severo da Rosa

The association between fruit ingestion and a healthy lifestyle reduces many types of diseases including degenerative ones, due to the bioactive compounds present. Ingá is considered an abundant fruit in several environments and it is known to have bioactive compounds such as phenolic compounds (flavonoids such as anthocyanins, flavonols and their derivatives), phenolic acids (benzoic, cinnamic acids and their derivatives) and coumarins. Among phenolics, flavonoids, phenolic acids, tannins and tocopherols stand out as the most common antioxidants. Thus, this work aimed to determine the bioactive compounds obtained by different extraction methods, in addition to the characterization the chemical profile and the cytotoxicity of the shell and pulp fraction, and the Ingá seed. The toxicity of the extracts in the 3T3 cell line was analyzed by cell viability through MTT and NRU tests. The hydroethanolic extracts were prepared at 70% (v/v) for the extraction of bioactive compounds by conventional extraction, ultrasound and focused microwave. Analysis of total phenolic compounds, flavonoids, DPPH (IC₅₀) and ORAC were performed, evaluating the time and temperature, and the identification of the chemical profile by ESI-TOF-MS mass spectrometry. The extract of the peel and pulp fraction of Ingá in all concentrations was not cytotoxic, since the seed extract showed toxicity for both tests, therefore, the research was carried out only with the extracts of the peel and pulp. The extract obtained through conventional extraction had a higher content of total phenolics, flavonoids and greater antioxidant capacity at 60 °C for 5 minutes. The temperature had a significant effect for all determinations, while time had a significant effect only for the determination flavonoids, with an interaction between time and temperature. For ultrasound extraction, the best condition was at a temperature of 60 °C for 5 minutes, in which higher levels of bioactive compounds were obtained. Only temperature had a significant effect, time only had an effect and interaction with temperature in determining flavonoids. The extract obtained by the focused microwave extraction showed a higher content of total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity at 60 °C for 25 minutes. In this extraction method, as the time and temperature increased, the content of the extracted compounds increased, presenting a significant effect and interaction between the variables for the total phenolics. In addition to the determination of the bioactive compounds, the extracts obtained by different extraction methods were also characterized, and in the conventional extraction 7 compounds were identified, in the extraction by ultrasound and focused microwave extraction 11 equal compounds were found, regardless of the method. In this sense, it can be inferred that the Ingá peel and pulp fraction is a good source of bioactive compounds with antioxidant action, being of great interest in the extraction of these compounds for application in food products, in addition to contributing to the reduction of waste.

Keywords: Toxicity. Conventional Extraction. Microwave. Ultrasound. Time and Temperature. Antioxidants. Phenolic Compounds.

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

Tabela 1 - Planejamento experimental 2 ² , variando tempo e temperatura.....	34
Tabela 2- Estimativa do IC ₅₀ de citotoxicidade de amostras de Ingá (fração casca e polpa e da semente), pelo teste MTT e NRU.	40
Tabela 3- Teor de fenólicos totais, DPPH, capacidade inibitória (IC ₅₀), e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC) do extrato da fração casca e polpa.	41
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA), e teste de falta de ajuste para flavonoides totais..	46
Tabela 5- Identificação dos principais compostos bioativos da fração casca e polpa de <i>Inga marginata</i> Willd por ESI-TOF-MS, modo positivo e negativo de identificação.	48

Manuscrito 2

Tabela 1- Planejamento experimental (2 ²) utilizado nas extrações dos compostos bioativos do Ingá obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizado.	61
Tabela 2- Compostos fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH, capacidade inibitória (IC ₅₀), e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC) dos extratos obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizado.....	65
Tabela 3- ANOVA, teste de falta de ajuste para compostos flavonoides totais por ultrassom..	70
Tabela 4- ANOVA, teste de falta de ajuste para os compostos fenólicos totais por micro-ondas focalizado.	76
Tabela 5- Identificação dos principais compostos bioativos das cascas e polpas de <i>Inga marginata</i> Willd por ESI-TOF-MS, pelos dois métodos de extração (ultrassom e micro-ondas) modo positivo e negativo de identificação.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore (A) com flores (B) de Ingá (<i>Inga marginata</i> Willd).	16
Figura 2: Fruto de (<i>Inga marginata</i> Willd).	16
Figura 3: Partes do fruto Ingá casca (A), polpa (B) e semente (C) separadas (<i>Inga marginata</i> Willd).	17
Figura 4: Extração convencional com chapa de aquecimento e agitação.	19
Figura 5: Banho de ultrassom (A). Extração de compostos bioativos do Ingá por ultrassom (B).	20
Figura 6: Equipamento (micro-ondas focalizado).	22
Figura 7: Equipamento, caracterização por ESI-TOF-MS.	24
Figura 8: Linhagens celulares 3T3 (Fibroblastos murinos).	26

Manuscrito 1

Figura 1: Avaliação da atividade citotóxica da fração casca e polpa do <i>Inga marginata</i> pelo teste MTT e NRU, por 24 horas em diferentes concentrações da amostra	38
Figura 2: Avaliação da atividade citotóxica das sementes do <i>Inga marginata</i> pelo teste MTT e NRU, por 24 horas em diferentes concentrações da amostra.	39
Figura 3: Diagrama de Pareto, efeito do tempo e temperatura sobre os teores de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), e atividade antioxidante DPPH (C) IC ₅₀ (D) e ORAC (E), do Ingá.	43
Figura 4: Superfície de resposta para a variável dependente flavonoides totais de acordo com as variáveis independentes, tempo (minutos) e temperatura (°C).	44

Manuscrito 2

Figura 1: Diagrama de Pareto, efeito do tempo e temperatura sobre os teores de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), e atividade antioxidante DPPH (C) IC ₅₀ (D) e ORAC (E) na extração assistida por ultrassom.	67
Figura 2: Superfície de resposta para a variável dependente flavonoides totais sobre as variáveis independentes, tempo (minutos) e temperatura (°C), na extração assistida por ultrassom.	69
Figura 3: Diagrama de Pareto, efeito do tempo e temperatura sobre os teores de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), e atividade antioxidante DPPH (C) IC ₅₀ (D) e ORAC (E) na extração assistida por micro-ondas focalizado.	73
Figura 4: Superfície de resposta para a variável dependente compostos fenólicos totais sobre as variáveis independentes, tempo (minutos) e temperatura (°C), na extração assistida por micro-ondas focalizado.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESI-TOF-MS	Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray com tempo de voo de alta resolução
m/z	Razão massa/carga
MTT	Brometo de 2,5-difenil-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) tetrazólio
NRU	Neutral Red Uptake
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
FBS	Soro fetal bovino
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir processos biológicos e inviabilizar 50% do total de células
DPPH	(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)
IC ₅₀	Concentração apresentou 50% de atividade de inibição radical
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	14
3.2 INGÁ.....	15
3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	18
3.3.1 Extração Convencional	18
3.3.2 Extração Assistida por Ultrassom	19
3.3.3 Extração Assistida por Micro-ondas Focalizado	21
3.4 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR "ELECTROSPRAY" POR TEMPO DE VOO DE ALTA RESOLUÇÃO (ESI-TOF-MS)	23
3.5 CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	25
4 DESENVOLVIMENTO	28
4.1 MANUSCRITO 1	28
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO INGÁ, CITOTOXICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO POR ESI-TOF-MS	28
4.2 MANUSCRITO 2	56
EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO INGÁ POR ULTRASSOM E MICRO-ONDAS FOCALIZADO, E IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS QUÍMICOS POR ESI-TOF-MS	56
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país com características geográficas e climáticas favoráveis à produção de frutas. No entanto, ainda há um grande número de espécies de frutas nativas e exóticas que permanecem inexploradas apesar de seu alto potencial nutricional e econômico (SCHIASI et al., 2018). As frutas contêm altos níveis de compostos bioativos, que fornecem muitos benefícios à saúde, e estão presentes nos alimentos como constituintes naturais, sendo considerados vitais para a manutenção da saúde humana, prevenindo várias doenças como as cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer e outras ou até mesmo amenizando certos sintomas (COSTA et al., 2013). Estes compostos apresentam ação antioxidante em alimentos e atuam como antibacterianos, anti-inflamatórios, antialérgicos, antivirais, antitrombóticos, vasodilatadores e anticancerígenos (XIE et al., 2015). Os compostos fenólicos são a principal classe responsável pela atividade antioxidante (CASTRO et al., 2018). Os antioxidantes naturais têm despertado interesse devido à sua potencial eficácia e segurança terapêutica, e pelo fato de auxiliarem na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (RUFINO et al., 2010). Os subprodutos das frutas que geralmente são descartados podem ser utilizados para a extração desses compostos para posterior aplicação em suplementos, aditivos alimentares, novos produtos alimentícios e farmacêuticos (AYALA-ZAVALA et al., 2011).

O Ingá (*Inga marginata* Willd) é considerado uma fruta nativa e exótica. A árvore é perene e é encontrada no Sudeste da América do Sul, possuindo cerca de 5 a 20 metros de altura, sendo amplamente distribuída no território brasileiro, estando presente do Amapá ao Rio Grande do Sul (MORIWAKI et al., 2017). Os frutos são em forma de vagem, comestíveis e possuem muitas sementes, as quais estão envoltas por uma polpa branca flocosa e adocicada, sendo muito apreciada pelas populações da região Amazônica (LIMA; SANTOS; LA PORTA, 2018). Algumas espécies de Ingá apresentam efeitos antidiarreico, anti-inflamatório e antioxidante, que são atribuídos à presença de compostos como saponinas, taninos, compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos, entretanto poucos estudos a respeito do *Inga marginata* Willd são encontrados (LIMA, 2015).

A obtenção de extratos vegetais para obtenção de compostos bioativos é de grande importância, podendo ser realizada por diferentes métodos de extração, desde a extração convencional como por sólido-líquido, aos mais rápidos e tecnológicos como extração assistida por micro-ondas, ultrassom e outros. Sabe-se que alguns fatores influenciam na extração, principalmente a parte do vegetal utilizada, o tempo, e a temperatura de extração

(TIWARI et al., 2011). Além da extração, a caracterização dessas substâncias tem contribuído para a identificação e comprovação da presença dos compostos que possuem as ações de bioativos. A análise por espectrometria de massas com ionização por electrospray acoplada a outros sistemas possibilita uma identificação cada vez mais abrangente e poderosa, com pouca ou nenhuma preparação da amostra (MIAO et al., 2011). Há grande interesse e necessidade de identificar esses compostos, mas também de avaliar se o extrato pode ou não apresentar toxicidade para o organismo humano. Isso pode ser avaliado através da citotoxicidade que consiste na capacidade de um composto induzir a morte celular, avaliando a viabilidade celular *in vitro* (HARIHARAKRISHNAN et al., 2009).

Desta forma, este estudo teve o objetivo de realizar a extração dos compostos bioativos do *Inga marginata* Willd por diferentes métodos de extração, a caracterização química e a citotoxicidade dos extratos obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar as extrações dos compostos bioativos do fruto Ingá (*Inga marginata* Willd) por diferentes métodos de extração, avaliar a citotoxicidade da fração casca e polpa e da semente do fruto, analisar a ação antioxidante e caracterizar quimicamente os extratos obtidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos da fração casca e polpa, e da semente de Ingá, através da viabilidade celular;
- Obter extratos do Ingá através da extração convencional, extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas focalizado;
- Quantificar o conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de Ingá;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos pelos métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity);
- Avaliar a influência do efeito das variáveis independentes (tempo e temperatura) nas extrações dos compostos bioativos e na capacidade antioxidante;
- Caracterizar quimicamente por ESI-TOF-MS os extratos de Ingá.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos ou substâncias biologicamente ativas normalmente são gerados através de metabólitos secundários das plantas e sendo essenciais para vários mecanismos vitais (ZAINAL- ABIDIN et al., 2017). Ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos e são considerados ingredientes não nutricionais, mas de grande importância para a saúde e prevenção de doenças. São constituintes extra nutricionais que, proporcionam benefícios de nutrição e saúde para o organismo humano, como efeitos anti-inflamatórios e anticâncer (COSTA et al., 2013; NOWACKA et al., 2018).

Os compostos fenólicos referem-se a um importante grupo de metabólitos secundários responsáveis pelo sistema de defesa da planta (DAI; MUMPER, 2010). A bioatividade desses compostos apresentam uma ampla gama de benefícios, dentre os quais destacam-se a ação anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, e proteção contra várias doenças cardiovasculares (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; PASHA et al., 2013). São estruturas químicas amplamente encontradas na natureza, formadas por um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, incluindo os seus grupos funcionais (SILVA et al., 2010). Nos alimentos os compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, flavonoides) são os principais constituintes antioxidantes (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). Em alimentos, os antioxidantes podem ser definidos como compostos ou sistemas capazes de inibir ou retardar a formação de radicais livres e, conseqüentemente o desenvolvimento de rancidez, odores desagradáveis e deterioração oxidativa (BREWER, 2011). Agem inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres, que são espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio com constituintes intrínsecos dos alimentos (BARBOSA et al., 2010; ROCHA et al., 2013). Essas substâncias previnem o estresse oxidativo no organismo humano, causado pelo desequilíbrio entre substâncias antioxidantes e agentes oxidantes, por isso é recomendado na dieta o consumo de alimentos que possuem substâncias antioxidantes (VERMA; PRATAP, 2010). Os principais antioxidantes naturais usados em alimentos são o ácido ascórbico, os carotenoides e os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) (BREWER, 2011).

Dentre os compostos fenólicos mais encontrados nos vegetais estão os flavonoides (que englobam as antocianinas e flavonóis), os ácidos fenólicos, os estilbenos (como o resveratrol) e as lignanas (FRANCIS, 2000). Os flavonoides são o maior grupo entre os

compostos bioativos conhecidos, com mais de 5000 compostos já identificados sendo encontrados em hortaliças, frutas, cereais, chás, café, cacau, vinho, suco de frutas e soja (FALLER; FIALHO, 2009).

3.2 INGÁ

O Ingá (*Inga marginata* Willd) pertence à família das *Fabaceae* também conhecida como *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* e tribo *Ingae*, possui cerca de 40 gêneros e são 350 a 400 espécies distribuídas na América tropical e subtropical, sendo conhecida popularmente como ingá-mirim, ingá-feijão, ou ingá-dedo (LORENZI, 2009; MORIWAKI et al., 2017; LIMA; SANTOS; LA PORTA, 2018). A família *Fabaceae* possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies distribuídas em três subfamílias (*Papilionoideae* ou *Faboideae*, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae*), representando uma das maiores famílias de angiospermas e também uma das principais do ponto de vista econômico (SOUZA; LORENZI, 2005). A família das leguminosas possui importância econômica devido ao seu alto uso na alimentação, em medicamentos, utilização da madeira, como corante e gomas e para produção de óleo (AGUIAR, 2013). O nome do gênero *Inga* deriva do vulgar indígena (tupi), angá = ingá, que significa “que tem semente envolvida” (POSSETE; RODRIGUES, 2010).

O Ingá é encontrado nos países da América do Sul e Central, sendo amplamente distribuída no território brasileiro, distribui-se do Amapá ao Rio Grande do Sul. Possui uma ampla faixa de adaptação ecológica e latitudinal, situada em solos úmidos, abundante em orla de matas, beira de rios, e ao longo de estradas. A espécie *Inga marginata* Willd é nativa da Mata Atlântica, é considerada de grande importância para a região do Médio Tibagi do estado do Paraná por contribuir com a manutenção do equilíbrio ecológico e a ocupação de áreas degradadas. É considerada ecológica devido a produção abundante de frutos, e também ao rápido crescimento. A árvore do Ingá (Figura 1) possui de 5 a 20 metros de altura, o tronco é um pouco tortuoso, com 20 a 50 cm de diâmetro e casca mais ou menos lisa de cor marrom escura, provida de lenticelas, com folhas que medem de 10 a 30 cm de comprimento, verde-escuro e lustroso. Suas flores são brancas e numerosas, arrançadas em cachos e possuem frutos (Figura 2) do tipo legume, medindo de 5 a 15 cm de comprimento por 1 a 1,5 cm de largura (LORENZI, 2002; BENDER et al., 2017).

Figura 1 - Árvore (A) com flores (B) de Ingá (*Inga marginata* Willd).



Fonte: Acervo pessoal do autor (2019).

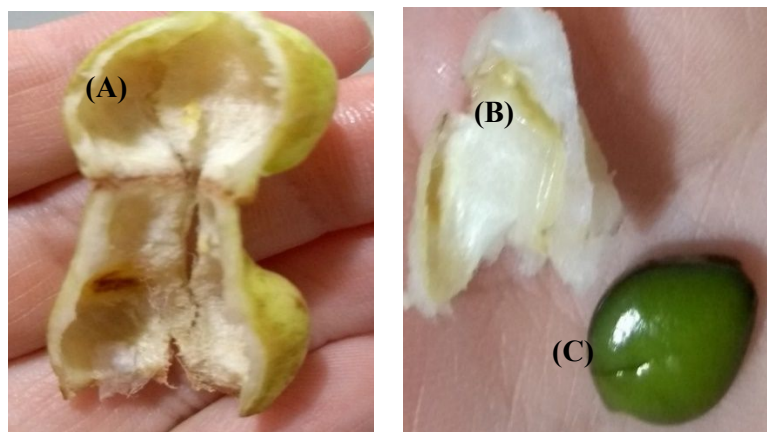
Figura 2 – Fruto de *Inga marginata* Willd.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2019).

As sementes (Figura 3C) são envoltas por uma polpa, (Figura 3B) normalmente contém de 8 a 15 sementes por fruto. A polpa é comestível com sabor adocicado, podendo ser utilizado na fabricação de refrigerantes e sorvetes (LORENZI, 2002).

Figura 3 – Partes do fruto Ingá casca (A), polpa (B) e semente (C) separadas (*Inga marginata* Willd).



Fonte: Acervo pessoal do autor (2019).

Diversas espécies deste gênero são usadas por comunidades indígenas, sendo que utilizam outras partes da planta, pois apresentam propriedades medicinais, podendo ser utilizadas as folhas e flores no preparo de chás e para o tratamento de feridas, dores de ouvido, descongestionante nasal (em caso de resfriado), curar espinhas, antipirético e para lavagens intestinais, etc. Algumas comunidades indígenas também utilizam como adstringente, antiartrítica, antirreumático, antidiarreico e anti-inflamatória (LORENZI, 1998). Na medicina popular, o fruto do Ingá é indicado no tratamento de úlceras, a casca é adstringente e hemostática, e as raízes são indicadas para o tratamento de disenteria e diarreia crônica. Estudos relatam a presença de compostos bioativos como saponinas, taninos, compostos fenólicos (flavonoides), triterpenos, apresentando atividade antitumoral (LIMA, 2015), bem como atividade antimicrobiana e antifúngica em extratos de folhas da árvore de Ingá (MORIWAKI et al., 2017). Possui nas cascas compostos fenólicos (taninos e flavonoides), ácidos fenólicos, saponinas, fitoesteróis e triterpenoides. Compostos esses atuantes no organismo com atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, e como atividade antioxidante (EMBUSCADO, 2015).

Mas segundo pesquisadores, existem poucos estudos sobre o fruto de *Inga marginata* Willd, sendo que este possui compostos bioativos com grande potencial para utilização pelas indústrias alimentícias, e farmacêuticas.

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é uma operação unitária que envolve a separação de compostos de interesse de uma matriz, seja ela sólida ou líquida através de processos químicos, físicos e/ou mecânicos, com o uso de solventes ou não. A busca por métodos de extração que sejam eficazes e com baixo custo para obtenção de extratos é uma preocupação para as indústrias. O método de extração e as condições que essa operação é condicionada são de grande importância na obtenção de um extrato concentrado, com bom rendimento dos compostos bioativos, sem causar degradação (VIEIRA, 2015). Também o tipo de solvente utilizado, assim como as condições de extração tempo, temperatura, por exemplo, tem efeito na eficiência de extração dos compostos fenólicos da matriz alimentícia. Os solventes com maior eficiência de extração são os hidroalcoólicos, tais como metanol 70% e etanol 70% (BATAGLION et al., 2014)

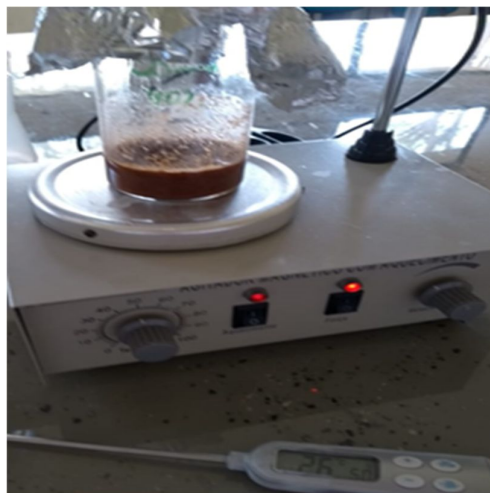
Ao longo dos estudos, novas técnicas de extração foram sendo descobertas e investigadas para melhorar a eficiência, obtendo maior rendimento em um curto tempo e em baixas temperaturas de extração. As técnicas emergentes são, a extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom entre outras (SONG et al., 2011; CARRERA et al., 2012).

3.3.1 Extração Convencional

A extração convencional normalmente fundamenta-se na utilização de solventes orgânicos para extrair os compostos de interesse de um soluto ou matriz, associado ou não ao uso do calor e agitação (KOTOVICZ, 2014).

Para amostras sólidas, é transferido o analito em estudo para a fase líquida, composta pelo solvente extrator adequado, esse processo também é chamado de extração sólido-líquido. Na (Figura 4) pode-se ver o equipamento a chapa de aquecimento com agitação magnética. Através desse método pode-se manter o material exposto ao solvente durante todo o período de extração, mantendo o mesmo sob agitação constante e com temperatura controlada, o que possibilita melhor extração, evitando perdas de substâncias através de altas temperaturas. Este é considerado um processo simples, pois consiste em empregar calor e agitação a fim de realizar a dissolução das substâncias presentes na amostra para o solvente extrator, porém pode ser um processo demorado (CASTRO; CAPOTE, 2010).

Figura 4 - Extração convencional com chapa de aquecimento e agitação.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2019).

A extração convencional de substâncias antioxidantes com solventes orgânicos pode ser eficiente para alguns casos, exigindo controle rigoroso de fatores como, a polaridade do solvente utilizado, o tempo e a temperatura de extração, pois pode ocorrer perda ou destruição dos compostos antioxidantes (ANDREO; JORGE, 2006).

3.3.2 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom, consiste na aplicação de ondas mecânicas em uma frequência acima do limiar da audição humana (> 20 KHz). Estas ondas são geradas através de um transdutor, que converte energia elétrica em energia mecânica. Dentre as vantagens apresentadas por este método frente aos métodos convencionais estão o menor tempo de processo, o consumo baixo de solvente e a alta reprodutibilidade dos ensaios, sendo considerada uma tecnologia de extração limpa e verde (CHEMAT; KHAN, 2011). A eficiência da extração assistida por ultrassom ocorre devido à cavitação acústica no solvente pela passagem de uma onda ultrassônica, permitindo uma maior penetração do solvente na amostra, aumentando a superfície de contato entre o sólido e a fase líquida (ESCLAPEZ et al., 2011). Quando ocorre o colapso das bolhas, são geradas ondas de energia muito elevadas na zona de cavitação. Caso este processo ocorra próximo à parede celular da matriz vegetal, a

energia gerada exerce um forte impacto sobre a superfície sólida, aumentando assim a permeabilidade da parede celular, favorecendo a entrada do solvente. Esse efeito irá aumentar o processo de difusão e reforçar a transferência de massa. Aliada à cavitação, o calor liberado no colapso das bolhas aumenta a solubilidade dos analitos, aumentando a eficiência da extração (VEILLET; TOMAO; CHEMAT, 2010; CAVALHEIRO, 2013).

A ruptura da parede celular devido a efeitos mecânicos da cavitação ultrassônica é evidente na microscopia eletrônica de luz ou de varredura de matrizes. Estudos observaram a formação de microfissuras de ruptura celular e a criação de poros nas superfícies, melhorando a permeabilidade dos compostos de interesse da matriz. Imagens microscópicas de elétron e de luz da matriz celular sonicada mostram o aumento da acessibilidade do solvente à estrutura interna, facilitando a liberação do composto alvo por meio da formação de microfissuras e micro canais que melhoram a permeação do solvente na matriz. A modificação da superfície da matriz aumenta a acessibilidade do solvente à estrutura interna e permite que o composto alvo se dissolva no solvente. O ultrassom é um método simples e versátil, de investimento relativamente baixo e eficiente na obtenção de vários produtos de importância comercial, dentre eles os compostos bioativos. Outra vantagem é a possibilidade de extração de compostos sensíveis ao calor com elevado rendimento empregando baixas temperaturas (TIWARI, 2015).

No banho de ultrassom (Figura 5A), a amostra (5B) fica em contato indireto com as ondas ultrassônicas, a energia ultrassônica é produzida por uma cerâmica pizoelétrica disposta entre duas chapas metálica (transdutor pizoelétrico) (MELECCHI, 2005).

Figura 5 - Banho de ultrassom (A). Extração de compostos bioativos do Ingá por ultrassom (B).



Fonte: Acervo pessoal do autor (2019).

Muitos fatores estão relacionados à eficiência do processo de extração utilizando ultrassom, tais como, características da planta, tipo de solvente, e as variáveis do processo (frequência, temperatura, tempo e intensidade de sonicação) (WANG; WELLER, 2006). Em relação à frequência, de acordo com o aumento desta variável menor a produção e intensidade do efeito de cavitação (AMEER; SHAHBAZ; KWON, 2017).

3.3.3 Extração assistida por micro-ondas focalizado

As micro-ondas são uma forma de energia eletromagnética não ionizante em frequências que variam de 300 MHz a 300 GHz. Essa energia é transmitida como ondas, que podem penetrar em biomateriais e interagir com moléculas polares, como a água, gerando calor (SADEGHI; HAKIMZADEH; KARIMIFAR, 2017). Em matriz vegetal, a alta quantidade de água absorve fortemente a energia de micro-ondas, ocorrendo um aquecimento interno, levando ao rompimento celular e facilitando o processo de extração. Além de ocorrer a migração dos íons dissolvidos, aumenta a penetração do solvente dentro da matriz e facilita a liberação dos compostos, aumentando o rendimento da extração (WANG; WELLER, 2006). O processo de extração por micro-ondas envolve três etapas sequenciais, primeiramente, ocorre a separação de solutos dos sítios ativos da matriz da amostra sob temperatura e pressão aumentada, em seguida, acontece a difusão do solvente através da matriz da amostra, para finalmente haver a liberação dos solutos da matriz para o solvente (ALUPULUI; CĂLINESCU; LAVRIC, 2012).

Extrair compostos bioativos por micro-ondas apresenta grande potencial na intensificação dos processos de extração de produtos naturais, devido principalmente ao tempo de extração e ao consumo de solventes, e ainda apresentam maiores rendimentos e melhor qualidade dos extratos. Além disso, a utilização de equipamentos menores e tempos reduzidos de operação requerem menores gastos energéticos, diminuindo custos e promovendo o uso de uma técnica de extração verde (LI et al., 2010; GALAN et al., 2017).

Para um processo de extração eficiente de compostos fenólicos com a utilização de micro-ondas é fundamental que se atente a vários fatores, como por exemplo, a potência, tamanho de partículas, tempo e temperatura de extração (BOURAS et al., 2015).

A extração com solvente utilizando o forno micro-ondas pode ser realizada em sistema fechado (sob pressão controlada) ou aberto (sob pressão atmosférica). O sistema aberto é conhecido como extração assistida por micro-ondas focalizado onde a amostra é aquecida de forma homogênea utilizando as micro-ondas focalizadas na amostra (CAMEL, 2000).

O forno de micro-ondas focalizado (Figura 6) caracteriza-se por incidir uniformemente, mas não de maneira contínua as micro-ondas e por possuir um dispositivo que mede a temperatura no interior do mesmo. Pelo painel de controle, localizado na parte externa do forno, é possível programar e monitorar a temperatura e o tempo desejados para cada processo (MATSUI, 2006).

Figura 6 – Equipamento (micro-ondas focalizado).



Fonte: Acervo pessoal do autor (2019).

O equipamento mostrado na Figura 6, possui um magnétron que é responsável por gerar as micro-ondas, as quais são propagadas por meio de um guia de ondas até a cavidade. A quantidade de energia das micro-ondas incidentes é controlada pela abertura de fendas posicionadas em cada cavidade. A potência e o tempo de abertura de cada fenda são estabelecidos pela temperatura selecionada na programação do equipamento. Sensores de infravermelho posicionados abaixo de cada frasco reacional possibilitam o controle de temperatura. A radiação eletromagnética é aplicada diretamente na mistura solvente-amostra e é convertida em calor, com isso as moléculas alvo migram da matriz para o solvente devido ao aquecimento muito localizado. A absorção de energia das micro-ondas depende da natureza do solvente e da matriz da amostra. Na extração de compostos termolábeis, a

temperatura de extração é particularmente controlada para evitar a degradação dos componentes envolvidos (OUFNAC et al., 2007). Durante a extração assistida por micro-ondas focalizado, ocorre o aquecimento dielétrico, chamado também de aquecimento por micro-ondas, é dependente da capacidade do material específico para absorver a energia de micro-ondas e converter em calor (solvente ou reagente) (KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2009).

3.4 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR "ELECTROSPRAY" POR TEMPO DE VOO DE ALTA RESOLUÇÃO (ESI-TOF-MS)

A espectrometria de massa, do inglês (MS – Mass Spectrometry) é uma técnica micro analítica, amplamente utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. É uma técnica baseada na determinação da relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. Contém o sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas e o detector. O processo se dá inicialmente pela injeção da amostra no equipamento, no qual é conduzida até a fonte de ionização. Na fonte de ionização, os componentes da amostra são convertidos em íons (positivos ou negativos) sendo imediatamente acelerados através de um campo magnético em direção ao analisador de massas. No analisador, os íons são separados de acordo com a sua relação m/z específica e, finalmente chegam ao detector. Cada íon gera um sinal próprio, transformando a corrente de íons em pulsos elétricos, e que posteriormente serão processados e analisados em forma de espectro de massas por um software adequado instalado em um computador (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Dentre os tipos de analisadores de massa, pode ser citado o quadrupolo e o tempo de voo (TOF, do inglês Time-of-flight). O analisador tipo quadrupolo consiste em quatro barras paralelas, arranjadas em dois pares opostos com diferentes potenciais elétricos entre eles, de modo que a aplicação dessas voltagens afete a trajetória centralizada dos íons. Isso permite selecionar os íons que irão atravessar o analisador e quais serão desviados. As principais vantagens dos instrumentos TOF são a faixa m/z que é ilimitada, oferecem alta transmissão de íons e, portanto, contribuem para sensibilidade. O design e a construção do instrumento TOF é relativamente simples; instrumentos TOF modernos permitem medições com alta precisão (SKOOG et al., 2010). O analisador por tempo de voo (time-of-flight TOF) possui como principal diferencial a facilidade de operação, onde o princípio de operação do TOF-MS envolve a medida do tempo que um íon leva para atravessar a fonte de íons até chegar no

detector, sendo que a separação é baseada na cinética dos íons. Inicialmente, os íons entram no TOF e recebem o mesmo pulso de energia. Em seguida, eles entram em uma região livre de potencial (tubo do TOF) e são separados pela razão m/z . Desse modo, íons com diferentes m/z possuem velocidades diferentes e, portanto, chegam ao detector em tempos diferentes. Os íons mais leves chegam mais rápido ao detector do que os mais pesados (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Figura 7- Equipamento, caracterização por ESI-TOF-MS.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2019).

Os processos de separação e detecção podem ser escolhidos de acordo com a sensibilidade, resolução e precisão de m/z e custo. Com isso, surgiu a ionização por "electrospray" (ESI) como uma alternativa para geração de íons a partir de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida. O ESI é uma das principais técnicas de ionização à pressão atmosférica, que permite a formação de fragmentos de macromoléculas a partir do íon precursor quando ionizadas. Essa técnica é perfeita para análise de espécies não voláteis e para estudos de especiação, devido a muitos dos íons gerados na fase gasosa manterem exatamente a mesma carga e estrutura das espécies em solução (MORAES; LAGO, 2003). Essa técnica possibilita a protonação (modo positivo, $[M+H]^+$) e a desprotonação (modo negativo, $[M-H]^-$) de moléculas de diferentes massas molares, facilitando a identificação de diversos compostos sem efetuar o uso de bibliotecas de espectros (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013). A geração de íons por electrospray possibilita a caracterização detalhada não

apenas de compostos voláteis e termicamente estáveis, mas também de uma ampla variedade de compostos não-voláteis e termicamente lábeis, como polímeros, biomoléculas, sais orgânicos e inorgânicos (VAZ et al., 2013).

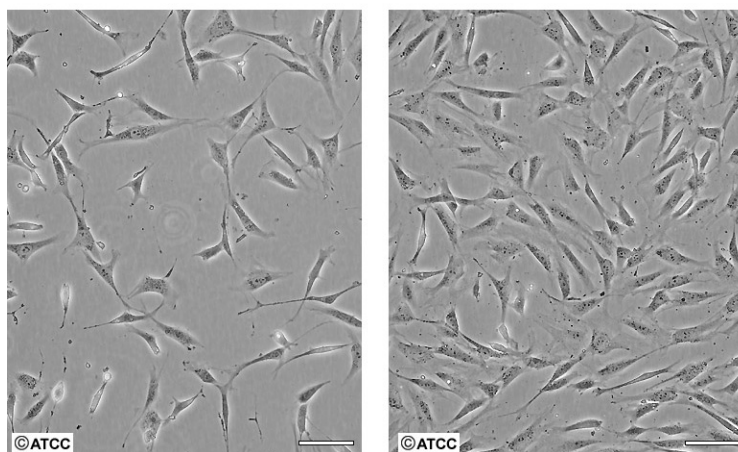
A necessidade pela caracterização de compostos químicos se tornou imprescindível e indispensável em análise de alimentos, caracterizando o composto estudado, pode-se ter o conhecimento da estrutura e composição química do alimento, e conseqüentemente, o conhecimento de suas propriedades e funções (SKOOG et al., 2010).

3.5 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Os pesquisadores estão cada vez mais preocupados em avaliar a toxicidade que pode estar presente nos alimentos. Mas como o controle está cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que consigam detectar a toxicidade de compostos que estão presentes em extratos de plantas ou frutos para uso em seres humanos, não causando reações adversas, ou lesões ao organismo humano (ROGERO et al., 2003). Atualmente células em cultura tem sido usadas para ensaios de citotoxicidade, essas células são capazes de crescer e dividir-se normalmente *in vitro*, de forma similar quando crescem *in vivo*, se os nutrientes necessários forem fornecidos através do meio de cultura (FRESHNEY, 2010). O termo citotoxicidade designa a medida do potencial de um agente causar injúria celular. Os testes *in vitro* são úteis para a definição da citotoxicidade basal, assim como no estabelecimento do intervalo de concentração no qual o agente tóxico atua sobre a célula. Fatores importantes sobre os parâmetros citotóxicos estão envolvidos, sendo que a indução de mutações ou a morte celular programada alguns fatores são determinados nestes tipos de testes. Com o estabelecimento da dose em que 50% das células são afetadas (IC_{50}), é possível comparar quantitativamente a resposta de um mesmo composto em diferentes sistemas, ou de vários compostos em um único sistema (KIRLAND et al., 2007).

Neste contexto, os fibroblastos 3T3 (Figura 8) foram escolhidos para o presente estudo por se tratar de uma linhagem celular que apresenta facilidade de obtenção, manutenção, manipulação e de por possuir a capacidade de se manter estável. Estas células estão distribuídas ao longo do tecido conjuntivo dos animais, sendo as mais comuns. Além disso, com base em estudos, os fibroblastos 3T3 são uma das linhagens recomendadas para a realização de testes de citotoxicidade, por serem as células constituintes do tecido conjuntivo, que possuem muitas reações metabólicas (JACOB, 2011).

Figura 8 - Linhagens celulares 3T3 (Fibroblastos murinos).



Fonte: American Type Culture Collection -ATCC (2019).

Vários métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de extratos alimentícios foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se há ou não alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada pelo ensaio MTT sal de brometo de 2,5-difenil-3, - (4,5-dimetil-2-tiazolil) tetrazólio, o qual mensura a atividade mitocondrial de células vivas e representa um parâmetro de sua atividade metabólica (TANG et al., 2007). O ensaio de MTT é um teste laboratorial colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular. Consiste em um sal MTT de coloração amarela, o qual é reduzido na mitocôndria das células vivas através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, que apresentam coloração púrpura. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, a densidade óptica (OD) resultante do Teste MTT é determinada em espectrofotômetro (BHATIA; YETTER, 2008).

Outro teste de viabilidade celular é o ensaio de captação corante de vermelho neutro do Inglês Neutral Red Uptake (NRU), o qual que consiste na avaliação da incorporação e ligação do corante (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina). Esse teste

consiste na habilidade de células viáveis incorporarem e ligarem o corante. Sua característica ligeiramente catiônica permite ao corante penetrar na membrana celular por difusão passiva não-iônica, concentrando-se nos lisossomos, onde se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos. A avaliação da viabilidade é feita por espectrofotômetro, sendo que quanto maior a coloração, maior será a absorbância e conseqüentemente maior a quantidade de células viáveis (RUDZOKS et al., 2011).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser em muitos casos mais rápido. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso em clínicas. Estudos de testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO et al., 2003).

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 MANUSCRITO 1

Formatação conforme normas da Revista Food Chemistry.

Extração de compostos bioativos do Ingá citotoxicidade e caracterização do extrato por ESI-TOF-MS

Déborah Cristina Barcelos Flores^{*a}; Caroline Pagnossim Boeira^a; Grazielle Castagna Cezimbra Weis^a; Renius de Oliveira Mello^a; Daniel dos Santos^b; Érico Marlon de Moraes Flores^b; Renato Aquino Záchia^c; Daniele Rubert Nogueira-Librelo^d; Clarice Madalena Bueno Rolim^d; Claudia Severo da Rosa^a

^a Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^c Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^d Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. E-mails: deborahbflores@gmail.com;

carolinepagnossim@hotmail.com;

grazielle.castagna@gmail.com; danielchemistryeng@gmail.com;

ericommf@gmail.com; renato.zachia@gmail.com; daniele.rubert@gmail.com;

clarice.rolim@gmail.com; reniusmello@gmail.com; claudiasr37@yahoo.com.br

*Autor de correspondência: Av. Roraima n° 1000, Prédio 42, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS – Brasil, Fone: +55 55 3304 2442, e-mail: deborahbflores@gmail.com

Resumo

O objetivo foi avaliar a citotoxicidade da fração casca e polpa, e semente do Ingá, extrair os compostos bioativos e caracterizar quimicamente os extratos. Para a avaliação da toxicidade da fração casca e polpa e semente na linhagem celular 3T3 (fibroblastos albinos suíços de murídeo), foram empregados os testes MTT e NRU. Após obtenção dos extratos com solução hidroalcoólica 70% (v/v), foram realizadas as análises de fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH (IC₅₀) e ORAC, e a identificação do perfil químico por ESI-TOF-MS. A fração casca e polpa em todas as concentrações não foi citotóxica, mas o extrato da semente apresentou toxicidade. A melhor condição de extração para a casca e polpa foi a 60 °C por 5 min, com efeito significativo da temperatura, já o tempo teve efeito significativo somente para a determinação de flavonoides. Foram identificados 7 compostos químicos na fração casca e polpa do extrato do Ingá.

Palavras-chave: *Inga marginata* Willd, extração convencional, toxicidade, células, antioxidante, parâmetros, compostos bioativos.

1. Introdução

Os compostos bioativos atuam no organismo humano diminuindo a incidência de doenças como câncer, disfunções cardiovasculares, inflamação, aterosclerose, declínio do sistema imunológico, e apresentam atividade antiviral, além de prevenir processos neurodegenerativos. Estes compostos estão presentes principalmente em frutas, sendo de grande interesse a forma como são extraídos (Kim, Moon, Tou, Mou, & Waterland, 2016). A extração dos compostos bioativos é geralmente realizada por métodos convencionais, empregando solventes orgânicos, associado ou não ao uso do calor e agitação. A vantagem deste processo está no baixo custo operacional e de capital. Além disso, os parâmetros tempo

e temperatura devem ser avaliados, pois causam grandes efeitos na extração (González-Montelongo, Lobo, & González, 2010; Medina et al., 2011).

O fruto do gênero *Inga*, conforme Lima, Santos, e La Porta (2018) é utilizado na medicina popular para o tratamento, como antirreumático, antidiarreico e anti-inflamatório. Esta planta pertence à família *Fabaceae*, subfamília *Mimosoideae*, está presente no litoral e o interior do Brasil, no sudeste da América Central e região oeste da América do Sul. O nome popular Ingá é de origem guarani, sendo que a espécie *Inga marginata* Willd é popularmente chamado de ingá-mirim ou ingá-feijão. Os frutos consistem em vagens compridas com muitas sementes, sendo essas envoltas por uma polpa flocosa, adocicada e branca, sendo muito apreciada pelas populações amazônicas. Sabe-se que esse fruto possui compostos bioativos importantes para a saúde, prevenindo muitos tipos de doenças, entretanto a espécie estudada carece de mais pesquisas (Bender et al., 2017; Moriwaki, Nakazato, Kobayashi, Morey, Faria, & Lonni, 2017).

Desta forma, há o interesse na extração dos compostos bioativos desse fruto, mas, além disso, é importante a avaliação destes extratos através dos testes de toxicidade, para investigar se há ou não potencial para a amostra ser tóxica para o organismo humano. Os testes de toxicidade em alimentos têm como objetivo principal detectar o potencial de uma amostra em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. A avaliação citotóxica tem sido utilizada para a determinação do potencial de aplicação terapêutica de extratos alimentícios ou de novos compostos isolados (Santos Junior, Oliveira, Guedes, Mota, & Magalhaes, 2016). É importante também a identificação dos compostos bioativos de extratos alimentícios, traçando um perfil químico dos compostos que estão presentes na matriz e que comprovam suas propriedades (Whu, Qian, Walters, & Mennito 2015).

Diante disso, essa pesquisa visa contribuir com a literatura, proporcionando informações essenciais para que mais pesquisadores tenham conhecimento do fruto *Inga marginata* Willd. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi extrair os compostos bioativos com solução hidroalcoólica, avaliar a citotoxicidade e a caracterização química do extrato.

2. Material e Métodos

2.1 Matéria-Prima

Os frutos do *Inga marginata* Willd foram colhidos no período de frutificação que foi de janeiro a fevereiro de 2018 no Campus da Universidade Federal de Santa Maria, na cidade de Santa Maria, RS, nas coordenadas geográficas de latitude (S) -29.714720, e longitude (W) -53.717676. Foi feita uma separação manual da fração casca e polpa e sementes, depois foi realizada a pré-secagem em estufa de circulação de ar forçada (Marconi, MA-035/100, Piracicaba, Brasil) à 45 ± 5 °C por 48 h. As amostras foram trituradas em moinho de facas (marca Willy, modelo SL-31), passadas em peneira de 20 *mesh*, e armazenadas a temperatura de -18°C. O material testemunho, os espécimes vegetais utilizados nesta pesquisa são oriundos de plantas identificadas como *Inga marginata* Willd., pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, que os depositou no herbário SMDB com os seguintes registros (Záchia 6555 com flores, 6557 com frutos).

2.2 Citotoxicidade da Fração Casca e Polpa e da Semente do Ingá

A linhagem celular de fibroblastos albinos suíços de murídeo (3T3), foi cultivada em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEN) com L-glutamina (584 mg.L^{-1}) e na presença de antibiótico/antimicótico (50 mg. mL^{-1} de sulfato de gentamicina e 2 mg. L^{-1} de anfotericina B), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) a 37 °C e com 5% de CO₂. As células foram rotineiramente cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² e colhidas usando

tripsina-EDTA quando uma confluência de cerca de 80% foi alcançada. Os efeitos citotóxicos dos extratos foram avaliados em células 3T3 por brometo de 2,5-difenil-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) tetrazólio (MTT), e pelo ensaio de viabilidade de captação corante de vermelho neutro do Inglês Neutral Red Uptake (NRU). A reação do MTT é uma medida da atividade metabólica celular e é baseado no protocolo descrito por Mossmann (1983), enquanto o ensaio NRU reflete a funcionalidade dos lisossomos e das membranas celulares conforme Borenfreund e Puerner (1985).

Inicialmente, as células 3T3 foram semeadas em placa de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células. mL^{-1} e incubadas por 24 h sob 5% de CO_2 , a 37°C . Após esse período, o meio gasto foi substituído por 100 μL de meio fresco, suplementado com 5% v/v de (FBS), contendo as amostras (extratos na faixa de concentração de 15,6 a 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$). As amostras (casca e polpa) e (semente) foram liofilizadas e foram dissolvidas em 1 mL de Solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem o uso do Dimetilsulfóxido (DMSO). As células de controle foram tratadas apenas com meio contendo 5% v/v de FBS. As células foram expostas durante 24 h a cada tratamento, após o meio contendo as amostras foi removido, seguido pela adição a cada poço de 100 μL de MTT (0,5 mg. mL^{-1}) ou corante NR (50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), ambos dissolvidos em meio sem FBS. As placas foram posteriormente incubadas por 3 h, seguida da remoção do meio, e lavagem única dos poços do ensaio NRU em PBS. Depois disso, 100 μL de DMSO foram então adicionados a cada poço para dissolver o produto roxo de formazan (ensaio MTT). Da mesma forma, para o ensaio NRU, foram adicionados 100 μL de uma solução contendo 50% de etanol absoluto e 1% de ácido acético em água destilada para extrair o corante. Após 10 min de agitação à temperatura ambiente, a absorbância das soluções resultantes foi medida a 550 nm, utilizando um leitor de microplacas, modelo (Multiskan FC Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). A citotoxicidade de cada amostra foi expressa como porcentagem de viabilidade em relação às células de controle não tratadas para tanto a

densidade óptica média das células não tratadas foi ajustada em 100% de viabilidade e em termos de IC_{50} (concentração necessária para inibir processos biológicos e inviabilizar 50% do total de células), calculado pelo ajuste da curva de porcentagem de sobrevivência celular em relação às concentrações do extrato.

2.3 Obtenção dos Extratos Hidroalcoólicos por Extração Sólido-Líquido

Os extratos de Ingá foram obtidos preparados a partir de 2 g da fração casca e polpa do fruto em um béquer contendo de 40 mL de etanol a 70% v/v. Em seguida esta mistura foi levada ao agitador magnético com aquecimento (WEALAB WEA - AA1030B). Após os extratos foram centrifugados (Centrilab – SH 120) a 3000 rpm por 10 min e filtrados. O volume foi ajustado e, após foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18°C).

2.4 Design Experimental

Para avaliar o efeito do tempo e temperatura, em relação à extração, foi realizado o planejamento experimental 2^2 com o ponto central (3 repetições) obtendo 7 ensaios conforme apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento experimental 2², variando tempo e temperatura.

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	5 (-1)	30 (-1)
2	25 (+1)	30 (-1)
3	5 (-1)	60 (+1)
4	25 (+1)	60 (+1)
5*	15 (0)	45 (0)
6*	15 (0)	45 (0)
7*	15 (0)	45 (0)

* 3 repetições do ponto central.

2.5 Determinação do Teor de Fenólicos Totais

A determinação do conteúdo de fenólicos totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) com modificações por Roesler, Malta, Carrasco, Holanda, Sousa, e Pastore (2007). As leituras de absorvância da reação foram medidas a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Biospectro, modelo: SP - 220). A absorvância do extrato foi comparada com uma curva padrão de ácido gálico na faixa de concentração de 10 a 500 mg. L⁻¹. A concentração do teor de fenólicos totais foi expresso em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (mg EAG. g⁻¹).

2.6 Determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais

O teor total de flavonoides totais foi determinado usando o ensaio colorimétrico desenvolvido por Zhishen, Mengcheng, e Jianming (1999). Para a determinação foram realizadas as leituras com a absorvância a 510 nm, em espectrofotômetro (Biospectro, modelo: SP - 220). A absorvância do extrato foi comparada com uma curva padrão de

quercetina nas concentrações de 25 a 200 mg.L⁻¹. O teor total de flavonoides foi expresso em mg equivalente de quercetina por grama de amostra seca (mg EQ. g⁻¹).

2.7 Determinação da Capacidade Antioxidante pelo método de DPPH

A atividade de eliminação de radicais dos extratos em relação ao radical (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) (DPPH) foi determinada utilizando o método de Brand-Williams, Cuvelier, e Berset (1995). Foi colocado 2,5 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM com 0,5 mL de soluções contendo concentrações crescentes dos extratos, por 30 min e ausência da luz. Foi realizada uma solução “controle” com 2,5 mL da solução metanólica de DPPH em 0,5 mL de metanol em substituição do extrato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) no comprimento de onda de 517nm. A capacidade de sequestrar radical livre foi calculada conforme a Equação 1, e expressa como percentual de inibição de oxidação do radical. A atividade de eliminação foi medida através da diminuição da absorbância das amostras em comparação com o padrão DPPH.

$$\%DPPH_{radicalscavenging} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100 \text{ Equação (1)}$$

Onde A₀ é absorbância controle, A_s é a absorbância da amostra. Para a determinação do IC₅₀ foi utilizado a equação da reta obtida dos valores da absorbância (AA%) das concentrações crescentes das amostras, substituindo o valor de Y por 50, obtendo-se o valor de X como a concentração da amostra com capacidade para reduzir 50% do DPPH. A concentração apresentou 50% de atividade de inibição radical (IC₅₀), expressa em mg extrato. mL⁻¹, que foi determinado a partir do gráfico da atividade de eliminação de radicais livres (%) contra o extrato concentração. Onde o resultado será expresso em Trolox Equivalente a Capacidade Antioxidante (μmol TEAC. g⁻¹).

2.8 Determinação da Capacidade Antioxidante pelo método ORAC

O ensaio de ORAC foi realizado como descrito por Ou, Hampsch-Woodill, e Prior (2001). A capacidade de desativar o radical ($\text{ROO}\cdot$) é medida pelo monitoramento do decaimento da fluorescência. A presença de compostos desativadores do $\text{ROO}\cdot$ diminui a taxa de decaimento da fluorescência. A fluorescência foi então medida a cada min (comprimentos de onda de 485 nm e 528 nm foram utilizados para excitação e emissão, respectivamente) a 37°C durante 90 min. A capacidade antioxidante foi determinada utilizando área sob a curva (AUC) e os resultados foram comparados com uma curva de referência de Trolox (0 - 96 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) e expressos em $\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$ de amostra seca.

2.9 Caracterização química dos Extratos de Ingá por ESI-TOF-MS

Os extratos do Ingá 50 μL foram diluídos em 2 mL de acetonitrila (ACN) H_2O (1:1) com ácido fórmico a 0,1% quando o modo positivo de ionização por electrospray foi usado. E em modo negativo, foi adicionado 50 μL dos extratos de Ingá dissolvidos em 2 mL de metanol e 50 μL de hidróxido de amônio. Foram identificados através da espectrometria de massa por tempo de voo de alta resolução, com ionização por electrospray (ESI-TOF-MS, Xevo G2 Q-ToF, Waters, EUA). Os espectros de massa foram adquiridos de 50 a 1000 Dalton (Da) e a detecção por ESI-TOF-MS foi realizada no modo de íon positivo e íon negativo com tensão capilar de 2,00 kV, tensão de cone de 20 V, e uma tensão do cone extrator de 3,0 V. As taxas de fluxo do gás de dessolvatação e do cone de gás foram 500 L.h^{-1} e 10 L.h^{-1} , respectivamente. A temperatura de dessolvatação foi ajustada para 500 °C e a temperatura da fonte para 150 °C. Já para o modo de íon negativo com tensão capilar de 2,5 kV, tensão de cone de 40 V e tensão de cone de extrator de 4,0 V. As taxas de fluxo do gás de dessolvatação e do cone de gás foram de 200 L.h^{-1} e 10 L.h^{-1} , respectivamente. A temperatura de dessolvatação foi ajustada para 450 °C e a temperatura da fonte foi de 150 °C. O controle do

sistema e a aquisição de dados foram realizados usando o software MassLynx V 4.1. O instrumento de massa foi calibrado para melhorar a exatidão e precisão.

2.10 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicada e os resultados foram expressos em valores médios e desvio padrão (DP), e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). A análise estatística dos dados foi obtida através do software Statistica® 10.0 (Stat Soft, Inc., EUA).

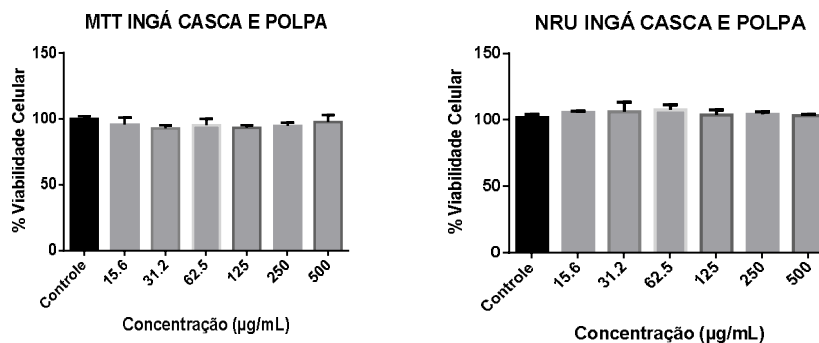
Para análise de citotoxicidade os dados analisados foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet's em múltiplas comparações, considerando haver diferença significativa quando um nível de $p < 0,05$ for alcançado. A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism® 6.0

3. Resultados e Discussão

3.1 Ensaios de citotoxicidade da fração casca e polpa e semente do Ingá

Foi realizada a avaliação da citotoxicidade dos extratos da fração casca e polpa e da semente de Ingá através da viabilidade da linhagem celular 3T3, pelo teste MTT e NRU, como mostrado na Figura 1 e 2.

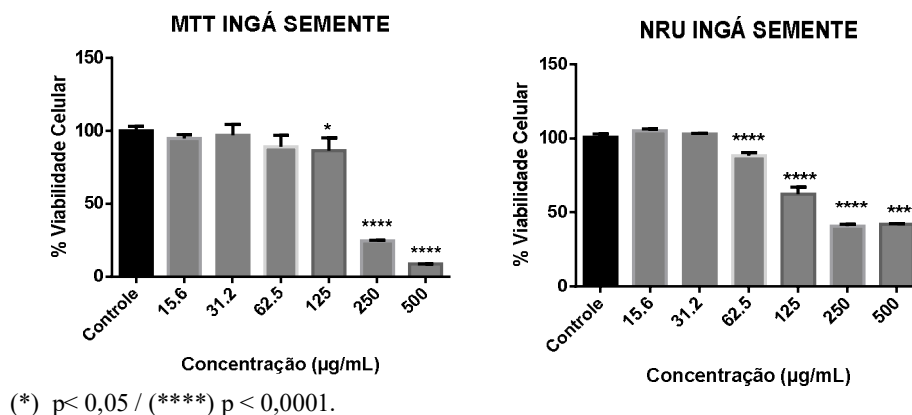
Figura 1. Avaliação da atividade citotóxica da fração casca e polpa do *Inga marginata* Willd pelo teste MTT e NRU, por 24 h em diferentes concentrações da amostra.



Na figura 1 as diferentes concentrações da amostra foram avaliadas em relação à viabilidade celular em comparação às células controle, as quais estão com viabilidade de 100%. É possível visualizar que os extratos em todas as concentrações para o teste MTT, não apresentaram ação citotóxica, pois a viabilidade celular de todas as amostras foi maior que 90% e não houve diferença estatística significativa em relação ao controle. Para o teste NRU os extratos em todas as concentrações não apresentaram ação citotóxica, pois a viabilidade celular de todas as amostras estava a 100%, não apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle. Para os estudos de Furtado et al. (2014) os ensaios de citotoxicidade dos óleos de *Inga laurina* Willd mostraram que todos os óleos da casca e das folhas apresentaram baixa toxicidade nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

Na Figura 2 é possível observar a toxicidade do extrato da semente em diferentes concentrações da amostra. Foram expressas como porcentagem de viabilidade em relação às células de controle, as quais estão com viabilidade de 100%.

Figura 2. Avaliação da atividade citotóxica das sementes do *Inga marginata* Willd pelo teste MTT e NRU, por 24 h em diferentes concentrações da amostra.



É possível visualizar que o extrato nas concentrações mais baixas (15,6, 31,2 e 62,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) para o teste MTT foi pouco citotóxico, obtendo uma viabilidade celular de 94%, 97% e de 89% respectivamente, não havendo diferença estatística significativa nessas concentrações em relação ao controle. Já nas concentrações 125, 250 e 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ houve toxicidade, apresentando uma viabilidade celular de 86%, 24% e 8% respectivamente, diferindo estatisticamente em relação ao controle para a concentração de 125 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) e para 250 e 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$).

Para o teste NRU houve também toxicidade, já em concentração de 62,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ com viabilidade celular de 88% e também nas concentrações 125, 250 e 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, com 62%, 40% e 42% respectivamente, havendo diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) em relação ao controle.

Com base nos resultados apresentados na Figura 2, os extratos das sementes de *Inga* apresentaram toxicidade para o teste de MTT (a partir de 125 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), e para o teste de NRU (a partir de 62,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$). As sementes de frutos podem conter substâncias tóxicas, como taninos ou ácidos, e também podem conter a glicosídeos e fenólicos cianogênicos, com alto conteúdo de cianeto. A semente quando sofre quebra ou maceração altera o conteúdo de

compostos e produz substâncias tóxicas, podendo ser explicado pelo fato de liberar substâncias para a defesa da planta (Senica, Stampar, Veberic, & Mikulic-Petkovsek, 2017).

Em relação ao IC₅₀ (concentração que causa 50% de morte da população celular) este foi calculado pelo ajuste da curva de porcentagem de sobrevivência celular em relação às concentrações do extrato de Ingá. Na tabela 2 estão mostrados os valores de IC₅₀ encontrados para os diferentes extratos avaliados.

Tabela 2. Estimativa do IC₅₀ de citotoxicidade de amostras de Ingá (fração casca e polpa e da semente), pelo teste MTT e NRU.

Amostra (Ingá)	IC ₅₀ (µg. mL ⁻¹)
Casca e polpa (MTT)	> 500 ± 1,54
Casca e polpa (NRU)	> 500 ± 2,09
Semente (MTT)	168,433 ± 1,30
Semente (NRU)	205,042 ± 1,01

Os resultados foram obtidos pela média ± dp (n = 3).

Para a fração casca e polpa (Tabela 2) pela estimativa do IC₅₀, os extratos em concentração maior de 500 µg. mL⁻¹ podem causar a morte de 50% da população de células, ou seja, em concentrações mais elevadas. Para a semente, os extratos em baixas concentrações como em 168 e 205 µg. mL⁻¹ já ocasiona 50% da morte celular. Com base nos resultados obtidos de citotoxicidade dos extratos da semente, foram estudados apenas os extratos da fração casca e polpa do Ingá.

3.2 Avaliação do Tempo e temperatura na extração de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante dos extratos

Com o objetivo de obter os extratos de Ingá com maior teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante, foram avaliadas as variáveis independentes de tempo e temperatura de extração. Os valores da determinação dos compostos bioativos do extrato da fração casca e polpa do Ingá são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Teor de fenólicos totais, DPPH, capacidade inibitória (IC₅₀), e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC) do extrato da fração casca e polpa.

Condição	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Compostos Fenólicos (mgEAG.g ⁻¹)	DPPH (μmol. TEACg ⁻¹)	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	ORAC (μmolTroloxg ⁻¹)
1	5	30	147,33± 2,20 ^d	19,01± 2,60 ^d	2,06 ± 1,13 ^a	122,18± 3,50 ^d
2	25	30	155,11±6,98 ^{cd}	20,25± 4,02 ^{cd}	1,88 ±2,14 ^b	125,98±1,10 ^{cd}
3	5	60	200,38± 5,02 ^a	42,05± 5,12 ^a	0,94 ± 0,22 ^e	146,64±2,40 ^a
4	25	60	177,88 ± 3,84 ^b	35,57± 1,60 ^b	1,10 ±0,26 ^d	141,86±3,55 ^b
5*	15	45	163,62 ±1,27 ^c	22,22±1,01 ^c	1,78 ± 1,58 ^c	131,51±2,47 ^c

*Valores médios referente a repetição do ponto central.

Valores expressos como média ± desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa (p <0,05) pelo teste de Tukey.

EAG= equivalente a ácido gálico. TEAC = Trolox equivalente a capacidade antioxidante.

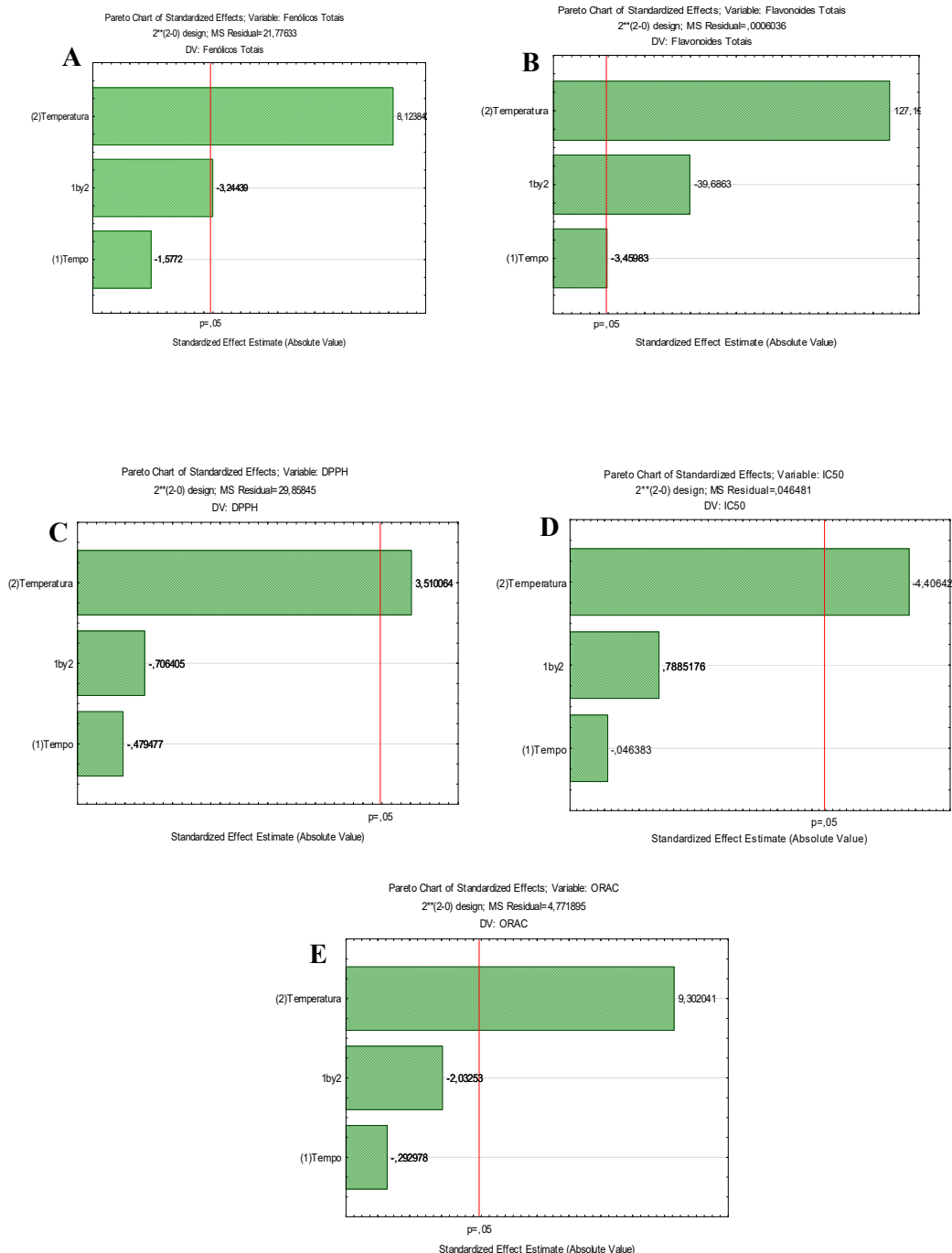
O teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato da casca e polpa na melhor condição, (temperatura de 60 °C a 5 min), foi de 200,38 mg EAG.g⁻¹, com diferença estatística significativa (p<0,05) das demais condições. De acordo com Pompeu, Rogez, Monteiro, Sirlene, Tinti, e Carvalho (2012) estudando a extração dos compostos fenólicos das folhas de *Inga edulis* por 1 h a 60°C, obtiveram um teor de fenólicos de 24,50 mg EAG.g⁻¹. O teor desses compostos pode ser influenciado por fatores como espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de maturação, condições de colheita e armazenagem (Vieira, Sousa; Mancini-Filho, De Lima & 2011), assim como as condições de extração principalmente o tempo e temperatura. A extração depende da taxa de dissolução de compostos e a rapidez com que atingem a concentração de equilíbrio do líquido. No entanto, o

tempo de extração prolongado pode ser indesejável uma vez que pode expor os compostos bioativos ao risco de degradação oxidativa, e com isso degradou os compostos (Madhujith & Shahidi, 2006).

Na Figura 3, a qual mostra o Diagrama de Pareto, pode ser visto os efeitos da temperatura e do tempo na extração dos compostos bioativos. Pode-se observar que na extração dos compostos fenólicos a temperatura teve efeito positivo e significativo ($p < 0,05$).

Com o aumento da temperatura para 60 °C houve maior extração dos compostos fenólicos, isso pode ser explicado pelo fato de que com a elevação da temperatura ocorreu o aumento dos coeficientes de difusão e a solubilidade dos fenólicos, assim aumento o rendimento de extração destes compostos. Nos estudos de Wang, Sun, Cao, Tian, e Li (2007), o aumento da temperatura favoreceu a liberação de fenólicos ligados na amostra com a quebra dos constituintes celulares das células vegetais, o que leva a um aumento da permeabilidade da membrana celular. A temperatura elevada pode aumentar a taxa de extração e, assim, reduzir o tempo para alcançar a recuperação máxima do conteúdo de fenólicos, mas temperaturas acima de 70 °C são favoráveis à quebra dos compostos, ocorrendo a degradação térmica (Thoo, Ho, Liang, Ho, & Tan, 2010). O tempo não teve efeito significativo na extração dos fenólicos, e não houve interação entre o tempo e a temperatura, inclusive em outros estudos (Ghitescu; Volf; Carausu; Bühlmann; Gilca; e Popa 2015), onde a utilização de longos períodos de extração aumentou a oxidação dos fenólicos. Assim, prejudicando a qualidade em termos de concentração de fenólicos dos extratos obtidos.

Figura 3. Diagrama de Pareto, efeito do tempo e temperatura sobre os teores de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), e atividade antioxidante DPPH (C) IC₅₀ (D) e ORAC (E), do Ingá.

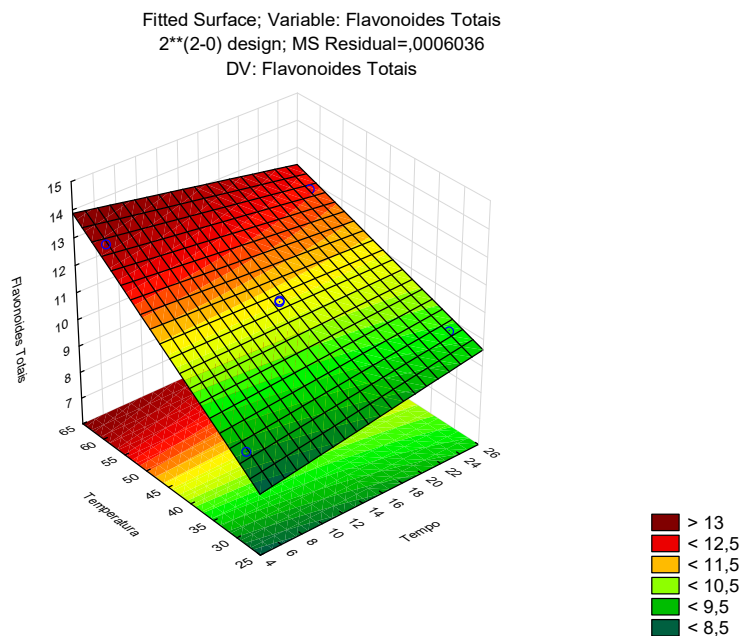


Segundo o Diagrama de Pareto, que pode ser visto na Figura 3 (B), para a determinação dos flavonoides totais houve interação entre o tempo e temperatura, com efeito

significativo ($p < 0,05$), sendo que a condição 1 apresentou (9,02 mg EQ.g⁻¹) a condição 2 (9,91 mg EQ. g⁻¹), a condição 3 que obteve melhor rendimento (13,12 mg EQ. g⁻¹), a condição 4 (12,06 mg EQ. g⁻¹) e a condição 5 referente ao ponto central apresentou (11,04 mg EQ. g⁻¹). A temperatura foi a variável que apresentou maior influência sobre a extração e teve efeito positivo, indicando que o aumento da temperatura levou a um aumento no teor de flavonoides totais. No entanto, o tempo teve efeito significativo, porém negativo. A melhor condição de extração foi em temperatura a 60 °C, e no tempo de 5 min obtendo-se 13,12 mg EQ. g⁻¹. No trabalho de Silva, Souza, Rogez, Rees, e Larondelle (2007b) foi encontrado um menor teor de flavonoides para *Inga edulis* com 5,50 mg EQ. g⁻¹, entretanto, a extração foi de 24 h a 40 °C sem agitação, valor menor ao verificado neste trabalho. Isso pode ser explicado pela baixa temperatura e longo tempo de extração sem agitação. Migliato et al. (2011) investigou a influência da temperatura na extração de flavonoides dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) e observou que o aumento da temperatura afetou positivamente a extração de flavonoides.

Como houve interação entre tempo e temperatura na determinação dos flavonoides totais, foi gerado o gráfico tridimensional da superfície de resposta (Figura 4).

Figura 4. Superfície de resposta para a variável dependente flavonoides totais de acordo com as variáveis independentes, tempo (min) e temperatura (°C).



De acordo com a Figura 4 foi observado que, à medida que a temperatura foi aumentando até 60 °C, maior foi o teor de flavonoides. Já o tempo, em determinado intervalo o teor diminuiu, o tempo foi significativo, porém negativo, assim como foi visto no diagrama de Pareto (Figura 3), que quanto maior o tempo, menor o teor de flavonoides.

Com o objetivo de avaliar os parâmetros estatisticamente, é apresentado na Tabela 4 a verificação da análise de variância (ANOVA) e o teste de falta de ajuste, relacionando o ajuste do modelo aos dados e a significância estatística do modelo experimental.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA), e teste de falta de ajuste para flavonoides totais.

	SS	Df	MS	F	P	R ² (ajustado)
Flavonoides						0,86
(1) Tempo	0,00722	1	0,007225	8,67	0,002858*	
(2) Temperatura	9,76562	1	9,765625	11718,75	0,000085*	
1x2	0,95062	1	0,950625	1140,75	0,000875*	
Falta de Ajuste	0,00014	1	0,000144	0,17	0,717949	
Erro Puro	0,00167	2	0,000833			
Total SS	10,72529	6				
Regressão	9,77285	2	4,886425	20,52180	0.004886*	
Residual	0,95244	4	0,238109			

(*) Houve efeito significativo considerando 95% de significância.

De acordo com a Tabela 4, o coeficiente de determinação R^2 representa o poder preditivo da sua reta de regressão. O valor de R^2 obtido foi de 0,86 indicando que este modelo é adequado e demonstra ajuste do modelo aos dados. Os dados da análise de variância (ANOVA) e o teste de falta de ajuste demonstram a significância estatística do modelo na explicação das variações experimentais, nessa análise deve-se observar o valor de p dos desvios de regressão. O p-valor para o teste de falta de ajuste não foi significativo, assim indicando que não há falta de ajuste nesse modelo em um nível de confiança de 95%, sendo preditivo.

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH a melhor condição de extração foi também na temperatura a 60 °C no tempo de 5 min, na qual foi obtido o valor de 42,05 $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ de Ingá. Conforme figura 3 (C) no Diagrama de Pareto, somente a variável temperatura teve efeito significativo e positivo ($p < 0,05$), na extração dos compostos antioxidantes. Na figura 3 (D) para o IC_{50} é apresentado o Diagrama de Pareto e seus efeitos onde observa-se que não houve interação entre as variáveis, e somente a temperatura teve efeito significativo ($p < 0,05$) na extração. A Tabela 3 mostra que a

condição 3 (60 °C a 5 min), apresentou um IC₅₀ baixo em torno de 0,94 mg. mL⁻¹, conseqüentemente alta atividade sequestradora de radicais livres, sendo que a temperatura teve efeito significativo. O aumento da temperatura influenciou nos resultados, confirmando o menor IC₅₀.

No Diagrama de Pareto Figura 3 (E), pode-se observar que somente a temperatura teve efeito significativo e positivo, à medida que a temperatura aumentou para 60 °C o valor da capacidade antioxidante (condição 3) aumentou para 146,64 µmol Trolox. g⁻¹. Estudos realizados mostram que para os compostos antioxidantes terem uma extração eficaz em matriz vegetal, deve-se levar em conta alguns fatores, como o solvente escolhido e a temperatura, aliados a agitação mecânica irão influenciar. Entretanto, deve-se ter cuidado com o limite máximo de temperatura para cada matriz a ser empregada para evitar a degradação, polimerização e oxidação dos compostos fenólicos (Peixoto Sobrinho, Gomes, Cardoso, Amorim, & Albuquerque, 2010).

3.3 Identificação de compostos e perfil químico

Foram identificados por espectrometria de massa por tempo de voo de alta resolução 7 compostos químicos (Tabela 5), nos extratos da fração casca e polpa do Ingá por extração sólido-líquido (extração convencional).

Tabela 5. Identificação dos principais compostos bioativos da fração casca e polpa de *Inga marginata***Willd por ESI-ToF-MS, modo positivo e negativo de identificação**

Nº	Massa experimental (m/z)	Massa Teórica (m/z)	Erro puro (ppm)	Possível estrutura molecular	Compostos
1	381.0803	381.822	5	C ₁₇ H ₁₆ O ₁₀	6-O-β-D-Glucopyranosyl-5-hydroxyangelicin (Chang et al., 2005)
2	307.1766	307.1757	2.9	C ₁₄ H ₂₆ O ₇	ácido d-glucurônico (Rat, Mathiron, Michaud, Kovensky, e Wadouachi, 2007).
3	133.0137	133.0137	0.2	C ₄ H ₅ O ₅	Ácido málico (Lin et al., 2014).
4	255.2341	255.2324	6.7	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido palmítico (Nwozo, Ajayi, e Iorliam 2013).
5	191.0205	191.0192	6.8	C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico (WILLIAM et al., 2018)
6	377.0854	377.0873	5	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	Ácido cafeico (Totha, Toth, e Kery, 2014)
7	341.1075	341.1084	2.6	C ₁₂ H ₂₂ O ₁	Sacarose (Hussain et al., 1990).

*m/z: razão massa (m) sobre a carga (z).

Através da análise de caracterização dos extratos de Ingá por ESI-TOF-MS foi identificado o composto 6-O-β-D-Glucopyranosyl-5-hydroxyangelicin. Chang et al. (2005), encontraram o mesmo composto nos extratos das folhas da planta *Ficus ruficaulis* Merr, planta medicinal chinesa, e relataram apresentar ação antioxidante e anti-inflamatória.

Outros compostos de interesse que foram identificados são o ácido málico e ácido cítrico que estão presentes nas frutas principalmente na casca. O ácido cítrico é utilizado em indústrias de alimentos como conservante natural, e também como acidulante, no controle microbiano. Esse composto é considerado com potencial para atividade de controlar diabetes e possuir atividade antioxidante (William et al., 2018). O ácido málico também é muito utilizado nas indústrias, como agente tamponante, aditivo alimentar, aromatizante, e

conservante natural (Aydogan, Karakoç, & Denizli, 2015). Este composto está presente normalmente em frutas ácidas e, possui ação antioxidante frente a radicais livres (Silva, Costa, Santana, & Koblitz 2010).

O ácido cafeico é um ácido fenólico com atividade antioxidante, ou seja, que desempenha papel importante nos processos de inibição do risco de doenças cardiovasculares e podem atuar sobre o estresse oxidativo, estando relacionado com a prevenção a diversas patologias crônico-degenerativas, como diabetes, câncer e processos inflamatórios (Lü, Lin, Yao, & Chen 2010).

Outro composto identificado foi o ácido glucurônico (Tabela 5), o qual consiste em unidades dissacarídicas que formam o ácido hialurônico. Este composto é particularmente importante no mecanismo de desintoxicação das células, e é encontrado em frutos (Zanuncio, Colodette, Gomes, Carneiro, & Vital, 2013).

Além dos compostos encontrados na fração casca e polpa segundo a tabela 5, foi encontrado também o ácido palmítico, considerado “ácidos graxos” essenciais e que também podem estar presentes em extrato de plantas. Têm papéis fundamentais no crescimento e na manutenção de um estado equilibrado de saúde e nutrição humana (Simopoulos, 2011).

De acordo com Silva, Monteiro, Alcanfor, Assis, e Asquieri (2003), a sacarose está inserida no grupo dos carboidratos e consistem em compostos orgânicos produzidos nas células fotossintéticas das plantas, e são responsáveis pelo sabor doce em vários alimentos. A sacarose é de interesse das indústrias de alimentos por ser como fonte de energia, adoçantes naturais, matéria-prima para produtos fermentados, dentre outras funções.

4. Conclusão

Nesse estudo foi possível avaliar a citotoxicidade da fração casca e polpa e da semente do Ingá pela viabilidade celular, através dos testes MTT e NRU. A fração casca e polpa em

todas as concentrações testadas não apresentou citotoxicidade para a linhagem celular 3T3. Já para o extrato da semente mesmo em baixas concentrações apresentou citotoxicidade. Na extração dos compostos bioativos, avaliando tempo e temperatura, a melhor condição de extração foi à 60 °C por 5 min, tendo a vantagem de ser um processo extrativo rápido, de fácil manuseio, baixo custo e alta obtenção de compostos bioativos com capacidade antioxidante e muitas outras propriedades benéficas à saúde. A temperatura teve efeito significativo, sendo que, à medida que foi aumentada, sendo que quanto maior a temperatura maior é a quantidade de compostos bioativos extraídos. Já o tempo teve efeito significativo somente para a determinação de flavonoides totais. Além disso, foram identificados 7 compostos de interesse que estão presentes no extrato de *Inga marginata* Willd.

Assim, o extrato da fração casca e polpa de Ingá possui grande potencial de aplicação industrial para área de alimentos e farmacêutica, contendo importantes compostos bioativos e alta capacidade antioxidante, podendo prevenir diversas doenças e auxiliando na vida de prateleira dos produtos alimentícios.

Referência

- Aydogan, C., Karakoç, V., e Denizli, A. 2015. Chiral ligand-exchange separation and determination of malic enantiomers in apple juice by open-tubular capillary electrochromatography. *Food Chemistry*, 187, 130-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.062>.
- Bender, B., Capellesso, E.S., Lottici, M.E., Sentkovski, J., Mielniczki-Pereira, A.A., Rosa, L.M.G., e Sausen, T.L. 2017. Growth responses and accumulation of soluble sugars in *Inga marginata* Willd. (*Fabaceae*) subjected to flooding under contrasting light conditions. *Brazilian Journal of Biology*, 77(2), 260-266. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.11315>.

- Borenfreund, E., e Puerner, J.A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24, 119-124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., e Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Chang, M.S., Yang, Y.C., Kuo, Y.C., Kuo, Y.H., Chang, C., Chen, C.M., e Lee, T.H. 2005. Furocoumarin glycosides from the leaves of *Ficus ruficaulis* Merr. var. antaoensis. *Journal of Natural Products*, 68 (1), 11-3. <https://doi.org/10.1021/np0401056>.
- Furtado, F.B., De Aquino, F.J.T., Nascimento, E.A., Martins, C. DE M., Morais, S.A. De., Chang, R., Cunha, L.C.S., Leandro, L.F., Martins, C.H.G., Martins, M.M., Silva, C.V. Da., Machado, F.C., e Oliveira, A. De. 2014. Seasonal Variation of the Chemical Composition and Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from *Inga laurina* (Sw.) Willd. *Molecules*, 19 (4), 4560-4577. <https://doi.org/10.3390/molecules19044560>.
- Ghiteșcu, R. E., Volf I., Carausu, C., Bühlmann, A.M., Gilca, I.A., e Popa, V.I. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.07.013>
- González-Montelongo, R., Lobo M. G., e González M. 2010. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119, 1030–1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.012>.
- Hussain, R. A., Lin, Y., Poveda, L. J., Bordas, J., Chung, B., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D., e Kinghorn, D. 1990. Plant-derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 28, 103-115. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90067-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90067-4).

- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J.C., Mou, B., e Waterland, N.L. 2016. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Journal of Food Composition and Analysis*, 49 (1), 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>.
- Lima, N. M., Santos, V. N. C., e La Porta, F. A. 2018. Quimiodiversidade, Bioatividade e Quimiosistemática do Gênero *Inga* (*FABACEAE*): Uma Breve Revisão. *Revista Virtual Química*, 10 (3), 459-473.
- Lin, L-Z., Sun, J., Chen, P., Zhang, R.W., Fan, X.E., Li, L.W., e Harnly, J.M. 2014. Profiling of Glucosinolates and Flavonoids in *Rorippa indica* (Linn.) Hiern. (Cruciferae) by UHPLC-PDA-ESI/HRMSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (26), 6118-6129. <https://doi.org/10.1021/jf405538d>.
- Lü, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., e Chen, C. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14 (4), 840-860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897>.
- Madhujith, T., e Shahidi, F. 2006. Optimization of the extraction of antioxidative constituents of six barley cultivars and their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (5), <https://doi.org/10.1021/jf061558e>.
- Medina, A.L., Haas, L.I.R., Chaves, F.C., Salvador, M., Zambiasi, R.C., Da Silva, W.P., Nora, L., e Rombaldi, C.V. 2011. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, 128 (4), 916-922. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119>.
- Migliato, K.F., Corrêa, M.A., Salgado, H.R.N., Tognolli, J.O., Sacramento, L.V.S., De Mello, J.C.P., Giannini, M.J.S.M., Almeida, A.M.F., e Pizzolitto, A.C. 2011. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. *Química Nova*, 34 (4), 695-699. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000400024>.

Moriwaki, M.T., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., Morey, A.T., Faria, T.J., e Lonni, A.A.S.G. 2017. Microbiological and chemical fingerprint of standardized extracts of *inga marginata*. *Visão Acadêmica*, 18 (1), 4-13. <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v18i1.51279>.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay to cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Nwozo, S.O., Ajayi, I.A., e Iorliam, B.E. 2013. Preliminary Toxicological Evaluation of some Biochemical Parameters and Lipid Profile in *Thevetia Neriifolia* Seed Oil Supplemented Diet in Albino Rats. *Electronic Journal of Practices and Technologies*, 12 (22), 43-58.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., e Prior, R.L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4619-26. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.

Peixoto Sobrinho, T.J.S., Gomes, T.L.B., Cardoso, K.C.M., Amorim, E.L.C., e Albuquerque, U.P. 2010. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Química Nova*, 33 (2), 288-291. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000200011>.

Pompeu, D. R., Rogez, H., Monteiro, K.M., Tinti, S.V., e Carvalho, J.E.2012. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. *Acta Amazonica*, 42 (1), 165-172. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672012000100019>.

Rat, S., Mathiron, D., Michaud, P., Kovensky, J., e Wadouachi, A. 2007. Efficient glycosylation and/or esterification of d-glucuronic acid and its 6,1-lactone under solvent-free microwave irradiation. *Tetrahedron*, 63(50),12424-12428. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.09.043>.

- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C, Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., e Pastore, G.M. 2007. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Food Science and Technology*, 27, 53-60. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>.
- Santos Junior, A, F., Oliveira, L.C., Guedes, A.S., Mota, M.D., e Magalhaes, H.I.F. 2016. Atividade antioxidante e tóxica de extratos de cascas do fruto de *Nephelium lappaceum* L. (*Sapindaceae*), comercializados em Salvador, Bahia, Brasil. *Ciências farmacêuticas*, 28 (3), 173-178. <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v28.e3.a2016.pp173-178>
- Senica M., Stampar F., Veberic, R., e Mikulic-Petkovsek, M. 2017. Fruit Seeds of the Rosaceae Family: A Waste, New Life, or a Danger to Human Health?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.65, n.48, p.10621-10629. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03408>.
- Silva, R.N., Monteiro,V.N., Alcanfor, J.D.X., Assis,E.M., Asquieri,E.R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(3), 337-341, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000300007>.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., e Larondelle, Y. 2007b. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian Region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055>.
- Silva, M.L.C., Costa, R.S., Santana, A.S. e Koblitz, M.G.B. 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina*, 31 (3), 669-682. ISSN: 1676-546X.
- Simopoulos, A.P. (2011) - Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular Neurobiology*, 44 (2), 203-215. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8162-0>.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144-158.

- Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W., e Tan, C.P. 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120 (1), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064>.
- Toth, A., Toth, G., e Kery, A. 2014. Polyphenol Composition and Antioxidant Capacity of Three *Lysimachia* Species. *Natural Product Communications*, 9 (10).
- Vieira, L. M., Sousa, M. S. B., Mancini-Filho, J., e De Lima, A. 2011. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33 (3), 888-897. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000099>.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., e Li, X. 2007. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106 (2), 804-810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062>.
- Whu, C., Qian, K., Walters, C.C. e Mennito, A. 2015. Application of atmospheric pressure ionization techniques and tandem mass spectrometry for the characterization of petroleum componentes. *International Journal of Mass Spectrometry*, 377, 728-735. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.08.019>.
- William, J., John, P., e Mumtaz, M.W.; CH, A.R.; Adnan, A.; Mukhtar, H.; Sharif, S.; Raza, S.A. Antioxidant activity, Hypoglycemic potential and metabolite profiling of *Hyophorbe indica* leaf extract. 2018. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31 (6), 2737-2742.
- Zanuncio, A.J.V., Colodette, J.L., Gomes, F.J.B., Carneiro, A.C.O., e Vital, B.R. 2013. Composição química da madeira de eucalipto com diferentes níveis de desbaste. *Ciência Florestal*, 23 (4), 755-760. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509812359>.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., e Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64 (4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).

4.2 MANUSCRITO 2

Formatação conforme normas da Revista Industrial Crops and Products.

Efeito do tempo e temperatura na extração de compostos bioativos do Ingá por ultrassom e micro-ondas focalizado, e identificação de perfis químicos por ESI-TOF-MS

Déborah Cristina Barcelos Flores^{a*}, Caroline Pagnossim Boeira^a, Daniel dos Santos^b, Érico Marlon de Moraes Flores^b, Bruna Nichelle Lucas^a, Juliano Smanioto Barin^a, Claudia Severo da Rosa^a

^a Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima No. 1000, prédio 42, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima No. 1000, prédio 18, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*Autor de correspondência: Av. Roraima n° 1000, Prédio 42, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS – Brasil, Fone: +55 55 3304 2442, e-mail: deborahbflores@gmail.com

Caroline Pagnossim Boeira: carolinepagnossim@hotmail.com

Daniel Santos: danielchemistryeng@gmail.com

Érico Marlon de Moraes Flores: ericommmf@gmail.com

Bruna Nichelle Lucas: bruna_nichelle@hotmail.com

Juliano Smanioto Barin: juliano@ufsm.br

Claudia Severo da Rosa: claudiasr37@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tempo e temperatura na extração de compostos bioativos do Ingá obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizado, e identificar os compostos químicos presentes. Os extratos obtidos tanto por ultrassom como micro-ondas focalizado foram preparados com etanol a 70% v/v. Foram realizadas análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH (IC₅₀) e ORAC, e a identificação do perfil químico foi realizada por ESI-TOF-MS. Para a extração por ultrassom a temperatura apresentou efeito significativo para todas as determinações, o tempo apresentou efeito e houve interação entre as variáveis somente para a determinação dos flavonoides totais. A melhor condição de extração para extração por ultrassom dos compostos bioativos foi à 60 °C por 5 min. Para a extração por micro-ondas focalizado, a melhor condição foi na temperatura de 60 °C por 25 min. Neste método o tempo e a temperatura tiveram efeito significativo, sendo que à medida que a temperatura e o tempo de extração foram aumentados, maior foi o teor de compostos extraídos, mas somente houve interação entre as variáveis para compostos fenólicos totais. Foram identificados 11 compostos químicos de interesse, e comprovando que o Ingá possui potencial para extração de compostos bioativos e merece maior estudo e valorização de seus compostos e capacidade antioxidante.

Palavras-chave: *Inga marginata* Willd, tempo, temperatura, atividade antioxidante, caracterização, extração verde.

1. Introdução

O consumo de frutas e vegetais tem atraído interesse crescente dos consumidores, a isso se deve ao fato de que, a associação entre a ingestão desses alimentos combinada com um estilo de vida saudável, pode reduzir doenças cardíacas, obesidade, câncer e outras doenças degenerativas, devido os compostos bioativos presentes (Garcia-Salas et al. 2010). O Ingá

pertence à família das *Fabaceae* ou *Leguminosae*, as espécies desta família apresentam frutos em formato de vagem (Moriwaki et al. 2017). A terminologia Ingá deriva do nome popular indígena (tupi) angá, que significa sementes envolvidas. A espécie *Inga marginata* Willd é popularmente conhecida como Ingá-dedo, Ingá-feijão, Ingá-amendoim ou Ingá-miúdo, e é encontrado desde o Amapá até o Rio Grande do Sul, no Brasil (Sousa et al. 2011). O fruto é comestível, com muitas sementes sendo estas envoltas por uma polpa branca e adocicada (Bender et al. 2017; Lima et al. 2018). O gênero Ingá tem sido pouco estudado, sendo que principalmente o fruto é considerado um fruto abundante em diversos ambientes e possui compostos extremamente importantes para a saúde, podendo ser utilizado em produtos alimentícios ou até mesmo na indústria farmacêutica. Além disso, apresenta efeitos importantes na medicina popular, utilizado no tratamento de úlceras e como anti-inflamatório. Possui nas cascas compostos bioativos como fenólicos (taninos, flavonoides, e ácidos fenólicos), saponinas, fitoesteróis e triterpenoides. Compostos estes atuantes no organismo humano com atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, e antioxidante (Bittencourt et al. 2015; Embuscado, 2015). Os flavonoides e os ácidos fenólicos também são conhecidos por prevenir principalmente doenças cardiovasculares e carcinogênicas (Noratto et al. 2011). Como essas e outras substâncias com ação de fitoquímicos presente no extrato são de extrema importância, as técnicas de identificação auxiliam na caracterização química, demonstrando e caracterizando novas substâncias e seus fragmentos que podem ser alvo de pesquisa para o desenvolvimento de novos produtos, e também podem comprovar as propriedades dos compostos bioativos na amostra (Viceconti et al. 2015).

O modo como essas substâncias são extraídas é importante, pois sendo compostos sensíveis a degradação, desta forma, é crucial escolher um método de extração eficaz para garantir uma degradação mínima. O objetivo dos métodos de extração verde é alcançar uma taxa de extração mais rápida, com uso mais eficaz de energia, aumento da transferência de

massa e calor. Além disso, busca-se tamanho reduzido de equipamento e redução no número de etapas do processamento, e assim evitando a degradação dos compostos de interesse (Jacotet-Navarro et al. 2016). A extração assistida por ultrassom e o uso de micro-ondas focalizadas, são tecnologias amplamente usadas atualmente pelas vantagens que esses métodos trazem em relação a outros. As extrações por ultrassom podem ser concluídas em um curto período de tempo com alta reprodutibilidade, reduzindo o consumo de solvente, empregando temperaturas mais baixas, proporcionando maior pureza, e maior rendimento do produto. A extração assistida por micro-ondas é uma alternativa considerada verde, pois requer menor gasto energético, menor tempo de extração, e baixo consumo de solventes (Chemat et al. 2011; Barba et al. 2016). Além do método aplicado, a extração de compostos bioativos é afetada por muitos fatores, tais como o tempo e temperatura, que são considerados parâmetros que afetam significativamente a eficiência dos processos de extrações desses compostos (Khoddami et al. 2013).

Este trabalho visa suprir a deficiência de pesquisas sobre o Ingá, de modo a contribuir com a literatura, proporcionando um direcionamento para futuros estudos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos parâmetros tempo e temperatura na extração de compostos bioativos do Ingá, obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizada, e identificar os compostos presentes nos extratos.

2. Material e métodos

2.1 Amostras

Os frutos de Ingá, foram colhidos durante o período de frutificação de janeiro a fevereiro de 2018, no Campus da Universidade Federal de Santa Maria, na cidade de Santa Maria, RS, foram obtidos nas coordenadas latitude (S) -29.714720, e longitude (W) - 53.717676. Primeiramente, foi realizada separação da casca e polpa, e realizada a pré-

secagem em estufa de circulação de ar forçada (Marconi, MA-035/100, Piracicaba, Brasil) à 45 ± 5 °C por 48 h. As cascas e as polpas foram trituradas em moinho de facas (marca Willy, modelo SL-31) e passadas em peneira de 20 *mesh*, e armazenadas a temperatura de -18 °C. O espécimes vegetais utilizados nesta pesquisa são oriundos de plantas identificadas como *Inga marginata Willd.*, seguindo de registro (Záchia 6555 com flores, 6557 com frutos) e depositado no herbário SMDB da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

2.2 Obtenção dos extratos hidroetanólicos por ultrassom e micro-ondas focalizado

Foram pesados 2 g de amostra de Ingá seco e moído, aos quais foram adicionados 40 mL de etanol a 70% (v/v). Em seguida esta mistura foi levada para extração em banho ultrassônico com aquecimento (Elma, modelo D-78224, SINGEN/HTW, Alemanha) operando em frequência de 25 kHz, potência de 100 W. No método de extração assistida por micro-ondas focalizado, o procedimento para extração dos compostos, foi de acordo com Costa et al. (2006), com modificações. Para tanto, foram pesados 2 g de amostra de Ingá seco e moído, os quais foram transferidos para frascos de vidro, e a estes foi adicionado o solvente hidroetanólico a 70 % (v/v). As extrações foram realizadas em forno de micro-ondas focalizado com duas cavidades equipadas com garrafas de vidro com capacidade máxima de 180 mL (Star System 2, 800W, CEM, Matthews, NC, EUA). Após os extratos foram centrifugados (Centrilab – SH 120) a 3000 rpm por 10 minutos e filtrados em papel filtro, sendo o volume ajustado, após foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18°C) até o momento das análises.

2.3 Design experimental

Para verificar a influência do tempo e temperatura na extração dos compostos bioativos e na atividade antioxidante obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizado, foi

realizado um planejamento experimental 2^2 , com 2 níveis e 2 variáveis, 3 repetições no ponto central, obtendo assim 7 ensaios conforme apresentados na Tabela 1. Essas condições foram determinadas após testes preliminares da extração dos compostos bioativos do Ingá.

Tabela 1. Planejamento experimental (2^2) utilizado nas extrações dos compostos bioativos do Ingá obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizado.

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	5 (-1)	30 (-1)
2	25 (+1)	30 (-1)
3	5 (-1)	60 (+1)
4	25 (+1)	60 (+1)
5*	15 (0)	45 (0)
6 *	15 (0)	45 (0)
7 *	15 (0)	45 (0)

* Repetições do ponto central.

2.4 Compostos Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizada

2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), com modificações por Roesler et al. (2007). As leituras das absorbâncias da reação foram medidas a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Biospectro, modelo: SP - 220). A absorbância do extrato foi comparada com uma curva padrão de ácido gálico na faixa de concentrações de 10 a 500 mg. L⁻¹. A concentração do teor de compostos fenólicos totais foi expressa em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (mg EAG. g⁻¹).

2.4.2 Determinação do teor de flavonoides

O teor total de flavonoides foi determinado usando o ensaio colorimétrico desenvolvido por Zhishen et al. (1999). Para a determinação foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Biospectro, modelo: SP - 220), no comprimento de onda de 510 nm. A absorbância do extrato foi comparada com uma curva padrão de quercetina com faixa de concentrações de 25-200 mg.L⁻¹. O teor total de flavonoides foi expresso em mg equivalente de quercetina por grama de amostra seca (mg EQ. g⁻¹).

2.4.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH

A atividade de eliminação de radicais dos extratos em relação ao radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) foi determinada utilizando o método de Brand-Williams et al. (1995). A atividade de eliminação foi medida como a diminuição da absorbância das amostras em comparação com o padrão DPPH. As absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (marca Biospectro e modelo SP-220) no comprimento de onda 517 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade de eliminação radical (%) da DPPH radical de acordo com a Equação 1.

$$\%DPPH_{radicalscavenging} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde A₀ é a absorbância do controle, e A_s é a absorbância da amostra. Para a determinação do IC₅₀ foi utilizada a equação da reta obtida dos valores da absorbância (AA%) das concentrações crescentes das amostras, substituindo o valor de Y por 50, obtendo-se o valor de X como a concentração da amostra com capacidade para reduzir 50% do DPPH. A concentração apresentou 50% de atividade de inibição radical (IC₅₀), expressa em mg extrato

mL⁻¹, que foi determinado a partir do gráfico da atividade de eliminação de radicais livres (%) contra o extrato concentração.

2.4.4 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de ORAC

O ensaio de Capacidade de desativação do radical peroxila ROO• (ORAC) foi realizado como descrito por Ou et al. (2001). A capacidade de desativar o radical (ROO•) é medida pelo monitoramento do decaimento da fluorescência. A presença de compostos desativadores do ROO• diminui a taxa de decaimento da fluorescência.

Para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos foram adicionados 25 µL de extrato de ingá (100 mg. L⁻¹), e Trolox em tampão fosfato de potássio 75 mmol. L⁻¹ (pH 7,4) em uma microplaca, a qual foi incubada por 10 min a 37 °C. Após, 150 µL de solução de fluoresceína (81 nmol.L⁻¹), foi adicionada a cada poço como substância geradora de fluorescência. Foram adicionados 25 µL de 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) (152 mmol. L⁻¹) com a função de gerar o radical peroxila. A fluorescência foi medida a cada minuto nos comprimentos de onda de 485 nm e 528 nm, os quais foram utilizados para excitação e emissão, respectivamente durante 90 min a 37 °C. A capacidade antioxidante foi determinada utilizando área sob a curva (AUC) e os resultados foram comparados com uma curva de calibração de Trolox na faixa de concentração (0 a 96 µmol. L⁻¹) e expressos em µmol Trolox. g⁻¹ de amostra seca.

2.5 Identificação dos extratos de Ingá por ESI-TOF-MS

Do extrato do Ingá foi retirado 50 µL e diluídos em 2 mL de acetonitrila (ACN) H₂O (1:1) com ácido fórmico a 0,1% quando o modo positivo de ionização por electrospray foi usado. Para o modo negativo, onde foram adicionados 50 µL dos extratos de Ingá, os quais foram dissolvidos em 2 mL de metanol e 50 µL de hidróxido de amônio. Os compostos

presentes nos extratos foram identificados por ionização por electrospray com espectrometria de massa por tempo de voo de alta resolução (ESI-ToF-MS, Xevo G2 Q-ToF, Waters, EUA). Os espectros de massa foram adquiridos de 50 a 1000 Dalton (Da) e a detecção de ESI-ToF-MS foi realizada no modo de íon positivo e íon negativo com tensão capilar de 2,00 kV, tensão de cone de 20 V, e uma tensão do cone extrator de 3,0 V. As taxas de fluxo do gás de dessolvatação e do cone de gás foram de 500 L. h⁻¹ e 10 L. h⁻¹, respectivamente. A temperatura de dessolvatação foi ajustada para 500 °C e a temperatura da fonte foi de 150 °C. Já para o modo de íon negativo com tensão capilar de 2,5 kV, a tensão de cone foi ajustada em 40 V e tensão de cone de extrator em 4,0 V. As taxas de fluxo do gás de dessolvatação e do cone de gás foram de 200 L.h⁻¹ e 10 L.h⁻¹, respectivamente. A temperatura de dessolvatação foi ajustada em 450 °C e a temperatura da fonte foi em 150 °C. O controle do sistema e a aquisição de dados foram realizados usando o software MassLynx V 4.1. e o instrumento foi calibrado para melhorar a exatidão e precisão.

2.6 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicada e os resultados foram expressos em valores médios e desvio padrão (DP), os quais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Foram avaliados os efeitos das variáveis independentes (tempo e temperatura) sobre as variáveis dependentes (compostos fenólicos totais, flavonoides totais, e atividade antioxidante), considerando 95% de nível de confiança. A análise estatística dos dados foi obtida através do software Statistica ®10.0 (Stat Soft, Inc., EUA).

3. Resultados e discussão

3.1 Compostos Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos por ultrassom

Foram determinados os compostos bioativos dos extratos do Ingá, pelo método de extração assistida por ultrassom. Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH, capacidade inibitória (IC₅₀), e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC) dos extratos obtidos por ultrassom e micro-ondas focalizado

Ultrassom						
Condição	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Fenólicos Totais (mg EAG.g ⁻¹)	DPPH (μmol TEAC.g ⁻¹)	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	ORAC (μmolTroloxg ⁻¹)
1	5	30	150,88 ± 1,40 ^e	19,84 ± 2,43 ^e	1,64 ± 2,98 ^a	127,00 ± 1,08 ^d
2	25	30	156,44 ± 1,19 ^d	23,86 ± 1,43 ^d	1,55 ± 3,87 ^b	125,95 ± 1,60 ^d
3	5	60	210,98 ± 2,30 ^a	44,98 ± 3,65 ^a	0,90 ± 1,76 ^e	151,25 ± 2,07 ^a
4	25	60	205,61 ± 1,03 ^b	40,14 ± 2,89 ^b	1,02 ± 2,48 ^d	148,11 ± 2,89 ^b
5*	15	45	182,16 ± 0,97 ^c	31,95 ± 1,05 ^c	1,49 ± 0,81 ^c	138,90 ± 2,90 ^c
Micro-ondas						
Condição	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Flavonoides totais (mg EQ. g ⁻¹)	DPPH (μmolTEAC.g ⁻¹)	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	ORAC (μmolTroloxg ⁻¹)
1	5	30	8,02 ± 0,02 ^d	15,85 ± 1,14 ^e	4,39 ± 1,67 ^a	120,86 ± 2,87 ^d
2	25	30	8,86 ± 0,49 ^d	18,51 ± 1,22 ^d	3,65 ± 1,96 ^b	114,22 ± 2,92 ^e
3	5	60	10,90 ± 0,57 ^b	26,13 ± 2,53 ^b	1,87 ± 0,49 ^d	140,97 ± 1,54 ^b
4	25	60	13,24 ± 0,51 ^a	37,99 ± 2,29 ^a	0,98 ± 3,58 ^e	145,45 ± 3,41 ^a
5*	15	45	9,75 ± 0,15 ^c	22,97 ± 1,05 ^c	3,20 ± 1,05 ^c	132,98 ± 1,59 ^c

*Valores médios referente a repetição do ponto central. Valores expressos como média ± desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey. EQ = equivalente a quercetina. EAG= equivalente a ácido gálico. TEAC = Trolox equivalente a capacidade antioxidante.

Foi observado que a condição de extração 3 (60 °C e 5 min), foi que apresentou melhor resposta para todos os compostos bioativos extraídos e capacidade antioxidante pelo método de ultrassom.

O teor de fenólicos totais presentes no extrato de Ingá na melhor condição foi de 210,98 mg EAG. g⁻¹, desse modo apresentado diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Nos estudos de Souza et al. (2008) foi encontrado um teor de 44,2 mg EAG. g⁻¹, nas folhas secas de *Inga edulis*, sendo que a mostra foi extraída com metanol por agitação, e mantida por 3 h no escuro à temperatura ambiente.

A aplicação do ultrassom nas extrações causa o fenômeno da cavitação acústica. Esse fenômeno está presente quando ondas acústicas de alta intensidade são geradas em um fluido. O mecanismo de extração envolve dois tipos de fenômenos físicos, a difusão através das paredes celulares e lavagem do conteúdo das células depois que as paredes são quebradas. Ambos os fenômenos são significativamente afetados pela radiação ultrassônica. A cavitação induzida por ultrassom aumenta a permeabilidade dos tecidos das plantas e aumenta o processo de transferência de massa, otimizando o tempo de extração, e dispensando o uso de altas temperaturas para extração de compostos bioativos (Gaete-Garretón et al. 2011).

Com o objetivo de avaliar estatisticamente o efeito e a interação entre as variáveis independentes, na figura 1 (A) no diagrama de Pareto, são apresentados os resultados dos efeitos da temperatura e do tempo na extração do teor de fenólicos totais.

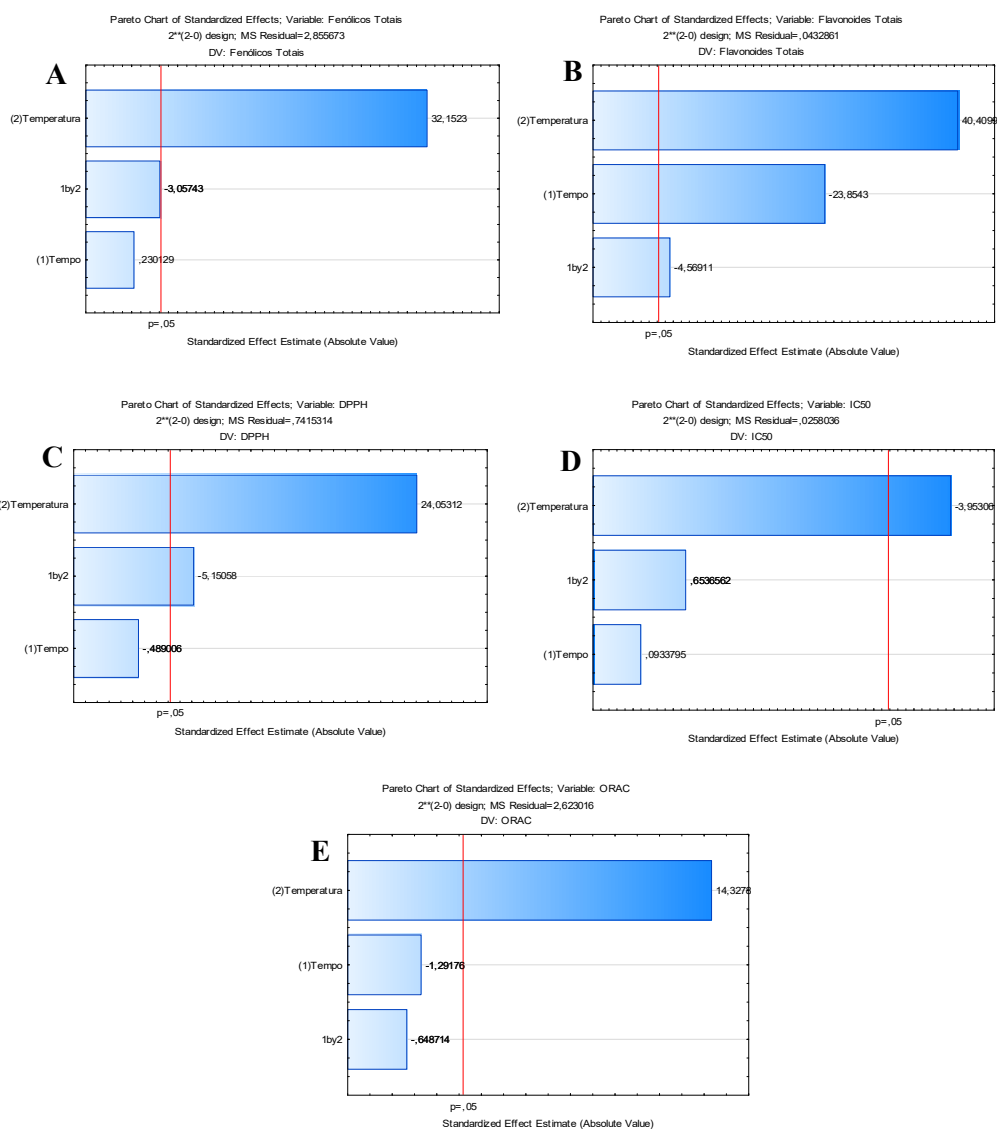


Figura 1. Diagrama de Pareto, efeito do tempo e temperatura sobre os teores de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), e atividade antioxidante DPPH (C) IC₅₀ (D) e ORAC (E) na extração assistida por ultrassom.

De acordo com os dados mostrados na figura 1, não houve interação entre as duas variáveis tempo e temperatura, somente a temperatura foi a variável que apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) e influenciou positivamente nos resultados, indicando que com a elevação da temperatura aumentou o teor de fenólicos aumentou. Nos estudos de Silva et al. (2007b) foi avaliado que a temperatura apresentou uma correlação linear na extração de compostos fenólicos do *Inga edulis* na temperatura de 15 a 65 °C, sendo assim, os autores

concluíram que com o aumento da temperatura, elevou-se também a quantidade de compostos fenólicos extraídos, semelhante ao resultado deste trabalho.

Segundo Wang et al. (2008), a temperatura tem efeito positivo nos resultados pois com o aumento da temperatura durante a extração, ocorre um aumento da permeabilidade das paredes celulares, as quais são enfraquecidas, facilitando assim o processo de difusão e de transferência de compostos fenólicos. Além disso, ocorre também o aumento da solubilidade dos compostos fenólicos e o decréscimo da viscosidade dos extratos, acelerando ainda mais a extração.

Segundo o Diagrama de Pareto, que pode ser visto na figura 1, somente para a determinação dos flavonoides totais é que houve interação entre o tempo e temperatura, sendo que a condição 1 apresentou (10,54 mg EQ. g⁻¹) a condição 2 (6,53 mg EQ. g⁻¹), a condição 3 que obteve melhor rendimento (19,90 mg EQ. g⁻¹), a condição 4 (13,01 mg EQ. g⁻¹) e a condição 5 referente ao ponto central apresentou (12,76 mg EQ. g⁻¹) flavonoides no extrato de Ingá. Segundo Silva et al. (2007a), trabalhando com *Inga edulis*, foram encontrados teores de flavonoides totais de 13,8 mg EQ. g⁻¹ do extrato, empregando a temperatura de 58 °C e no tempo de 47 min, comprovando que com o aumento da temperatura aumenta o teor de flavonoides. Na pesquisa de Zhang et al. (2019), os autores trabalharam com a *Angelica keiskei*, planta comestível japonesa, na qual foi observado que a temperatura do ultrassom teve efeito significativo no teor de flavonoides totais nos extratos à medida que a temperatura ultrassônica aumentou continuamente de 30 °C para 70 °C. No entanto, o teor começou a diminuir quando a temperatura excedeu a 70 °C. Assim, os autores afirmam que temperaturas acima de 70 °C são favoráveis à desnaturação dos flavonoides, ocorrendo degradação térmica. Outro fator que os autores analisaram foi o tempo que teve efeito significativo, sendo que o teor de flavonoides foi maior em um tempo de extração de 6 min e depois diminuiu quando a extração foi prolongada para 60 min.

Na figura 1 (B) no diagrama de Pareto, para flavonoides totais houve interação entre tempo e temperatura com efeito significativo ($p < 0,05$). A temperatura foi a variável que apresentou maior efeito significativo e positivo sobre a extração, indicando que com aumento da temperatura ocorre maior extração de flavonoides totais. O tempo de extração também teve efeito significativo, mas em certo tempo foi negativo na extração, indicando que com o aumento do tempo foi observado um decréscimo no teor de flavonoides. Como houve interação entre tempo e temperatura, foi gerado o gráfico da superfície de resposta, mostrado na Figura 2.

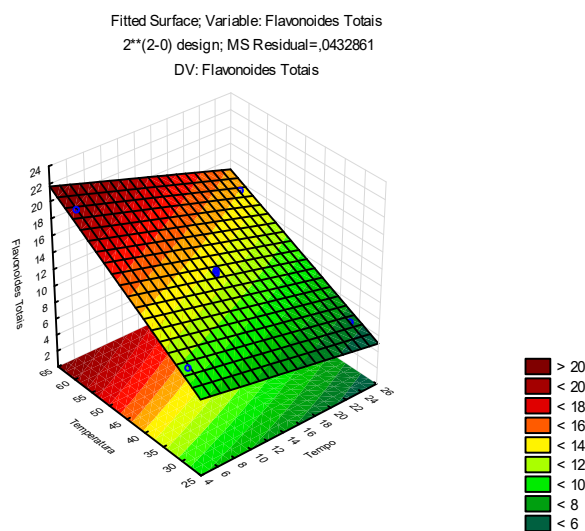


Figura 2. Superfície de resposta para a variável dependente flavonoides totais sobre as variáveis independentes, tempo (minutos) e temperatura (°C), na extração assistida por ultrassom.

É possível observar no gráfico da Figura 2 a influência do efeito das variáveis independentes (tempo e temperatura) sobre a variável resposta (teor de flavonoides totais). Assim, quando se aumenta a temperatura para 60 °C, maior é o teor de flavonoides. Já para a variável independente (tempo) houve efeito, foi significativo, porém, com influência negativa, tendo em vista que quando chega-se em um determinado intervalo, ocorre redução no teor de flavonoides totais presentes no extrato.

Como foi gerado o gráfico de superfície de resposta para a determinação de flavonoides, é importante obter a verificação da análise de variância (ANOVA) e o teste de falta de ajuste (Tabela 3).

Tabela 3. ANOVA, teste de falta de ajuste para compostos flavonoides totais por ultrassom.

	SS	Df	MS	F	P	R ² (ajustado)
Flavonoides						0,98
(1) Tempo	24.63100	1	24.63100	818.939	0.001219*	
(2) Temperatura	70.68450	1	70.68450	2350.140	0.000425*	
1x2	0.90367	1	0.90367	30.046	0.031708*	
Falta de Ajuste	0,06970	1	0,06970	2.318	0.267350	
Erro Puro	0.06015	2	0,03008			
Total SS	96.34903	6				
Regressão	95.31550	2	47.65775	184.4462	0.000115*	
Residual	1.03353	4	0.25838			

(*) Houve efeito significativo considerando 95% de significância.

O valor de R² obtido foi de 0,98 (Tabela 3) indicando que este modelo é adequado e demonstra um bom ajuste aos dados. Os resultados da ANOVA e do teste de falta de ajuste demonstram a significância estatística do modelo na explicação das variações experimentais, nessa análise deve-se observar o valor de p da falta de ajuste. Visto que não foi significativo, indicando que não há falta de ajuste nesse modelo em um nível de confiança de 95%, nesse caso sendo preditivo.

Diversas técnicas são utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos. Neste estudo, a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH e ORAC, e os resultados da extração assistida por ultrassom podem ser visto na Tabela 2. Pelo método DPPH a melhor condição de extração foi a 3 (60 °C a 5 min), na qual foram obtidos a concentração de 44,98 µmol TEAC.g⁻¹, apresentando diferença estatística significativa

($p < 0,05$) entre os tratamentos. Nos estudos de Silva et al. (2013) foi encontrado um teor de $18,34 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ de no fruto de *Inga edulis*, esse menor valor encontrado pode ser explicado pelo fato de que outro método de extração foi empregado (convencional), além disso espécie diferente de Ingá foi estudada no tempo 45 min a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

A determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, mostrou que o aumento da temperatura influencia positivamente nos resultados, confirmando o menor IC_{50} . Conforme Figura 1 (C), pode ser visto no diagrama de Pareto, que somente a variável temperatura teve efeito significativo ($p < 0,05$) e positivo, na extração dos compostos antioxidantes. A Tabela 2 mostra que a condição 3 ($60 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5 min), apresentou IC_{50} de $0,90 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, o qual é considerado um valor baixo de IC_{50} , consequentemente obtendo uma alta atividade sequestradora de radicais livres no extrato. Na figura 1 (D) está sendo mostrado o Diagrama de Pareto e seus efeitos na atividade antioxidante, referente ao IC_{50} mostrando que não houve interação entre as variáveis, e somente a temperatura teve efeito significativo ($p < 0,05$) na extração.

O ORAC é um método amplamente utilizado para investigar as propriedades antioxidantes *in vitro* nos alimentos. A condição que apresentou maior conteúdo de compostos antioxidantes foi a 3 ($60 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5 min) com $151,25 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$. Nos estudos de Silva et al. (2007b), para o extrato do fruto de *Inga edulis* foi encontrado um valor de $17,50 \mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$, sendo que neste trabalho, os extratos foram submetidos a extração sem agitação por 24 horas a temperatura ambiente. De acordo com Corbin et al. (2015), o efeito de cavitação acústica produzida pelo ultrassom facilita a penetração do solvente nas paredes celulares da matriz vegetal, permitindo assim, que o conteúdo intracelular seja liberado de forma mais eficiente, e a agitação do solvente aumenta a área de contato entre o solvente e os compostos alvo, permitindo a maior penetração do solvente na matriz da amostra, promovendo mais rapidamente a extração. A extração assistida por ultrassom apresenta

inúmeras vantagens, principalmente em relação a redução do tempo de extração, e a obtenção de maiores concentrações de compostos bioativos (Khan et al. 2010).

Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para ORAC entre as condições 1 e 2 pois a temperatura é a mesma, variando apenas o tempo de 5 para 25 min, respectivamente. Já entre as condições 3, 4 e 5 houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$), pois a temperatura aumentou de 45 para 60 °C. Segundo Ying et al. (2011) ocorre aumento na extração quando a temperatura varia de 40 a 60 °C e isso se deve ao fenômeno de cavitação acústica e da difusão através das paredes celulares do fruto que ocorre no ultrassom, sendo que estes dois fenômenos são significativamente aprimorados pela temperatura de extração.

Os efeitos do tempo e da temperatura na análise de ORAC podem ser vistos no diagrama de Pareto Figura 1 (E). Como pode ser observado não houve interação entre estas variáveis pelo método de ORAC, sendo que somente a temperatura foi a variável que apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), influenciando positivamente nos resultados, indicando que com a elevação da temperatura, aumenta o teor de compostos antioxidantes.

3.2 Compostos Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos por micro-ondas focalizado

A partir dos resultados mostrados da Tabela 2, é possível verificar que a condição 4 (25 min e 60 °C), foi a que apresentou melhor resposta para todas as determinações dos compostos bioativos, e capacidade antioxidante.

Somente para fenólicos totais segundo o Diagrama de Pareto, que pode ser visto na Figura 3 (A), que apresentou interação entre o tempo e temperatura.

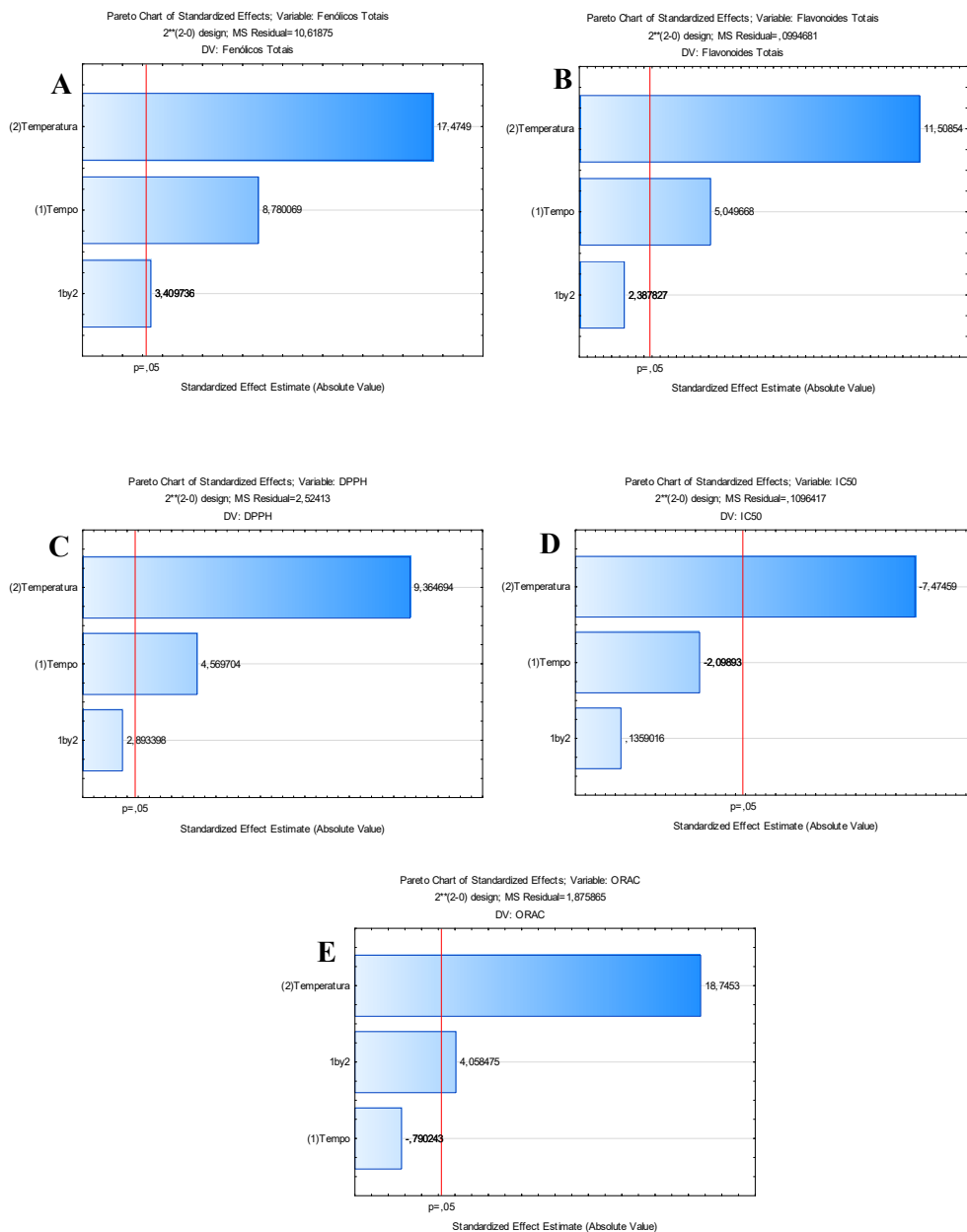


Figura 3. Diagrama de Pareto, efeito do tempo e temperatura sobre os teores de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), e atividade antioxidante DPPH (C) IC₅₀ (D) e ORAC (E) na extração assistida por micro-ondas focalizado.

Sendo que a condição 1 apresentou (120 mg EAG. g⁻¹) a condição 2 (137,61 mg. EAG g⁻¹), a condição 3 (165,94 mg. EAG g⁻¹), a condição 4 que apresentou melhor rendimento (205,66 mg EAG. g⁻¹) e a condição 5 referente ao ponto central que apresentou (154,80 mg EAG. g⁻¹) de fenólicos no extrato de Ingá. O estudo de Silva et al. (2007a) encontraram o

valor de 125,30 mg EAG. g⁻¹ de compostos fenólicos foram obtidos na temperatura de 58,2 °C e tempo de 46,8 min em extrato de folhas *Inga edulis*, em extração de sólido-líquido. Com o aumento da temperatura, o rendimento de extração dos compostos fenólicos, é maior de fato, uma temperatura mais alta aumenta o coeficiente de solubilidade e difusão dos fenóis, permitindo maior concentração de compostos, com isso tendo efeito positivo na extração. No entanto, um limite superior deve ser respeitado para evitar a degradação dos fenólicos termossensíveis. Na análise de fenólicos totais, houve interação entre as duas variáveis independentes temperatura e tempo com efeito significativo e positivo ($p < 0,05$), como pode ser observado na figura 3 (A), no Diagrama de Pareto.

A temperatura foi a variável que apresentou maior efeito sobre a extração, indicando que o aumento da temperatura levou a uma maior extração dos compostos. Como pode ser observado durante a extração por micro-ondas focalizado, o aquecimento tem um papel importante e com isso, o tempo pode ser reduzido para obtenção de fenólicos em maiores concentrações (Medina et al. 2015). Esse sistema de extração consiste em um processo em que a radiação de micro-ondas pode ser focalizada diretamente na amostra. Com isso, este método permite o aquecimento ser mais eficiente e, portanto, oferece uma homogeneidade e uma entrega rápida de energia a um volume total de solvente, proporcionando melhor reprodutibilidade (Chaturvedi, 2018).

A Figura 4 mostra a influência das variáveis independentes (tempo e temperatura) na variável resposta (fenólicos totais). O gráfico de superfície de resposta para o teor de fenólicos totais demonstrou que, quanto maior a temperatura mais eficaz é a extração destes compostos, e neste caso, para a variável independente (tempo) foi significativo, pois com o aumento do tempo para 25 min foi obtido um maior teor dos fenólicos totais presentes no extrato de Ingá.

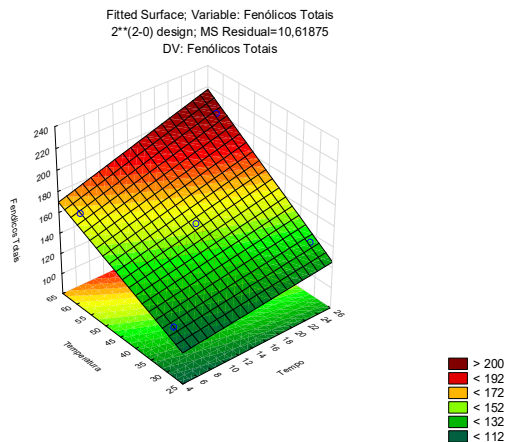


Figura 4. Superfície de resposta para a variável dependente compostos fenólicos totais sobre as variáveis independentes, tempo (minutos) e temperatura (°C), na extração assistida por micro-ondas focalizado.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), e o teste de falta de ajuste na Tabela 4, o coeficiente de determinação R^2 representa o poder preditivo da sua reta de regressão. O valor de R^2 obtido para os compostos fenólicos totais foi de 0,94 indicando que este modelo é adequado e demonstra um bom ajuste do modelo aos dados. Os resultados da ANOVA e do teste de falta de ajuste demonstram a significância estatística do modelo na explicação das variações experimentais, nessa análise deve-se observar o valor de p da falta de ajuste. Visto que o p-valor para o teste de falta de ajuste não foi significativo ($p < 0,05$), assim indicando que não há falta de ajuste nesse modelo em um nível de confiança de 95%, nesse caso sendo, portanto, preditivo.

Tabela 4. ANOVA, teste de falta de ajuste para os compostos fenólicos totais por micro-ondas focalizado.

	SS	dF	MS	F	p	R2 (ajustado)
Fenólicos Totais						0.94
(1) Tempo	818.596	1	818.596	228.9712	0.004339*	
(2) Temperatura	3242.670	1	3242.670	907.0144	0.001101*	
1x2	123.457	1	123.457	34.5324	0.027758*	
Falta de Ajuste	24.706	1	24.706	6.9106	0.119348	
Erro Puro	7.150	2	3.575			
Total SS	4216.578	6				
Regressão	4061.265	2	2030.633	52.29780	0.001357*	
Residual	155.313	4	38.828			

(*) Houve efeito significativo considerando 95% de significância.

Na a determinação dos flavonoides totais, a melhor forma de extração foi a condição 4 (25 min a 60 °C), no qual foi obtido um teor de 13,24 mg EQ. g⁻¹ (Tabela 2). Não houve diferença estatística significativa (p<0,05) entre as condições 1 e 2, o que pode ser explicado pelo fato de que a temperatura empregada (30 °C) é a mesma. No estudo de Silva et al. (2007a) foi encontrado valor de flavonoides totais de 14,7 mg EQ. g⁻¹ nos extratos *Inga edulis* nas condições de temperatura de 58,2 °C e no tempo de 46,8 min. Para os flavonoides totais (Figura 3B) não houve interação entre as duas variáveis independentes (tempo e temperatura). A temperatura foi a variável que apresentou maior efeito significativo e positivo (p<0,05), indicando que a elevação da temperatura aumentou o teor de flavonoides presente no extrato.

Sabe-se que em temperaturas baixas poucos compostos são extraídos e, à medida que a temperatura é elevada o processo de extração é acelerado. Porém, temperaturas muito altas podem acarretar na degradação dos compostos bioativos diminuindo assim o rendimento da extração (Khoddami et al. 2013). O tempo também foi significativo e teve efeito positivo em relação a extração, porém quando a extração é realizada por um período muito longo, pode aumentar a possibilidade de oxidação dos flavonoides (Andreo e Jorge, 2006).

Na concentração de compostos antioxidantes pelo método de DPPH, a melhor extração foi na condição 4 com 25 min a 60 °C, onde apresentou um teor de 37,99 $\mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$, diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Na figura 3 (C) é mostrado o diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes em relação à atividade antioxidante pelo método de DPPH. É possível observar que não houve interação entre as duas variáveis tempo e temperatura, sendo que a temperatura foi a variável que apresentou maior efeito significativo e positivo ($p < 0,05$). O tempo também apresentou efeito significativo e positivo ($p < 0,05$), comprovando que com o aumento do tempo e da temperatura o teor de compostos antioxidante foi maior. As micro-ondas podem proporcionar uma elevada quantidade de energia, auxiliando a ruptura celular mais rapidamente, o que resulta na lixiviação do analito alvo através da entrada de solvente de extração na matriz do material (Chan et al. 2011). O menor tempo de extração obtido no método empregando micro-ondas e conseqüentemente a redução da exposição do material vegetal a altas temperaturas, implicam na menor degradação dos compostos bioativos e tornam essa técnica muito eficaz e rápida (Vuong et al. 2013).

Em relação ao IC_{50} (figura 1 D), foi verificado que não houve interação entre as variáveis tempo e temperatura, sendo que somente a temperatura teve efeito significativo, porém, negativo ($p < 0,05$). Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$), sendo a condição 4 (25 min a 60 °C) foi a que mostrou melhor teor de IC_{50} (0,98 mg. mL^{-1}). Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método de ORAC apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, sendo que a condição 4 (25 min a 60 °C) foi a melhor, na qual foi obtido um valor de 145,45 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$. Foi verificada no diagrama de Pareto Figura 1 (E) que a temperatura foi a variável que apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) e influenciou positivamente nos resultados, indicando que com a elevação da temperatura houve um aumento na extração dos compostos antioxidantes.

3.3 Caracterização química por espectrometria de massa

Foi realizada a caracterização por espectrometria de massa por tempo-de-voe de alta resolução, na qual foram identificados 11 compostos nos extratos (Tabela 5). É importante observar que não houve diferença quanto aos compostos químicos identificados dos compostos em relação ao método de extração ultrassom, em comparação ao método empregando micro-ondas.

Tabela 5. Identificação dos principais compostos bioativos das cascas e polpas de *Inga marginata* Willd por ESI-TOF-MS, pelos dois métodos de extração (ultrassom e micro-ondas) modo positivo e negativo de identificação.

Nº	Massa experimental (m/z)	Massa Teórica (m/z)	Erro puro (ppm)	Possível estrutura molecular	Compostos
1	577.1373	577.1405	5.5	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₇	Procianidinas (Willian et al. 2018)
2	521.2656	521.2692	6.9	C ₃₅ H ₃₈ O ₄	Dibenzoyl avarol (Amigó et al. 2004)
3	475.1278	475.1240	8	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	6,4'-dimetoxi-5-hidroxilona 7-glucoside (Kaššák, 2012)
4	441.0778	441.0763	3.4	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	Galato de epicatequina (Xie et al. 2018).
5	377.0854	377.0873	5	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	Ácido cafeico (Toth et al. 2014)
6	341.1075	341.1084	2.6	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose (Hussain et al. 1990).
7	267.0712	267.0716	1.5	C ₉ H ₁₆ O ₉	Glucuronosil glicerol (Stark et al. 2017).
8	255.2341	255.2324	6.7	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido palmítico (Nwozo et al. 2013).
9	195.0500	195.0505	2.6	C ₆ H ₁₂ O ₇	ácido glucônico (Felipe et al. 2014).
10	191.0205	191.0192	6.8	C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico (William et al. 2018)
11	133.0137	133.0137	0	C ₄ H ₅ O ₅	Ácido málico (Lin et al. 2014).

*m/z: razão massa (m) sobre a carga (z).

Foram encontrados nos extratos da fração casca e polpa de Ingá, alguns compostos identificados como fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), com propriedades reconhecidas

como antioxidantes, e também com atividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antidiarreicas já relatadas em várias espécies desse gênero (Daniel et al. 2014).

Dentro do grupo dos fenóis, as procianidinas são derivadas das proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados (Lin et al. 2014; Qiang et al. 2015). Além das propriedades antioxidantes, foi relatado que estes compostos apresentam efeito anticâncer, anti-infeccioso, anti-inflamatório cardioprotetor e atividades antialérgicas (Martin et al. 2013). Nos estudos de Lokvam et al. (2004) em extratos de *Inga umbellifera*, foram descritos algumas procianidinas, com efeitos antioxidantes.

O galato de epicatequina e o ácido cafeico são ácidos fenólicos importantes na atividade antioxidante e em relação aos benefícios para a saúde. Dentre os flavonoides o galato de epicatequina tem elevada atividade antioxidante, e foi identificado no extrato de chás ou cascas de frutos, possuindo também atividade anti-inflamatória (Xie et al. 2018). O ácido cítrico e málico são ácidos orgânicos encontrados em vários frutos. Eles contribuem para a acidez e aroma característico das frutas, devido aos seus componentes voláteis, sendo esse ácido muito utilizado em alimentos, pelo alto poder antioxidante (Santos et al. 2016).

O ácido glucônico ocorre naturalmente em frutas, mel e vinho, têm amplas aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, trazendo compostos acidulantes e que preservem o alimento (Amin et al. 2010). O ácido palmítico, também foi encontrado nos extratos do óleo essencial de casca de caule *Inga laurina* (Furtado et al. 2014). Os óleos essenciais de muitas espécies vegetais diferentes mostraram atividades biológicas, como efeitos antiespasmódicos, antinociceptivos, antioxidantes, antiinflamatórios, imunomoduladores. Atividades antidiabéticas, antivirais e antitumorais também foram observadas (Edris, 2007).

A sacarose também foi identificada nesse extrato e pode estar associada a polpa do Ingá, onde também foi identificada no *Inga spectabilis* (Hussain et al. 1990).

Somente um composto desconhecido nas plantas e frutos que foi identificado neste trabalho no extrato de Ingá, que foi o Dibenzoil avarol, derivado de uma proteína que possui propriedades farmacológicas, incluindo ações anti-inflamatórias, antitumorais e antivirais (Amigó et al. 2004). Em testes e análises preliminares foi encontrado um alto teor de proteínas nas cascas do *Inga marginata* Willd.

4. Conclusões

O extrato do Ingá (*Inga marginata* Willd) pode ser considerado uma fonte natural de compostos bioativos, com compostos de interesse. Na extração assistida por ultrassom a melhor condição foi na temperatura de 60 °C por 5 min, a temperatura teve efeito significativo, sendo que à medida que a temperatura foi aumentando, maior foi a quantidade de compostos bioativos extraídos. Na extração por micro-ondas focalizada a melhor condição foi na temperatura de 60 °C por 25 min. Neste método o tempo e a temperatura tiveram efeito significativo, à medida que a temperatura e o tempo de extração foram aumentados maior foi o teor de compostos extraídos. Essas tecnologias de extração verde possibilitam extrair compostos bioativos sem requerer altas temperaturas, as quais podem degradar alguns compostos empregando menor tempo de execução. O método de ultrassom foi melhor que o micro-ondas focalizada, com maior teor de compostos em menor tempo de extração.

Em relação a caracterização química dos compostos, foram identificados 11 compostos de interesse que estão presentes nos extratos, e que comprovam a ação dos compostos bioativos dessa matéria prima.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finanças Código 001.

Referências

- Amigó, M., Terencio, M.C., Mitova, M., Iodice, C., Payá, M., De Rosa, S. 2004. Potential Antipsoriatic Avarol Derivatives as Antioxidants and Inhibitors of PGE2 Generation and Proliferation in the HaCaT Cell Line. *Journal of Natural Products*. 67 (9), 1459-1463. <https://doi.org/10.1021/np049873n>.
- Amin, M.A., Rehim, S.S.A.E., El-Lithya, A.S. 2010. Pitting and pitting control of Al in gluconic acid solutions – Polarization, chronoamperometry and morphological studies. *Corrosion Science*, 52 (9), 3099-3108. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2010.05.032>.
- Andreo, D., Jorge, N. 2006. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24 (2), 319-336. <https://doi.org/10.5380/cep.v24i2.7489>.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Kouba, M., Sant'ana, A. S., Orlie, V. 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and byproducts: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>.
- Bender, B., E. S. Capellessoa., M. E. Lotticia., J. Sentkovskia ., A. A. Mielniczki-Pereirab.,L. M. G. Rosac., T. L. 2017. Sause Growth responses and accumulation of soluble sugars in *Inga marginata* Wild. (Fabaceae) subjected to flooding under contrasting light conditions. *Brazilian Journal of Biology*, 77 (2), 260-266 . <https://doi.org/10.1590/1519-6984.11315>.
- Bittencourt, M.L.F., Ribeiro, P.R., Franco, R.L.P., Hilhorst, H.W.M., DE Castro, R.D., Fernandez, L.G. 2015. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, 76,449-457. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.008>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

- Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.C., Kung, F.W.L. 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218 (37), 6213-6225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>.
- Chaturvedi, A.K. 2018. Extraction of Nutraceuticals from Plants by Microwave Assisted Extraction. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 9 (1). <https://doi.org/10.5530/srp.2018.1.6>.
- Chemat, F., Huma, Z., Khan, M. K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A, Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J. P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., Hano, C. 2015. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrason Sonochem*, 26,176-185. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.008>
- Costa, L.M., Korn, M.G., Castro, J.T. 2006. Factorial design applied to the digestion bean samples assisted by microwave radiation. *Chemical New*, 29 (1), 149-152, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100026>.
- Daniel, J. F. S., Iwasso, D. R., Florini, M. A., Rieger, S. C., Faria, T. J., Andrei, C. C., Rezende, M. I., Barbosa, A. M. 2014. Antimicrobial activity of Brazilian plants of the genera Leguminosae and Myrtaceae. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8 (28), 958–966. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2014.5385>.
- Edris A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 21(4), 308–323. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2072>.
- Embuscado, M.E. 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review (Review). *Journal of Functional Foods*. 18, p. 811-819. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.005>.
- Felipe, D.F., Brambilla, L.Z.S., Porto, C., Pilau, E.J., Cortez, D.A.G. 2014. Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/MS. *Molecules*, 19,15720-15734. <https://doi.org/10.3390/molecules191015720>.
- Furtado, F.B. de Aquino F.J., Nascimento, E.A., De Martins, C., De Moraes, S.A., Chang, R., Cunha, L.C., Leandro, L.F., Martins, C.H., Martins, M.M., Da Silva, C.V., Machado, F.C., De Oliveira, A. 2014. Seasonal Variation of the Chemical Composition and Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from *Inga laurina* (Sw.) Willd. *Molecules*, 19 (4), 4560–4577. <https://doi.org/10.3390/molecules19044560>.

- Gaete-Garretón, L., Vargas-Hernández, Y., Cares-Pacheco, M.G., Sainz, J., Alarcón, J. 2011. Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. *Ultrasonics*, 51, 581-585. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2010.12.012>.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15, 8813-8826. <https://doi.org/10.3390/moléculas15128813>.
- Hussain, R. A., Lin, Y., Poveda, L. J., Bordas, J., Chung, B., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D., Kinghorn, D. 1990. Plant-derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 28, 103-115. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90067-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90067-4).
- Jacotet-Navarro, M., N. Rombaut, S. Deslis, A.S. Fabiano-Tixer, F.X. Pierre, A. Bily, F. Chemat. 2016. Towards a "dry" bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green chemistry*, 18 (10), 3106-3115. <https://doi.org/10.1039/c5gc02542g>.
- Kassak, P. 2012. Secondary metabolites of the chosen genus iris species. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis*, 32(8), 269-280. <https://doi.org/10.11118/actaun201260080119>.
- Khan, M. K., ABert-Vian, M., Fabiano-Tixer, A. S., Dangles, O., Chemat, F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavonone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), p. 851-858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. (2013). "Techniques for analysis of plant phenolic compounds", *Molecules*, 18, 2328-2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>.
- Lima, N. M.; Santos, V. N. C., La Porta, F. A. 2018. Quimiodiversidade, Bioatividade e Quimiosistemática do Gênero *Inga* (FABACEAE): Uma Breve Revisão. *Revista Virtual Química*, 10 (3), 459-473.
- Lin, L-Z., Sun, J., Chen, P., Zhang, R.W., Fan, X.E., Li, L.W., Harnly, J.M. 2014. Profiling of Glucosinolates and Flavonoids in *Rorippa indica* (Linn.) Hiern. (Cruciferae) by UHPLC-PDA-ESI/HRMSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (26), 6118-6129. <https://doi.org/10.1021/jf405538d>.
- Lokvam, J., Coley, D. P., Kursar, A. T. 2004. Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae). *Phytochemistry*, 65, 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.012>

- Martin, M.A, Goya, L., Ramos, S. 2013. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food Chemistry Toxicologic*, v. 56, p.336–351. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.020>.
- Medina, A.L., Silva, M.A.O., Barbosa, H.S., Arruda, M.A.Z., Marsaioli, J.R., A., Bragagnolo, N. 2015. Rapid microwave assisted extraction of meat lipids. *Food Research International*, 78, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.028>.
- Moriwaki, M.T., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., Morey, A.T., Faria, T.J., Lonni, A.A.S.G. 2017. Microbiological and chemical fingerprint of standardized extracts of inga marginata. *Visão Acadêmica*, 18 (1), 4-13. <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v18i1.51279>.
- Noratto, G.D., Angel-Morales, G., Talcott, S.T., Mertens-Talcott, S.U. 2011. Polyphenolics from Açai (*Euterpe oleracea Mart.*) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (14), 7999-8012. <http://dx.doi.org/10.1021/jf201056x>.
- Nwozo, S.O., Ajayi, I.A., Iorliam, B.E. 2013. Preliminary Toxicological Evaluation of some Biochemical Parameters and Lipid Profile in Thevetia Neriifolia Seed Oil Supplemented Diet in Albino Rats. *Electronic Journal of Practices and Technologies*, 12 (22), 43-58.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4619-26. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.
- Qiang, L., Fenglei, L., Xiaoyong, Z., Yu, L., Xiang, L., Guibing, H., Chong, S., Kunsong, C. 2015. Identification of Proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and Their Antioxidant Activity. *PloS One*, v. 10, n. 3, p. 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120480>.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C, Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., Pastore, G.M. 2007. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Food Science and Technology*, 27, 53-60. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>.
- Santos, S.S., Pontes, A.R., Zago, T.A.S., Silva, L.A Melo, D.M., Alves, L.F De S. Saravy, T.M., Fakhouri, F.M., Altemio, A,D,C.; Pinedo, R.A. 2016. Redução da acidez utilizando diferentes tratamentos em cascas de maracujá (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para elaboração de farinha. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 18 (3), 237-242. ISSN: 1517-8595.

- Silva, E. M., Rogez, H., Larondelle, Y. 2007a. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 381-387. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.01.008>.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., Larondelle, Y. 2007b. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian Region. *Food Chemistry*, v.101,p. 1012-1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055>
- Silva, E.M., Rogez, H., Da Silva, I.Q., Larondelle, Y. 2013. Improving the desorption of *Inga edulis* flavonoids from macroporous resin: Towards a new model to concentrate bioactive compounds. *Food and Bioprocess Processing*, 91(4), 558-564 <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.11.005>.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144-158.
- Souza, J.N.S., Silva, E.M., Loir, A., Rees, Jean-François., Rogez, H., Larondelle, Y. 2008. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chemistry*, 106 (1), 331-339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.011>
- Sousa, S. J., Bastos, C. N. M., Gurgel, C. S. E. 2011. O gênero *Inga* (*Leguminosae Mimosoideae*) na Província Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas, Brasil. *Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 62 (2), 283–297. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201162206>.
- Stark, T.D., Lösch, S., Balemba, O.B., Hofmann, T. 2017. Two new benzoyl glucuronosyl glycerols from the leaves of *Garcinia buchananii* Baker. *Phytochemistry Letters*, 19, 187-190. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.033>.
- Toth, A., Toth, G., Kery, A. 2014. Polyphenol Composition and Antioxidant Capacity of Three *Lysimachia* Species. *Natural Product Communications*, 9 (10).
- Viceconti, M., Hunter, P., Hose, R. Ieee. 2015. *Journal Biomed Heal Informatics*. 19, 1209–15.
- Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., Scarlett, C. J. 2013. Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3 (3), 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.04.004>.
- Xie, H., Li, X., Ren, Z., Qiu, W., Chen, J., Jiang, Q., Chen, B., Chen, D. 2018. Antioxidant and Cytoprotective Effects of Tibetan Tea and Its Phenolic Components. *Molecules*, 23 (2), 179. <https://doi.org/10.3390/molecules23020179>.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N. Lan, C.Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 707-718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>.

- William, J., John, P., Mumtaz, M.W., CH, A.R., Adnan, A., Mukhtar, H., Sharif, S., Raza, S.A. Antioxidant activity, Hypoglycemic potential and metabolite profiling of *Hyophorbe indica* leaf extract. 2018. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31 (6), 2737-2742.
- Ying, Z., Han, X., Li, J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. 2011. *Food Chemistry*, 127 (3), 1273-1279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.083>.
- Zhang, L., Jiang, Y., Pang, X., Hua, P., Gao, X., Li, Q., Li, Z. 2019. Simultaneous Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction for Flavonoids and Antioxidant Activity of *Angelica keiskei* Using Response Surface Methodology (RSM). *Molecules*, 24 (19), doi.org/10.3390/molecules24193461.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64 (4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).

5 DISCUSSÃO

Pesquisas demonstram que os compostos bioativos atuam no organismo humano, sendo fundamentais na prevenção e amenização das patologias que são cada vez mais prevalentes (SOARES et al., 2015). Segundo Baslam, Garmendia, e Goicoechea (2011), há uma demanda crescente dos consumidores que buscam o bem-estar, em reduzir doenças e aumentar o tempo de vida. Nesse trabalho estudado foi abordado o fruto Ingá (*Inga marginata* Willd), o qual é considerado ainda desconhecido pela sociedade e pouco estudado por pesquisadores. É um fruto exótico, nativo e abundante, que possui compostos bioativos importantes para a saúde. Estudos relatam a presença de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides), saponinas, taninos, triterpenos, e atividade antioxidante nos extratos de espécies de Ingá (LIMA, 2015; MORIWAKI et al., 2017).

Com isso este trabalho teve como objetivo abordar aspectos sobre esse fruto, a citotoxicidade das frações (casca e polpa) e (semente), avaliar o tempo e a temperatura na determinação dos compostos bioativos e na capacidade antioxidante de Ingá por diferentes métodos de extração, e investigar a caracterização do perfil químico dos extratos. Foi estudada a toxicidade das frações do Ingá, pois é sabido que as partes como casca e semente de frutos podem conter substâncias tóxicas para o organismo humano. A avaliação citotóxica segundo Santos Junior et al. (2016) tem sido muito utilizada por pesquisadores, para a determinação do potencial de aplicação de extratos alimentícios ou de novos compostos isolados. Os extratos foram analisados pelo teste MTT e NRU devido à alta confiabilidade, e por praticidade. O extrato da fração casca e polpa do Ingá em todas as concentrações tanto para o teste MTT e NRU não foi citotóxico, já o extrato da semente foi citotóxica para os dois testes, diante disso somente a fração casca e polpa foi estudada nessa pesquisa.

A extração de compostos bioativos de tecido vegetal é muito estudada para a aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos. Os solventes metanol, e etanol, e suas combinações têm sido utilizados para a extração de fenóis, muitas vezes com diferentes proporções de água (DAI; MUMPER, 2010). Neste sentido, foi realizada a extração convencional (sólido-líquido), extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas focalizado para avaliar a influência do tempo e temperatura na extração. Os extratos obtidos através da extração sólido-líquido e por ultrassom apresentaram maior teor de fenólicos totais, quando extraídos na condição de 60 °C por 5 minutos, o que se confirmou para os flavonoides, e na determinação da capacidade antioxidante. A temperatura teve efeito significativo em todas as

determinações, isso pode ser explicado pois o calor torna a parede celular mais permeável e enfraquecida, aumentando a solubilidade dos compostos e o coeficiente de difusão do solvente, bem como o rendimento de extração (TABARAKI; HEIDARIZADI; BENVIDI, 2012).

Em outro estudo, Azevedo (2010) verificou que as condições ótimas de operação para a obtenção desses compostos estão na faixa de temperatura entre 50 °C a 60 °C. Com relação a temperatura de extração. Diversos estudos relatam que para uma eficiente extração de compostos bioativos a temperatura não pode ultrapassar os 70 °C, pois tem demonstrado que causa uma rápida degradação dos compostos. Já o tempo teve efeito significativo somente para a determinação de flavonoides totais havendo interação do tempo e temperatura tanto para extração sólido-líquido quanto para o ultrassom. O tempo não precisou ser maior que 5 minutos para as extrações sólido-líquido e ultrassom, pois com o aumento da temperatura para 60 °C aliado o processo de agitação, segundo Castro e Capote (2010), faz com que ocorra rapidamente o colapso da parede celular do extrato vegetal, ocorrendo a dissolução das substâncias presentes na amostra para o solvente extrator, e com isso, diminuindo o tempo de extração.

Já os extratos obtidos pelo método empregando o equipamento de micro-ondas focalizado, apresentaram maior teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante na condição de 60 °C por 25 minutos. O tempo e a temperatura tiveram efeito significativo, sendo que à medida que a temperatura e o tempo de extração foram aumentados, maior foi o teor de compostos bioativos presentes no extrato, ocorrendo a interação da temperatura com o tempo na determinação de fenólicos totais. Na extração por micro-ondas os principais fatores que podem ser envolvidos para eficiência do processo são temperatura, ligação química, estrutura molecular, tamanho da amostra, polarização, capacidade calorífica e constante dielétrica (TSUKUI; REZENDE, 2014).

Deste modo, essa pesquisa contribuiu para determinar em quais condições de extração que proporcionam maior teor dos compostos bioativos, tanto pelo método de extração convencional, micro-ondas focalizado e ultrassom. São considerados métodos de extrações ideais em processos industriais aqueles que fornecerem altas taxas de extração e economia de tempo (ROMBAUT et al., 2014).

Além da determinação dos compostos bioativos foram caracterizados os compostos químicos pelos diferentes métodos de extração. Nos extratos obtidos pelo método convencional (sólido-líquido), foram identificados 7 compostos, obtendo 1 composto diferente dos que foram encontrados para extração por ultrassom e micro-ondas focalizado, os

quais obtiverem 11 compostos de interesse identificados, e não obtiveram diferenças na caracterização. A caracterização química dos extratos por ESI-TOF-MS, foi escolhida pois essa técnica possibilita a protonação e a desprotonação de moléculas de diferentes massas molares, facilitando a identificação de diversos compostos (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013). Sendo que a caracterização por TOF possibilita analisar as faixas de m/z ilimitadamente, oferece também alta transmissão de íons, facilitando a sensibilidade, e permite medições com alta precisão (SKOOG et al.,2010).

Deste modo, os extratos obtidos da fração casca e polpa apresentaram alto potencial para ser uma fonte natural de compostos bioativos, podendo ser utilizado pela indústria de alimentos como uma fonte natural destes compostos ou como ingrediente em produtos alimentícios, apresentando muitos benefícios a saúde humana.

6 CONCLUSÃO

Em geral, com base nos resultados apresentados nos manuscritos, pode-se concluir que o extrato da casca e polpa do *Inga marginata* Willd pode ser utilizado como fonte de obtenção dos compostos bioativos, pois não apresentou morte celular nas concentrações testadas, obtendo viabilidade celular próximo à 100%.

Na extração pelo método convencional por sólido-líquido e pelo método empregando o ultrassom foram obtidos maior teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante na condição de extração com temperatura de 60 °C no tempo de 5 minutos. A temperatura teve efeito significativo para todas as determinações já o tempo teve efeito significativo somente para flavonoides.

Na extração por micro-ondas focalizado, a melhor condição foi na temperatura de 60 °C por 25 minutos. Neste método o tempo e a temperatura tiveram efeito significativo, sendo que à medida que a temperatura e o tempo de extração foram elevados, maior foi o teor de compostos extraídos, e houve interação das variáveis estudadas para a determinação dos compostos fenólicos.

Os compostos químicos obtidos na extração por ultrassom e micro-ondas focalizado, foram caracterizados, sendo que foram identificados 11 compostos de interesse. Já nos extratos obtidos pela extração convencional foram identificados 7 compostos que estão presentes no extrato de Ingá.

Com isso, com base nos resultados o melhor método de extração para o fruto em estudo o *Inga marginata* Willd, é pelo método de extração assistida por ultrassom. Pois além de conseguir extrair um alto teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante, em menor tempo, ou seja, em apenas 5 minutos, ainda é considerado método de tecnologia limpa e verde de extração. Possibilitando extrair os compostos sem altas temperaturas que pudessem degradar os compostos, além disso, permitem a extração em um tempo relativamente curto quando comparado com outros tipos de extrações. Logo, com a alta disponibilidade e o baixo custo de obtenção do fruto, este pode ser considerado uma promissora fonte natural de obtenção de extratos ricos em compostos bioativos. Podendo ser mais pesquisado para conhecimento do mundo acadêmico e por indústrias, e ser utilizado em formulações alimentícias, trazendo muitos benefícios para a saúde.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. **Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente**. 3. ed. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2013.92p.
- ALUPULUI, A.; CĂLINESCU, I.; LAVRIC, V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **U.P.B. Science Bulletin**, Series B, v. 74 n. 2, p. 129-142, 2012.
- AMEER, K., SHAHBAZ, H.M., KWON, J. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 295-315, 2017.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- AYALA-ZAVALA, J.F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J.A.; WASIM SIDDIQUI, M.D.; DÁVILA-AVIÑA, J.E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v.44, p. 1866-1874, 2011.
- AZEVEDO, J.C.S. **Estratégias de obtenção do corante do jambo vermelho (*Syzygium malaccense*) e avaliação de sua funcionalidade**. 2010. 101p. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, n. 99, p.191–203, 2006.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.4, n.23, p.629-643, 2010.
- BASLAM, M., GARMENDIA, I., GOICOECHEA, N. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.10, p.5504–5515, 2011.
- BATAGLION, G. A.; DA SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 66, p. 396-400, 2014.
- BENDER, B.; CAPELLESSO, E.S.; LOTTICIA, M.E.; SENTKOVSKI, J.; MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.; ROSA, L.M.G.; SAUSEN, T.L. Growth responses and accumulation of soluble sugars in *Inga marginata* Wild. (*Fabaceae*) subjected to flooding under contrasting light conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 260-266, 2017.
- BHATIA, S.K.; YETTER, A.B. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biology and Toxicology**, v. 24, n.4, p.24-315-319, 2008.

BOURAS, M.; CHADNI, M.; BARBA, F. J.; GRIMI, N.; BALS, O.; VOROBIEV, E. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 590-601, 2015.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 211-247, 2011.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n.4, p. 229-247, 2000.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 100-104, 2012.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

CASTRO, A.C.C.M.; ODA, F. B.; ALMEIDA-CINCOTTO, M. G.J.; DAVANÇO, M. G. CHIARI-ANDRÉO, B. G.; CICARELLI, R. M.B. PECCININI, R. G.; ZOCOLO, G. J. RIBEIRO, P. R.V.; CORRÊA, M. A. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v.246, n.1, p. 48-57, 2018.

CAVALHEIRO, C.V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L. Santa Maria – RS.** 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

CHEMAT, F.; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

COSTA, A.G.V.; GARCIA-DIAZ, D.F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P.I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. **Journal of functional foods**, v.5, n.1, p. 539 –549, 2013.

DAI, J., MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, n.10, p.7313–7352, 2010.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review (Review). **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811-819, 2015.

ESCLAPEZ, M. D.; GARCÍA-PÉRES, J.V.; MULET, A.; CÁRCEL, J.A. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p.108–120, 2011.

FALLER, A.L.K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods Word**, v. 45. n. 5, p. 208-213, 2000.

FRESHNEY, R. I. **Culture Of Animal Cells: A Manual Of Basic Technique And Specialized Applications**. 6^a ed. 2010.

GALAN, A. M.; CALINESCU, I.; TRIFAN, A.; WINKWORTH-SMITH, C.; CALVOCARRASCAL, M.; DODDS, C.; BINNER E. New insights into the role of selective and volumetric heating during microwave extraction: Investigation of the extraction of polyphenolic compounds from sea buckthorn leaves using microwave-assisted extraction and conventional solvent extraction. **Chemical Engineering and Processing**, v. 116, p. 29-39, 2017.

HARIHARAKRISHNAN, J.; SATPUTE, R.M.; PRASAD, G.B.K.S.; BHATTACHARYA, R. Oxidative stress mediated cytotoxicity of cyanide in LLC-MK2 cells and its attenuation by alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine. **Toxicology Letters**, v. 185, n.2, p.132-141, 2009.

JACOB V. P. **Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17B-estradiol**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade da Covilhã, Portugal. 2011.

KAPPE, C.O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S. **Practical microwave synthesis for organic chemists**. Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha, 2009. 310p.

KIRLAND, D.; PFUHLER, S.; TWEATS, D.; AARDEMA, M.; CORVI, R.; DARROUDI, F.; ELHAJOUJI, A.; GLATT, H.; HASTWELL, P.; HAYASHI, M.; KASPER, P.; KIRCHNER, S.; LYNCH, A.; MARZIN, D.; MAURICI, D.; MEUNIER, J.R.; MÜLLER, L.; NOHYNEK, G.; PARRY, J.; PARRY, E.; THYBAUD, V.; TICE, R.; VAN BENTHEM, J.; VANPARYS, F.; WHITE F. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal test: report of a EVCAM workshop. **Mutation Research**, v.628, p. 31-55, 2007.

KOTOVICZ, V. **Extração rápida de compostos solúveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por ciclos de compressão e descompressão hidrostática: experimentos, modelagem e simulação**. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research, Oxford**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LI, J.; ZU, Y.; FU, Y.; YANG, Y.; LI, S.; LI, Z.; WINK, M. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 637-643, 2010.

LIMA, N. M. **Bioprospecção em espécies de Inga (*fabaceae mimosoideae*)**. 2015.167 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2015.

LIMA, N. M.; SANTOS, V. N. C.; LA PORTA, F. A. Quimiodiversidade, Bioatividade e Quimiosistemática do Gênero *Inga* (*FABACEAE*): Uma Breve Revisão. **Revista Virtual Química**, v.10, n.3, 2018.

LORENZI, H.; **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum. 1998.p. 169.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2 ed. Nova Odessa, SP: Ed. *Plantarum* Ltda. v. 2. 2002.p.352.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2009.p.384

MATSUI, K. N. **Inativação das enzimas presentes na água de coco verde (*cocos nucifera* L.) por processo térmico através do micro-ondas**. 2006. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MIAO, Z.; CHEN, H.; LIU, P.; LIU, Y. Development of Submillisecond Time-Resolved Mass Spectrometry Using Desorption Electrospray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 11, p.3994-3997, 2011.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MORIWAKI, M.T.; NAKAZATO, G.;KOBAYASHI, R.K.T.;MOREY, A.T.; FARIA, T.J.; LONNI, A.A.S.G. Microbiological and chemical fingerprint of standardized extracts of *inga marginata*. **Visão Acadêmica**, v.18, n.1, 2017.

NOWACKA, M.; FIJALKOWSKA, A.; DADAN, M.; RYBAK, K.; WIKTOR, A.; WITROWA-RAJCHERT, D. Effect of ultrasound treatment during osmotic dehydration on bioactive compounds of cranberries. **Ultrasonics**, v. 83, n.1, p. 18-25, 2018.

OUFNAC, D. S.; XU, Z.; SUN, T.; SABLIOV, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAMUEL GODBER, J. Extraction of antioxidants from wheat Bran using conventional solvent and microwave-assisted methods. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 125-129, 2007.

PASHA, I.; SAEED, F.; WAQAS, K.; ANJUM, F.M.; ARSHAD, M.U. Nutraceutical and functional scenario of wheat straw. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 287–295, 2013.

POSSETTE, R. F. S.; RODRIGUES, W. A. O gênero *Inga* Mill. (*Leguminosae* – *Mimosoideae*) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p.354-368, 2010.

ROCHA, M.S.; DE FIGUEIREDO, R.W.; ARAÚJO, M.A. Da M.; MOREIRA-ARAÚJO, R.S. Dos R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do Cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.4, p.933-941, 2013.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A.B.; IKEDAB, T.I.; CRUZ, À.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROMBAUT, N.; TIXIER, A.S.; BILY, A.; CHEMAT, F. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, n. 4, p. 530-544, 2014.

RUDZOKS, S.; KREJČI, S.; GRAEBSCH, C.; HERBARTH, O.; MUELLER, A.; BAUER M. Toxicity profiles of four metals and 17 xenobiotics in the human hepatoma cell line HepG2 and the protozoa *Tetrahymena pyriformis* – a comparison. **Environ Toxicol**, v.26, n.2, p. 171-186, 2011.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996–1022, 2010.

SADEGHI, A.; HAKIMZADEH, V.; KARIMIFAR, B. Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Food: A Review. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, v.7, n.1, p. 19-27, 2017.

SANTOS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.C.; GUEDES, A.S.; MOTA, M.D.; MAGALHAES, H.I.F. Atividade antioxidante e tóxica de extratos de cascas do fruto de *Nephelium lappaceum* L. (*Sapindaceae*), comercializados em Salvador, Bahia, Brasil. **Ciências farmacêuticas**, v.28, n.3, p. 173-178. 2016.

SCHIASSI, M.C.E.V.; SOUZA, V. R. DE. LAGO, A. M. T.; CAMPOS, L. G.; QUEIROZ, F. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, n. 15, p.305-311, 2018.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A. DOS S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Brasil: Ltc, 2006. 508 p.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 449-461, 2013.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learnin, 2010. 999 p.

SOARES, E. DOS R.; MONTEIRO, E.B.; DA SILVA, R.C.; BATISTA, A.; SOBREIRA, F.; MATTOS, T.; DA COSTA, C.A.; DALEPRANE, J.B. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. 3, 2015.

SONG, J.; LI, D.; LIU, C.; ZHANG, Y. Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 282–287, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Ed.3, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.640p.

TABARAKI, R.; HEIDARIZADI, E.; BENVIDI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punicagranatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v.98, n.1, p. 16-23. 2012.

TANG, L.L.; LIU, H.; WANG, Y.L.; XIAN, C.Y.; SU, A.H. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.57, n.2, p. 215-218, 2007.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G. KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

TIWARI, B.K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p.100–109, 2015.

TSUKUI A.; REZENDE C. M. Extração assistida por micro-ondas e química verde. **Revista Virtual de Química**, 6, 1713-1725. 2014.

VAZ, B. G.; ABDELNUR, P. V.; ROCHA, W. F. C.; GOMES, A. O.; PEREIRA, R. C. L. Predictive petroleomics: measurement of the total acid number by electrospray fourier transform mass spectrometry and chemometric analysis. **Energy & Fuels**, v. 27, n. 4, p. 1873-1880, 2013.

VEILLET, S.; TOMAO,V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. **Food Chemistry**, v.123, n.3, p. 905–911, 2010.

VERMA, A. K.; PRATAP, R. The biological potential of flavones. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 11, p. 1571-1593, 2010.

VIEIRA, G.S. **Estudo dos processos de extração de Antocianinas da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e da concentração do extrato por nanofiltração**. 2015. 249 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2015.

XIE, U.; HUANG, L.; ZHANG, C.; ZHANG, Y. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. **Journal of Functional Foods**, v.16, p. 460–471, 2015

WANG, L.; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n.1, p. 300-312, 2006.

ZAINAL-ABIDIN, M.H.; HAYYAN, M.; HAYYAN, A.; JAYAKUMA, N.S. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 979, n.1, p.1-23, 2017.