

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE
E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DA POLPA E DA
CASCA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luiz Filipe Machado Garcia

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DA POLPA E DA CASCA DE
TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*)**

Luiz Filipe Machado Garcia

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGF), Área de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Prof. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Garcia, Luiz Filipe Machado

Caracterização, avaliação antioxidante e citotóxica da polpa e da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) / Luiz Filipe Machado Garcia.-2012.

91 p.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) 2. Compostos bioativos 3. Atividade antioxidante 4. Citotoxicidade 5. Potencial terapêutico

I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da; II. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

© 2012

Todos os direitos autorais reservados a Luiz Filipe Machado Garcia. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA
DOS EXTRATOS DA POLPA E DA CASCA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum
aculeatum*)**

elaborada por
Luiz Filipe Machado Garcia

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)
(Orientadora)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 24 de Setembro de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Seu amor e por estar sempre guiando o meu caminho, o que certamente permitiu o alcance de mais um sonho.

A minha orientadora e amiga Prof^a Dra. Ivana: obrigado pela confiança, amizade, pelos conhecimentos transmitidos e por ser um verdadeiro exemplo de profissional que, mesmo detentora de uma sabedoria inquestionável, mantém sempre o respeito, a ética e, sobretudo, o senso humanitário, como primícias.

A minha família, em especial aos meus pais Vanderlan e Deonilda, minha irmã Vandréia e minha noiva Marielli. Obrigado pela confiança, amor, carinho e cuidado. Vocês são o meu mais profundo orgulho! Amo muito vocês!

Aos colegas e amigos Michele Sagrillo, Olmiro Cezimbra e Alencar Machado: Obrigado pela amizade, respeito, confiança e dedicação mútua, os quais deram qualidade ao trabalho e tornaram agradáveis os momentos de pesquisa. Sou extremamente grato a vocês!

Aos demais colegas e amigos do Laboratório Biogenômica, obrigado pelo companheirismo e dedicação em todos os momentos compartilhados.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pela atenção e organização demonstradas durante o período de realização do curso.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela qualidade de seus docentes e excelência em formação.

Aos professores do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), pela amizade e parceria durante as pesquisas.

Àqueles que aqui não foram citados, mas, certamente, foram lembrados por contribuírem, de alguma forma, para este trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DA POLPA E DA CASCA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*)

Autor: Luiz Filipe Machado Garcia

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de Setembro de 2012.

A identificação de compostos bioativos em frutos brasileiros é de extrema importância para a bioprospecção de substâncias naturais com potenciais farmacoterapêuticos. Da mesma forma, as avaliações de perfis de atividade antioxidante e de toxicidade fazem parte dos processos iniciais da exploração de extratos vegetais, sendo incluídos nos parâmetros de eficácia e segurança. Os frutos amazônicos têm se destacado por seus excelentes potenciais terapêuticos em diversos ensaios experimentais. Dentro desse contexto encontra-se o tucumã, um fruto amazônico oriundo de uma palmeira (*Astrocaryum aculeatum*), amplamente utilizado no estado do Amazonas para a fabricação de doces, sorvetes, licores ou para o consumo *in natura*. Estudos demonstram a presença de uma grande quantidade de carotenoides na polpa do fruto. No entanto, o fruto carece de informações relacionadas às propriedades antioxidantes e à presença de outros constituintes químicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os extratos etanólicos da polpa e da casca de tucumã quanto à presença de compostos bioativos, atividade antioxidante e citotoxicidade. A identificação de compostos bioativos e de polifenóis totais foram realizadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e método de Folin-Ciocalteu, respectivamente. As avaliações antioxidantes foram feitas pelo método de sequestro de radicais 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e teste de *Total Reactive Antioxidant Potential* (TRAP). Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelas técnicas de 3-(4,5)-dimetiltiliazolil -2,5 difeniltetrazólio (MTT) e exclusão por azul de Tripán. Os resultados demonstraram a presença de uma grande quantidade de polifenóis na casca ($790,9 \pm 43,65$ mg/100g) e na polpa ($663,9 \pm 92,40$ mg/100g) do fruto. Além disso, foi verificada a presença de compostos bioativos importantes, como flavonoides (casca = $77,9 \pm 0,02$ mg/100g; polpa = $40,6 \pm 0,06$ mg/100g), taninos (casca = $26,4 \pm 0,01$ mg/100g; polpa = $6,4 \pm 0,05$ mg/100g) e alcaloides (casca = $1,3 \pm 0,29$ mg/100g; polpa = $0,7 \pm 0,05$ mg/100g). Dentre os compostos identificados estavam beta-caroteno, rutina, quercetina, ácido gálico, ácido cafeico e ácido clorogênico, com concentrações superiores na casca em relação à polpa (com exceção do ácido gálico). Os extratos apresentaram alta atividade antioxidante, com valores de IC_{50} correspondentes a $8,98 \pm 0,39$ μ g/ml (casca) e $11,24 \pm 0,461$ μ g/ml (polpa), para o método de TRAP, e $102,38 \pm 4,8$ ng/ml (casca) e $224,57 \pm 3,9$ (polpa) para o método de DPPH. No entanto, em concentrações superiores a 100 μ g/mL, ambos os extratos apresentaram efeitos citotóxicos. Os resultados sugerem que os extratos etanólicos da polpa e da casca de tucumã apresentam alta atividade antioxidante, com a presença de compostos bioativos que demonstram excelentes potenciais farmacoterapêuticos.

Palavras Chave: Tucumã; compostos bioativos; atividade antioxidante; citotoxicidade.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

CARACTERIZATION, ANTIOXIDANT AND CITOTOXIC EVALUATION OF TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) PULP AND PEEL EXTRACTS

Author: Luiz Filipe Machado Garcia

Advisor: Prof^a Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, September 24, 2012.

The identification of bioactive compounds in Brazilian fruit is extremely important for bioprospecting of natural substances with potential pharmacotherapeutic. Likewise, evaluations of profiles of antioxidant activity and toxicity are part of the initial processes of exploitation of plant extracts, being included in the efficacy and safety parameters. The Amazonian fruits have been noted for its excellent therapeutic potential in several experimental tests. Within this context is the tucumã, an Amazon fruit comes from a palm (*Astrocaryum aculeatum*), widely used in the state of Amazonas to the manufacture of candy, ice cream, liqueur or fresh consumption. Studies have shown the presence of a large amount of carotenoids in the fruit pulp. However, the fruit lacks information related to the antioxidant properties and presence of other chemical constituents. The objective of this study was to evaluate the ethanol extracts of the pulp and peel tucumã for the presence of bioactive compounds, antioxidant activity and cytotoxicity. The identification of bioactive compounds and total polyphenols were performed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Folin-Ciocalteu method, respectively. The antioxidants evaluations were made by the scavenger method of radical 2,2 - diphenyl-1-picril-hydrazyl (DPPH) and Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) test. The cytotoxicity assays were performed by the techniques of 3 - (4,5)-dimethylthiazolil difeniltetrazólio -2.5 (MTT) and by trypan blue exclusion. The results showed the presence of a large amount of polyphenols in the peel (790.9 ± 43.65 mg/100 g) and pulp (663.9 ± 92.40 mg/100 g) of the fruit. In addition, we detected the presence of important bioactive compounds such as flavonoids (peel = 77.9 ± 0.02 mg/100 g; pulp = 40.6 ± 0.06 mg/100 g), tannin (peel = 26.4 ± 0.01 mg/100 g; pulp = 6.4 ± 0.05 mg/100 g) and alkaloids (peel = 1.3 ± 0.29 mg/100 g; pulp = 0.7 ± 0.05 mg/100 g). Among the compounds identified were beta-carotene, rutin, quercetin, gallic acid, caffeic acid and chlorogenic acid, with higher concentrations in the peel in relation to the pulp (except the gallic acid). The extracts showed high antioxidant activity, with IC₅₀ values corresponding to 8.98 ± 0.39 mg / ml (peel) and 11.24 ± 0.461 mg / ml (pulp) for the TRAP method, and 102.38 ± 4.8 ng / ml (peel) and 224.57 ± 3.9 (pulp) for the DPPH method. However, at concentrations above 100 µg / ml, both extracts showed cytotoxic effects. The results suggest that the ethanol extracts of the pulp and peel tucumã have high antioxidant activity in the presence of bioactive compounds that show great potential pharmacotherapeutic.

Keywords: Tucumã, bioactive compounds, antioxidant activity, cytotoxicity

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1 POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS VEGETAIS: UM BREVE HISTÓRICO	11
2 FITOMEDICAMENTOS NO BRASIL	15
3 ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS	17
4 ANTIOXIDANTES NATURAIS	19
5 POLIFENÓIS	20
5.1 Flavonoides	22
6 COMPOSTOS BIOATIVOS	24
6.1 Quercetina	24
6.1.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas	25
6.2 Rutina	26
6.2.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas	27
6.3 Ácido gálico	28
6.3.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas	28
6.4 Ácido cafeico	29
6.4.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas	30
6.5 Ácido clorogênico	30
6.5.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas	31
6.6 Carotenoides	32
6.6.1 Apresentação	32
6.6.2 Estrutura química e classificação	33
6.6.3 Funções	33
6.6.4 Propriedades antioxidantes e terapêuticas	35
6.6.5 Beta-caroteno	37
7 FRUTOS DA AMAZÔNIA	38
7.1 Tucumã	39
7.1.1 Apresentação	39
7.2.2 Atividade exploratória	41
7.2.3 Caracterização do fruto	41

8 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> NA BIOPROSPECÇÃO DE FRUTOS COM POTENCIAL FARMACOTERAPÊUTICO	42
8.1 Ensaios de atividade antioxidante	42
8.1.1 Sequestro de radicais DPPH	42
8.1.2 TRAP (<i>Total Reactive Antioxidant Potential</i>)	43
8.2 Ensaios de citotoxicidade	43
9 OBJETIVOS	45
9.1 Geral	45
9.2 Específicos	45
10 RESULTADOS	45
11 DISCUSSÃO	71
12 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO

Embora o uso terapêutico de plantas ocorra desde o surgimento da espécie humana, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes e implicações é algo recente, sendo largamente explorado nos últimos anos (NEVES et al., 2009). Com a emergência de novos conceitos como alimentos funcionais e nutracêuticos, e com o incentivo do governo federal na ampliação e regulamentação do uso de fitomedicamentos, a busca por compostos naturais como possíveis substituintes de drogas sintéticas é cada vez mais frequente.

Um dos principais objetivos das pesquisas envolvendo espécies vegetais é a procura por compostos bioativos com propriedades farmacoterapêuticas. Dentro dos possíveis candidatos, estariam os compostos pertencentes à classe dos antioxidantes naturais, presentes, sobretudo, em espécies vegetais. Estudos demonstram que essas substâncias estariam envolvidas na prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, endocrinopatias, neoplasias, dentre outras (JENAB et al., 2006; CHAO et al., 2009; JEONG et al., 2011). O Brasil pode ser visto como o principal candidato ao desenvolvimento de novos medicamentos a partir de espécies vegetais nos próximos anos. Com tecnologia emergente na área, o país possui um terço da flora vegetal do mundo, sendo que apenas 19% das espécies foram catalogadas (KLEIN et al., 2009).

Os antioxidantes naturais compõem a classe de compostos bioativos mais explorada para fins terapêuticos. São representantes dessa classe os polifenóis (flavonoides e não flavonoides), carotenoides, vitaminas (A, C e E) e compostos nitrogenados (DEVASAGAYAM et al., 2004). Dentre eles, destacam-se os polifenóis, que representam o maior grupo de compostos bioativos presentes em vegetais, e os carotenoides (FALLER e FIALHO, 2009). O isolamento e caracterização dessas substâncias têm permitido a descoberta de propriedades terapêuticas importantes, como as atividades antineoplásicas da quercetina e ácido gálico, e atividade hipoglicemiante do ácido cafeico (CHAO et al., 2009; JEONG et al., 2009; KAUR et al., 2009). No entanto, sabe-se que essas substâncias podem agir de forma sinérgica acentuando os padrões de resposta em um evento fisiológico. Assim, os experimentos envolvendo extratos vegetais possibilitam tanto a descoberta de novos compostos, quanto a elucidação do comportamento sinérgico existente entre eles (HU et al., 2012).

Alguns estudos têm procurado caracterizar a composição química dos frutos brasileiros, buscando a identificação de alguns compostos bioativos importantes (KUSKOSKI et al., 2006; MELO et al., 2008). Os resultados são positivos e demonstram um alto potencial farmacoterapêutico nas espécies. Dentre os destaques, estão os frutos da Amazônia, que têm apresentado excelente atividade antioxidante e composição química altamente atrativa (CANUTO et al., 2010). Um fato que tem chamado a atenção é de que a ingestão desses frutos pela população local, como parte da dieta amazônica, estaria relacionada a uma menor incidência de doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, obesidade e câncer, assim como a uma maior longevidade com relação a outras regiões do país (KREWER et al., 2011).

Dentro desse contexto, encontra-se o tucumã, um fruto da palmeira *Astrocaryum aculeatum*, típica da Amazônia, e popularmente conhecida como tucumã-do-amazonas, tucumanzeiro ou tucumã-açu (CAVALCANTE, 1991). O fruto apresenta um alto valor nutritivo e econômico para a população local, sendo utilizado para o consumo *in natura*, fabricação de doces, sorvetes, licores e do popular sanduíche de tucumã (MENDONÇA, 1996). A polpa do fruto apresenta concentrações de beta-caroteno que chegam a três vezes o valor encontrado na cenoura (*Daucus carota*) (DE ROSSO e MERCADANTE, 2007). No entanto, há poucos estudos demonstrando as propriedades funcionais e antioxidantes do tucumã, sendo que nenhum deles relaciona-se à casca do fruto.

1 POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS VEGETAIS: UM BREVE HISTÓRICO

O uso de plantas medicinais e produtos naturais tem acompanhado o homem desde o início de sua existência. Uma grande variedade de plantas já era utilizada na forma chás, pós, “garrafadas” e tinturas para os mais diversos fins terapêuticos. Os sumérios (2600 a.C.) utilizavam diferentes partes de lótus, oliveira e alho no tratamento de diversas enfermidades. A prescrição dessas plantas, assim como os sintomas de algumas doenças fazem parte do mais antigo tratado de medicina que se tem conhecimento, a “Tabuinha-Sumeriana” (DEVIENNE et al., 2004).

Shen Tsung, imperador chinês, por volta de 2000 a.C., descreveu a aplicação de 365 plantas no primeiro Pen Tsao, incluindo o ginseng, amplamente estudado nos dias atuais pelas propriedades antidiabéticas e hipolipidêmicas dos ginsenosídeos (PARKY, 1966; ATTELE et

al., 2002; DEVIENNE et al., 2004). Os egípcios utilizavam cebola, funcho, açafrão, hortelã e pimenta e mais de 700 plantas constantes no “Papyrus Erbers”, dentre as quais o salgueiro, do qual foi extraída a salicina em 1829, composto precursor do ácido acetilsalicílico. Da mesma forma, os gregos utilizavam o óleo de rícino como purgativo, os romanos utilizavam o alho para aumentar a força de seus soldados, enquanto os russos e turcos empregavam-no para o tratamento da febre e da gripe (DEVIENNE et al., 2004). No decorrer da história, a descoberta das propriedades medicinais de diversas plantas era baseada na simples observação que, embora muitas vezes não registrada, acabava passando de geração a geração.

No século XVI, a condessa de Cinchón, residente no Peru, foi acometida de forte febre de origem desconhecida. Os jesuítas espanhóis, não sabendo como proceder, recorreram aos ameríndios do antiplano andino, os quais a trataram com uma infusão denominada “quina-quina”, que proporcionou sua cura total. O episódio tratava-se de um caso de malária, termo de origem italiana que significa “ar ruim” (mala aria). A árvore utilizada para o preparo do chá foi batizada de Cinchona (em homenagem à condessa), nome científico da *Cinchona officinalis* (Solenaceae), popularmente conhecida como quina. Com a descoberta das propriedades antimaláricas da quina, as sementes da árvore foram levadas para Europa, onde os alemães dominaram o mercado mundial, após o cultivo de extensas áreas da espécie (OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009).

No século XVIII, o químico sueco Carl Wilhelm Scheele foi um dos grandes precursores da descoberta dos polifenóis, ao isolar o ácido gálico de nozes da Gália, como resultado da decomposição do ácido tânico. Dentre outras descobertas de Scheele, estariam alguns compostos inorgânicos e orgânicos como: oxigênio, cloro, glicerina e ácidos cítrico, tartárico, fluorídrico, sulfídrico, cianídrico, oxálico, túngstico, dentre outros (WISNIAK, 2009).

Derosne, em 1803, foi um dos precursores da grande jornada de exploração e purificação de compostos ativos de plantas ao obter o ópio extraído da papoula (*Papaver somniferum*). Logo após, em 1805, o boticário alemão Friedrich Sertürner isolou a morfina a partir do ópio. Com a descoberta de Sertürner, novas substâncias químicas iam sendo lentamente isoladas, comprovando quimicamente a eficácia dos extratos de algumas plantas. Assim, o estudo dos vegetais se tornava uma constante, baseada principalmente nos conhecimentos etnobotânicos sobre algumas espécies (GATES e TSCHUDI, 1952; RANG et al, 2007).

Em 1820, Pelletier e Caventou isolaram a quinina a partir da quina, o que possibilitou o tratamento eficaz da malária e o desenvolvimento de outros antimaláricos sintéticos como cloroquina, primaquina, mepacrina e mefloquina, utilizados nos dias atuais. No mesmo ano, o principal estimulante natural mundialmente consumido, a cafeína, foi isolada do café (*Coffea arabica*) pelo químico alemão Ferdinand Runge, e em 1827, isolada do chá-preto (*Camellia sinensis*) por Oudry (MAZZAFERA e CARVALHO, 1991). Em 1831, Wackenroder isolou o betacaroteno da cenoura (*Daucus carota*), dando início à descoberta de outros carotenoides nos anos seguintes, embora ainda com estruturas desconhecidas (CHENG, 2007).

Embora já se tenha registro do uso de infusões de *Atropa belladonna* por cientistas dos impérios Romano e Bizantino, foi somente em 1831 que o farmacêutico alemão Mein isolou o composto conhecido como atropina, um antagonista muscarínico não-seletivo utilizado como adjuvante em processos anestésicos e no tratamento da bradicardia e da hipermotilidade intestinal (BARREIRO, 1990; RANG et al, 2007).

Em 1881, uma árvore da família Solanaceae (*Datura stramonium*) foi fonte da descoberta de um dos medicamentos mais utilizados na clínica atual: a escopolamina. O isolamento foi realizado por Ladenburg, sendo o nome do composto dado em homenagem ao descobridor da planta, o naturalista italiano Giovanni Antonio Scopoli. Em 1923, Robinson e Gulland determinaram a estrutura da morfina, sendo que em 1952, ela foi sintetizada pela primeira vez por Gates e Tschudi (BARREIRO, 1990).

O conceito de vitaminas como compostos essenciais foi proposto somente em 1911, por Carlos Funk. Porém, o conhecimento de que algumas espécies vegetais possuíam compostos capazes de prevenir certas doenças vem desde a antiguidade. O escorbuto, a pelagra, o beribéri, a anemia perniciosa e o raquitismo são doenças decorrentes de deficiências vitamínicas que provocaram a morte de milhões de pessoas no decorrer da história. O escorbuto acometia principalmente os navegantes participantes de longas expedições. Por exemplo, em 1536, a tripulação do navio do francês Jacques Cartier, que explorava as águas do rio São Lourenço, acabou sendo vitimada de escorbuto, onde 25 homens morreram e o restante permanecia doente. Nesta ocasião, um indiano, amigo de Cartier, aconselhou-os a beber um chá feito de folhas e cascas de *Thuja occidentalis* (árvore-da-vida), o que levou à cura dos doentes. Séculos mais tarde, estudos demonstraram que a *T. occidentalis* possuía 50 mg de vitamina C a cada 100 g da planta (BARREIRO, 1990).

Em 1886, o governo holandês solicitou ao médico Christiaan Eijkman que estudasse o beribéri, doença que predominava na Ásia, ilhas do Pacífico e América do Sul, locais onde o arroz era o alimento base. Eijkman iniciou seu experimento com galinhas, alimentando-as com arroz beneficiado (sem casca) servido em um hospital militar. No entanto, ao mudar o cozinheiro do hospital, as galinhas passaram a receber arroz com casca, o que provocou o desaparecimento da doença. Em 1907, Eijkman e Grijns concluíram que a casca do arroz possuía uma substância indispensável para uma boa saúde. Ao receber o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, em 1929, Eijkman afirmou que o cozinheiro “não permitiu que arroz militar fosse comido por galinhas civis” (DOUGLAS, 2006).

No entanto, foi somente no século XX que se deu início a uma caracterização química mais aprofundada de certos vegetais, a partir do isolamento e determinação da estrutura química de alguns compostos bioativos importantes, como vitaminas, flavonoides e carotenoides. Em 1912, após a descoberta de Eijkman, Robert R. Willians e colaboradores isolaram da casca do arroz a primeira vitamina descoberta, a tiamina (vitamina B1), a qual conferia proteção contra o beribéri. Em 1928, Albert Szent-Györgyi, através de testes com tecidos vegetais e glândulas supra-renais de porcos, obteve a vitamina C pura, com o nome de ácido hexurônico. Em 1930, Szent-Györgyi isolou, a partir de laranjas, uma substância denominada de vitamina P, que anos mais tarde demonstrou ser o flavonoide rutina (NIJVELDT et al., 2001).

Os vegetais ainda representam as maiores fontes de compostos naturais com potenciais terapêuticos. Calcula-se que dentre os medicamentos disponibilizados no mercado entre os anos de 1981-2002, cerca de 52% são derivados de espécies vegetais. Os fármacos antineoplásicos representam uma grande parte do total, sendo que nos últimos 50 anos foram introduzidos no mercado 70 medicamentos derivados de plantas. As principais substâncias extraídas de espécies vegetais e que hoje são utilizadas no tratamento do câncer são a vimblastina e a vincristina, isoladas da Vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don); o etoposídeo e o teniposídeo das espécies do gênero *Podophyllum*; e o alcaloide camptotecina, isolado da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* Decne (NEWMAN et al., 2000; NEWMAN et al., 2003).

Embora com diferenças enormes quanto às formas de administração dos compostos naturais, o objetivo do homem no decorrer da história é o mesmo de hoje: recuperação da saúde e prevenção de doenças prevalentes na população. A Organização Mundial da Saúde (OMS)

estima que 80% da população dos países subdesenvolvidos tenha na medicina alternativa a única forma de tratamento de saúde (LORENZI e MATOS, 2008; DUTRA, 2009).

As pesquisas envolvendo compostos vegetais no Brasil, quando representadas por publicações, passaram de 24 entre os anos de 1984-1986, para 1431 entre 2002-2004, demonstrando um crescimento de 60 vezes. Além disso, o Brasil é o líder absoluto em publicações internacionais nessa área (41,6%) quando comparado aos outros países da América Latina (CALIXTO e SIQUEIRA JÚNIOR, 2008). No entanto, é importante salientar que o sucesso nas pesquisas envolvendo compostos naturais depende, principalmente, da interação entre as áreas de Botânica, Química e Farmacologia (FILHO e YUNES, 1998).

2 FITOMEDICAMENTOS NO BRASIL

Os ensaios com extratos vegetais constituem a etapa inicial de exploração para a descoberta de potenciais terapêuticos diversos. Por se tratar de uma mistura complexa, frequentemente é observado um sinergismo entre os compostos bioativos presentes no extrato, o que, muitas vezes, não é verificado quando se utiliza os mesmos compostos de forma isolada (HU et al., 2012).

Alguns resultados experimentais demonstram que certos extratos vegetais possuem uma ação significativa comparada, ou até mesmo superior, a de alguns fármacos disponibilizados no mercado. Isso acaba sendo normalmente esperado, quando se tem conhecimento de que aproximadamente 40% dos fármacos têm sua origem direta ou indiretamente de fontes naturais, sendo 25% de plantas (CALIXTO, 2003).

Os fitomedicamentos, ou fitoterápicos, como também são chamados, constituem-se em preparações contendo extratos de uma ou mais plantas, onde são encontradas substâncias geralmente pouco caracterizadas, as quais se acredita atuarem sinergicamente para um determinado fim terapêutico (CALIXTO, 2000). O mercado mundial de fitomedicamentos movimentou em 2003 mais de U\$ 20 bilhões. Em 2001, os fitomedicamentos no Brasil atingiram 270 milhões, superando até mesmo a comercialização dos medicamentos genéricos (U\$ 226 milhões) (CALIXTO, 2003). No entanto, embora o Brasil possua um terço da flora

mundial, são países como Estados Unidos, Japão e alguns países europeus os que mais manufaturam e comercializam fitomedicamentos (KLEIN et al., 2009).

Algumas etapas são necessárias para o desenvolvimento de um fitomedicamento, tais como o levantamento bibliográfico e etnofarmacológico das propriedades da planta estudada; estudos botânicos e fitoquímicos para a identificação do vegetal e seus constituintes químicos; e a avaliação farmacológica e toxicológica das substâncias isoladas, extratos brutos ou frações (TOLEDO et al., 2003). Estima-se que o custo para o desenvolvimento de um fitomedicamento não ultrapassa 2 a 3% do que é gasto com o desenvolvimento de um medicamento sintético, que fica entre U\$ 350 a U\$ 800 milhões (CALIXTO, 2003).

O governo federal, com base no aumento do mercado consumidor de fitomedicamentos, estabeleceu em 22 de junho de 2006 o Decreto nº. 5813, o qual tem como objetivo geral possibilitar à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitomedicamentos, garantindo o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Dentre outros objetivos específicos estão: a ampliação das opções terapêuticas aos usuários, com a inclusão de fitomedicamentos e plantas medicinais em farmácias populares, com garantia da segurança, eficácia e qualidade desses medicamentos; a regulação da produção, distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos e o incentivo à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos nas diversas fases da cadeia produtiva (BRASIL, 2006).

As pesquisas envolvendo espécies vegetais visando o desenvolvimento de fitomedicamentos tiveram um grande impulso no Brasil nos últimos anos. As parcerias realizadas entre universidades e empresas estão se tornando cada vez mais frequentes, possibilitando ultrapassar algumas barreiras tecnológicas e de estrutura-atividade de certos compostos. O consumo de fitomedicamentos no país também segue a mesma direção.

Silva et al. (2006) avaliaram a utilização de fitomedicamentos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). Os resultados demonstraram que 20,6% das prescrições médicas da unidade eram de fitomedicamentos, com as principais indicações para as afecções cutâneas, respiratórias e para o tratamento do diabetes melito. Ribeiro et al. (2005) avaliaram a utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias da cidade de Belo Horizonte (MG). *Ginkgo biloba*, *Passiflora* spp. (maracujá) e *Aesculus hippocastanum* (castanha-da-Índia) responderam por mais da metade dos fitoterápicos

adquiridos, sendo que quase 75% dos usuários eram do sexo feminino e 61,1% possuíam idade entre 30 e 59 anos.

O aumento do consumo de fitomedicamentos vem acompanhado de uma mudança nos padrões de consumo da população brasileira. Com a informação crescente dos efeitos adversos decorrentes do uso de algumas drogas sintéticas, a utilização de compostos naturais está lentamente sendo reintroduzida desde o seu declínio, quando as indústrias farmacêuticas iniciaram uma produção de medicamentos em massa (CALIXTO, 2003).

3 ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS

As pesquisas envolvendo a busca por constituintes químicos importantes em diferentes espécies vegetais estão se tornando cada vez mais frequentes. Uma das causas é porque diversos estudos epidemiológicos demonstram que uma dieta baseada em micronutrientes antioxidantes é capaz de prevenir uma grande variedade de doenças crônicas, dentre elas, cardiopatias, câncer, diabete e Alzheimer. Assim, busca-se avaliar de forma experimental (*in vitro* ou *in vivo*), os resultados provenientes dos tratamentos com esses compostos, em parâmetros de atividade antioxidante, antiinflamatória, cardioprotetora, antineoplásica ou outras (OBRENOVICH et al., 2011).

Um conceito relativamente novo, introduzido no Japão na década de 80, é o de alimentos funcionais, o qual foi estabelecido pelo governo no intuito de proporcionar alimentos saudáveis para a população que envelhecia, mesmo o país apresentando uma alta expectativa de vida. O conceito difundiu-se pelo mundo e, hoje, os consumidores já têm desenvolvido, mesmo que lentamente, a consciência por hábitos saudáveis de alimentação. Os alimentos funcionais são aqueles conhecidos por apresentarem não somente propriedades nutricionais comumente encontrada em outros alimentos, mas por promoverem, de forma associada, efeitos fisiológicos benéficos à saúde os quais levam à prevenção ou retardo de doenças crônico-degenerativas. O conceito, portanto, é fundamentado de que esses alimentos são capazes de modular diversas funções orgânicas essenciais, contribuindo para a manutenção ou promoção de saúde (MORAES e COLLA, 2006).

Para ser considerado funcional, um alimento deve apresentar um ou mais critérios estabelecidos, tais como: ação metabólica ou fisiológica benéfica, propriedades nutricionais adequadas, estar inserido em uma dieta usual, não ser destinado clinicamente ao tratamento de doenças e apresentar seus benefícios em quantidades não-tóxicas (WAITZBERG, 2000). No entanto, deve-se ressaltar que não fazem parte dos alimentos funcionais aqueles enriquecidos industrialmente com minerais ou vitaminas (MORAES e COLLA, 2006).

Um termo frequentemente confundido com o de alimento funcional é o de alimento nutracêutico. Os alimentos nutracêuticos são aqueles utilizados clinicamente para o tratamento ou prevenção de doenças específicas, ou até mesmo, para a reposição de minerais ou vitaminas deficientes (HUNGENHOLTZ e SMID, 2002). Esses alimentos podem ser apresentados na forma de nutrientes isolados, suplementos dietéticos, produtos à base de ervas, cereais, sopas e bebidas. Os alimentos funcionais diferem dos nutracêuticos por serem encontrados em sua forma natural, e por não serem destinados, pela área médica ou de saúde, especificamente para o tratamento ou prevenção de uma patologia (KWAK e JUKES, 2001; MORAES e COLLA, 2006).

O papel desses alimentos na redução, prevenção ou tratamento de doenças crônico-degenerativas ou disfunções metabólicas é explorado cientificamente, através de ensaios que validam os seus potenciais benefícios à saúde. Estudos baseados no tratamento de ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica, com extrato aquoso de chá verde (*Camelia sinensis*), demonstraram uma prevenção no ganho de gordura corporal quando comparados ao grupo controle com dieta normolipídica (CHOO, 2003). A análise farmacoterapêutica do alho (*Allium sativum* L.) demonstrou a presença de mais de 30 compostos bioativos, responsáveis por suas atividades cardioprotetora, hipoglicêmica, antineoplásica, antimicrobiana, antihelmíntica e imunoestimulante, cientificamente comprovadas (APOLINÁRIO et al., 2008).

César et al. (2010), ao avaliarem o perfil lipídico de 29 indivíduos que consumiram 750 ml de suco de laranja durante 60 dias, encontraram uma redução 11% e 15% no colesterol total de homens e mulheres, respectivamente, e de 15% de redução no colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) de ambos. Da mesma forma, Nasser et al. (2011) demonstraram que a ingestão de 750 ml diárias de suco de laranja por oito semanas provocou um aumento de 150% na capacidade antioxidante do soro em mulheres, e de 200% em homens.

A ingestão de farinha de linhaça dourada (30 g/dia) durante duas semanas por indivíduos obesos, candidatos à cirurgia bariátrica, demonstrou uma diminuição de aproximadamente 40% nos níveis de proteína C reativa (PCR) (FAINTUCH et al., 2006). Peluzio et al. (2011) ao avaliarem a ação do extrato de uva, combinado ou não com alfa-tocoferol, no tratamento de camundongos Apo E - / - com dieta aterogênica, encontraram um efeito hipocolesterolêmico, com reduções significativas nos níveis de colesterol hepático e plasmático e aumento da excreção de colesterol via fecal.

O extrato de *Hypericum perforatum* (erva-de-São João), que contém as substâncias hipericina e a pseudohipericina, tem demonstrado uma atividade antiviral significativa, inibindo o crescimento de alguns vírus encapsulados, tais como Herpes simplex (I e II), vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), citomegalovírus murina e para-influenza 3 (YUNES et al., 2001). Altas concentrações de selênio encontradas no brócolis são responsáveis pela diminuição das taxas de câncer de cólon em experimentos com ratos (FINLEY et al., 2000).

4 ANTIOXIDANTES NATURAIS

Os antioxidantes naturais são um grupo heterogêneo de moléculas capazes de prevenir ou reduzir danos resultantes do processo de estresse oxidativo. Estão presentes em frutas, verduras, chás, peixes, cereais, óleos, mel, algas, dentre outros alimentos (OLIVEIRA et al., 2009). A busca por antioxidantes naturais tem sido cada vez mais frequente, uma vez que é demonstrado que alguns antioxidantes sintéticos de maior uso na indústria alimentícia, como o butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) e t-butilhidroquinona (TBHQ), apresentam potencial pró-carcinogênico, além de efeitos como aumento dos níveis de colesterol e hepatomegalia. Assim, devido à falta de segurança no uso de antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais surgem como a melhor opção, uma vez que não apresentam tal toxicidade e são amplamente encontrados na dieta (LINDENSCHMIDT et al., 1986; BUSH e TAYLOR, 1998; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; HU et al., 2012).

As principais classes de antioxidantes naturais são: compostos fenólicos (flavonoides e não-flavonoides), carotenoides, vitaminas (A, C e E) e compostos nitrogenados (DEVASAGAYAM et al., 2004). Alguns aspectos importantes devem ser observados quando

na avaliação desses antioxidantes, tais como a sua presença natural em tecidos animais, a capacidade de proteção de moléculas proteicas, lipídicas e do DNA, a sua boa biodisponibilidade quando administrado, uma meia-vida longa e a capacidade de não sofrer alterações estruturais quando na passagem pela membrana plasmática (VENDEMIALE et al., 1999).

Alguns estudos têm comparado os resultados obtidos da adição de antioxidantes sintéticos e naturais em alguns alimentos. Pereira (2009) avaliou a aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de frango, comparando com atividade do BHA. Os compostos testados foram extratos de: erva mate (*Ilex paraguayensis*), marcela (*Achyrocline satureioides*), chá verde (*Camellia sinensis*) e própolis (sem álcool). Como controle foi utilizado o antioxidante sintético BHA. Os resultados demonstraram que o extrato de marcela teve o melhor efeito na inibição da oxidação lipídica da carne de frango. Além disso, o extrato de própolis foi o que melhor manteve a estabilidade da cor da carne, e a mistura dos extratos de erva mate e chá verde apresentou a menor contagem de aeróbios mesófilos totais na amostra.

5 POLIFENÓIS

Os polifenóis ou compostos fenólicos representam a classe mais abundante de antioxidantes na dieta humana, estando presentes em frutas, vegetais, chás, cereais, entre outros. Além de apresentarem propriedades redutoras, essas substâncias formam compostos intermediários estáveis, os quais apresentam na estrutura um anel aromático, que é responsável pela sequestro de espécies reativas como os radicais O_2^- , OH^- , NO^- , que causam peroxidação lipídica, danos a proteínas e ao DNA (SOUSA et al., 2007; QUIDEAU et al., 2011).

Os polifenóis de origem vegetal são divididos em dois grupos: flavonoides e não-flavonoides (MELO e GUERRA, 2002). Como não-flavonoides podemos citar os derivados do ácido hidroxicinâmico (ácidos p-cumárico, cafeico, perúlico, sináptico, clorogênico etc.), do ácido hidroxibenzoico (ácidos gálico, vanílico, salicílico, elágico etc.) e os derivados da estrutura química $C_6C_2C_6$ (específica do trans resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-

glucosídeo) (DEGASPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Os flavonoides serão abordados mais especificamente no item a seguir.

O consumo de compostos antioxidantes como os polifenóis tem sido associado a uma menor incidência de doenças resultantes do estresse oxidativo. Atualmente, uma dieta rica em polifenóis é uma alternativa altamente eficaz na prevenção de cardiopatias, nefropatias, catarata e doenças degenerativas como o câncer (ARAÚJO e CHAVES, 2005; RUSSO e SPERANZA SÁNCHEZ, 2006; ALINKEEL et al., 2008).

Tem sido demonstrado que a curcumina, um flavonóide extraído da *Curcuma zedoaria*, popularmente conhecido como açafrão da Índia, é capaz de ativar proteínas envolvidas na apoptose (interleucina-1 β e caspases), especificamente em células neoplásicas como as HT29 no câncer de cólon humano e Hep-G2 de carcinoma hepatocelular humano (JIANG et al, 1996).

Estudos revelam que o resveratrol, presente no suco de uva, possui atividade antineoplásica sobre células de câncer uterino, além de regular a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima que confere resistência à apoptose nessas células (ASSELIN, 2006). Além disso, estimula a apoptose em diversos carcinomas, como a leucemia linfoblástica aguda, células Hep-G2 e em algumas linhagens de células de câncer oral (FRESCO et al, 2006).

Sabendo que a maior parte dos compostos fenólicos são oriundos dos vegetais, muito se tem pesquisado na identificação de plantas que apresentem quantidades significativas de polifenóis em sua composição (KUSKOSKI et al., 2006; SOUSA et al., 2007; BOLIGON et al., 2009). As principais fontes de compostos fenólicos ingeridos na dieta brasileira são: abacaxi pérola (*Ananás comosus*), banana prata (*Musa acuminata*), laranja lima (*Citrus sinensis*), mamão papaya (*Carica papaya*), manga tommy (*Mangifera indica*), tangerina ponkan (*Citrus reticulata*), brócolis comum (*Brassica oleracea* var. *Italica*), repolho branco (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* var. *Carmem*), cebola nacional (*Allium cepa*) e cenoura (*Daucus carota*) (FALLER e FIALHO, 2009). A Tabela 1 apresenta o teor de polifenóis em algumas espécies vegetais conhecidas e constituintes da dieta humana.

5.1 Flavonoides

Os compostos fenólicos flavonoides possuem uma estrutura básica C6-C3-C6 com dois anéis benzênicos (A e B), conectados por um anel de três carbonos contendo oxigênio (Figura 1). A variação estrutural no anel C subdivide os flavonoides em seis subclasses: flavonóis (quercetina, rutina, kaempferol, miricetina etc.), flavonas (luteolina, apigenina etc.), flavanóis (catequina, epicatequina etc.), flavanonas (hesperidina, naringenina etc.), antocianidinas (cianidina, pelargonidina etc.) e isoflavonas (genisteína, daidzeina etc.) (BERNARDES et al. 2010).

Tabela 1 – Polifenóis Totais (PT) em alguns vegetais constituintes da dieta humana

Nome popular (nome científico)	Conteúdo de PT (mg EAG/100g)
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L. Merrill)	85,1 ⁽¹⁾ – 40,4 ⁽²⁾ – 21,7 ⁽⁴⁾
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	136,8 ⁽⁴⁾
Acerola (<i>Malpighia glabra</i>)	580,1 ⁽⁴⁾
Aipo (<i>Apium graveolens</i>)	113,0 ⁽³⁾
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	124,5 ⁽³⁾
Alho-poró (<i>Allium porrum</i>)	27,7 ⁽³⁾
Ameixa (<i>Prunus domestica</i>)	303,6 ⁽³⁾
Banana (<i>Musa paradisiaca</i>)	215,7 ⁽¹⁾ – 56,1 ⁽²⁾
Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	31,5 ⁽¹⁾
Brócolis (<i>Brassica oleracea</i>)	68,0 ⁽¹⁾ – 101,7 ⁽³⁾
Cebola (<i>Allium cepa</i>)	113,2 ⁽¹⁾
Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	45,1 ⁽¹⁾ – 96,0 ⁽³⁾
Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	20,5 ⁽⁴⁾
Amora (<i>Morus alba</i>)	1515,9 ⁽⁵⁾
Figo (<i>Ficus carica</i> L.)	59,0 ⁽³⁾
Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	83,0 ⁽⁴⁾
Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	84,3 ⁽⁴⁾
Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	114,6 ⁽¹⁾ – 56,8 ⁽²⁾
Limão (<i>Citrus limon</i>)	66,3 ⁽²⁾
Maçã (<i>Pirus malus</i>)	272,1 ⁽²⁾ – 125,4 ⁽³⁾
Mamão (<i>Carica papaya</i>)	15,3 ⁽¹⁾
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	110,5 ⁽¹⁾ – 544,9 ⁽⁴⁾
Maracujá (<i>Passiflora alata</i>)	20,0 ⁽⁴⁾
Mirtilo (<i>Vaccinium myrtillum</i>)	670,9 ⁽³⁾
Morango (<i>Fragaria Vesca</i> L.)	147,8 ⁽²⁾ – 244,1 ⁽³⁾ – 132,1 ⁽⁴⁾
Pêra (<i>Pyrus communis</i>)	53,6 ⁽²⁾ – 124,7 ⁽³⁾
Pêssego (<i>Prunus persica</i>)	65,3 ⁽²⁾ – 50,9 ⁽³⁾
Pimentão verde (<i>Capsicum anuum</i>)	246,7 ⁽³⁾
Pimentão vermelho (<i>Capsicum anuum</i>)	173,2 ⁽³⁾
Pomelo (<i>Citrus maxima</i>)	30,7 ⁽²⁾
Quiabo (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	153,7 ⁽³⁾

Rabanete (<i>Raphanus sativus</i>)	160,0 ⁽³⁾
Salsa (<i>Petroselinum sativum</i>)	188,0 ⁽³⁾
Tangerina (<i>Citrus reticulata</i>)	134,1 ⁽¹⁾
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	13,7 ⁽¹⁾ – 76,9 ⁽³⁾
Uva branca (<i>Vitis vinifera</i>)	184,1 ⁽³⁾
Uva preta (<i>Vitis vinifera</i>)	213,3 ⁽³⁾
Uva vermelha (<i>Vitis vinifera</i>)	182,0 ⁽²⁾

(1) FALLER e FIALHO, 2009; (2) SUN et al, 2002; (3) MARINOVA et al, 2005;
(4) KUSKOSKI et al., 2006 ; (5) LIN e TANG, 2007.

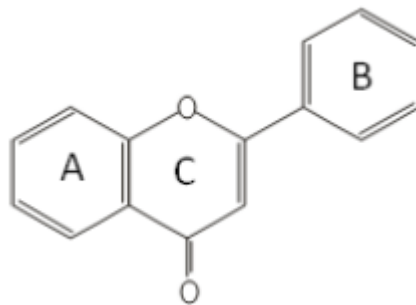


Figura 1: Núcleo fundamental de um flavonóide (TOSS, 2010)

Em 1990, aproximadamente 5000 substâncias eram classificadas como membros da classe dos flavonoides. Hoje, mais de 8000 estruturas são consideradas nessa classificação (ROSS e KASUM, 2002; QUIDEAU et al., 2011). As modificações na estrutura dos flavonoides podem ocorrer no anel central por meio de glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação entre outros. Essas mudanças estruturais, além de alterarem a polaridade e toxicidade dos compostos formados, são responsáveis também pelos diferentes potenciais terapêuticos de cada molécula (HARBORNE et al., 1994). Nas plantas, os flavonoides são encontrados principalmente na forma conjugada como glicosídeos (BERNARDES et al., 2010).

A ingestão diária de flavonoides pela população brasileira foi estimada como sendo em torno de 60-106 mg/dia, um resultado alto quando comparado a países como Dinamarca e Finlândia, mas baixo quando comparado à ingestão pela população dos Estados Unidos (ARABBI et al., 2004; HASSIMOTTO et al., 2009).

6 COMPOSTOS BIOATIVOS

6.1 Quercetina

A quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) (Figura 2) é considerada o principal flavonoide presente na dieta humana, representando 95% dos flavonoides ingeridos. Possui fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$, coloração amarelo cítrico brilhante, é insolúvel em água gelada, fracamente solúvel em água quente e totalmente solúvel em etanol e lipídios (KELLY, 2011). As principais fontes de quercetina são a cebola (284-486 mg/Kg), maçã (21-72 mg/Kg) e o brócolis (30 mg/Kg) (HERTOG et al., 1992; NIJVELDT et al., 2001). No entanto, também está presente em concentrações variáveis em bebidas (café, achocolatado, vinho tinto), frutas (limão), cereais e chás, com maiores teores encontrados no chá preto (*Camelia sinensis*). Plantas medicinais como *Ginkgo biloba* e *Hipericum perforatum* (erva de são-joão) também apresentam teores do composto (BEHLING et al., 2004; KELLY, 2011).

A principal forma em que é encontrada a quercetina é a glicosilada, formada pela junção de um grupamento glicosil, representado por açúcares como glicose, ramnose ou rutinose (quercetina-rutinosídeo). A absorção da quercetina ocorre na microbiota intestinal, sendo excretada na bile e urina em até 48 horas, sob as formas de glucoronidato e sulfato conjugado (BEHLING et al., 2004).

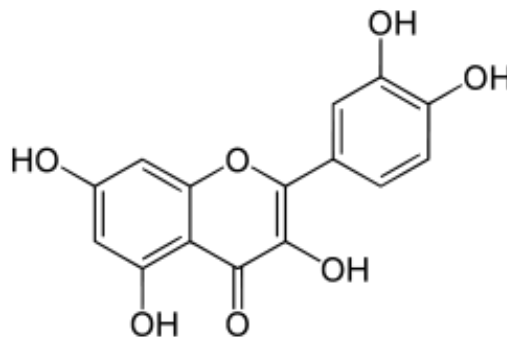


Figura 2 – Estrutura química da quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona)

6.1.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas

A quercetina atua principalmente sobre o radical hidroxila (OH^\cdot) e o ânion superóxido (O_2^\cdot), que são espécies reativas altamente deletérias envolvidas na peroxidação lipídica e nos danos a proteínas e ao DNA. Outras propriedades incluem a inibição da xantina oxidase e a capacidade de atuar como um quelante de ferro (BEHLING et al., 2004). As doses utilizadas em estudos envolvendo humanos, as quais apresentaram efeitos biológicos consideráveis, são inferiores a 150 mg/dia. A dose de 1 mg/dia, geralmente dividida em duas doses de 0,5 mg, é a mais utilizada. Tratamentos superiores a 157 mg/Kg realizados em ratos, demonstraram notórios efeitos pro-oxidantes (KELLY, 2011).

Os principais efeitos observados do tratamento com quercetina em modelos animais e em humanos estão relacionados com atividades antineoplásica, cardio, nefro e gastroprotetoras, anti-hipertensiva e antialérgica, principalmente (BEHLING et al., 2004). Os mecanismos antineoplásicos pelos quais a quercetina atua são vários, podendo estar relacionados com a capacidade antioxidante, antiproliferativa, pró-apoptótica, de efeitos na sinalização e fator de crescimento celular, assim como a própria potencialização de alguns agentes quimioterápicos, o que já é bastante conhecido (AKBAS et al., 2005).

Alinkeel et al. (2008) demonstraram que o tratamento com quercetina em cultura de células cancerosas prostáticas diminuiu a proliferação e viabilidade celulares por causar uma baixa na expressão de *heat shock protein 90* (Hsp-90). O tratamento de diferentes linhagens celulares do câncer de mama (SK-Br3, MDA-MB-453, MDA-MB-231 e MCF-10A) com quercetina demonstrou, entre outros efeitos, um aumento da expressão da proteína p21 via aumento da *Checkpoint kinase 2* (Chk2), o que levou à inibição da progressão do ciclo celular na fase G1 (JEONG et al., 2009).

A atividade cardioprotetora está relacionada principalmente pela inibição da agregação plaquetária e consequente formação do trombo, diminuição da pressão sanguínea, e diminuição do colesterol em camundongos hipercolesterolêmicos velhos (YAMAMOTO et al., 2006; LU et al., 2010a). Os efeitos antialérgicos da quercetina estão condicionados à inibição da liberação de histamina por mastócitos e basófilos. As funções no estômago estariam condicionadas à proteção da ulceração gástrica induzida por etanol, além de inibir,

mesmo que fracamente, o crescimento da bactéria *Helicobacter pylori* in vitro (SUZUKY et al., 1998; KELLY, 2011).

6.2 Rutina

A rutina foi isolada em 1930, sendo denominada, na época, de vitamina P. Apresenta fórmula $C_{27}H_{30}O_{16}$ e é derivada da quercetina, através da ligação de um dissacarídeo (ramnose mais glicose) à posição 3 do anel pirano central (Figura 3). É encontrada como um pó cristalino amarelo-esverdeado (PEDRIALI et al., 2005; NIJVELDT et al., 2001) e suas principais fontes na dieta são cebola, trigo serraceno (um pseudocereal asiático), uva, maçã, limão, feijão vermelho, tomates e bebidas como vinho tinto, chá preto e chimarrão (BECHO et al., 2009).

Apesar da rutina ser encontrada com certa frequência em diversos vegetais, somente algumas plantas apresentam quantidades significativas que podem ser extraídas para fins comerciais: a *Sophora japonica* L., Fabaceae, uma árvore encontrada no norte e centro da China (15-20% de rutina nos botões e flores); a *Faopyrum esculentum* Moech, *F. tataricum* (L.) Gaenth., Polygonaceae, o trigo sarraceno encontrado na China (2-8% de rutina nas folhas); e a *Dimopandra mollis* Benth, Fabaceae, conhecida como faveiro, cujos frutos (favas) apresentam 8g de rutina a cada 100g do pericarpo do fruto (PEDRIALI, 2005; BECHO et al., 2009). A síntese de rutina e quercetina pelas plantas ocorre principalmente como parte do mecanismo de proteção contra os efeitos da radiação ultravioleta (ROZEMA et al., 2002).

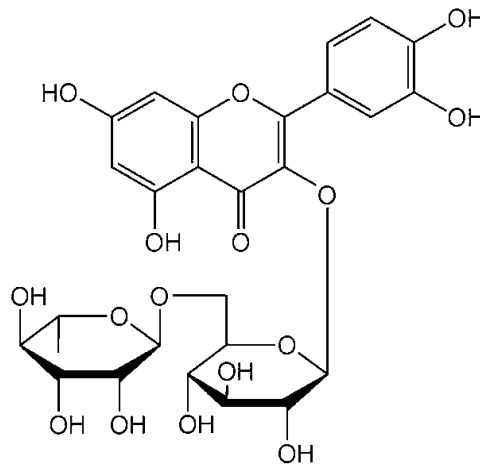


Figura 3 – Estrutura química da rutina (dissacarídeo ligado ao C3 do anel central)

6.2.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas

A rutina, assim como a quercetina, apresenta capacidade de sequestro de diversos radicais, principalmente sobre OH^\cdot e O_2^\cdot . Estudos demonstram que a rutina apresenta efeito superior ao manitol na capacidade de sequestro de radicais OH^\cdot , e maior efetividade na inibição de danos oxidativos no DNA por H_2O_2 quando comparada à vitamina C (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Assim, tem sido frequentemente utilizada como padrão de comparação da atividade antioxidante para diversos compostos. Através a técnica de sequestro de radicais 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), a rutina apresenta IC_{50} variável entre 4,14 $\mu\text{g/ml}$ a 27,8 $\mu\text{g/ml}$ (SOUSA et al., 2007; BOLIGON et al., 2009). Apesar de a rutina possuir atividade antioxidante inferior à quercetina, ela tem a vantagem de não apresentar os efeitos pró-oxidantes encontrados nos outros flavonoides. Além disso, a rutina promove um aumento da absorção de ácido ascórbico quando administrados concomitantemente. No entanto, a sua fraca solubilidade em água é responsável por sua baixa biodisponibilidade por via oral ou tópica (PATHAK et al., 1991; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010).

A rutina tem se destacado por seu potencial farmacológico em relação aos outros flavonoides. Suas ações estão relacionadas com atividade hipolipidêmica, melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, tratamento da artrite por *Candida albicans*, supressão do sistema imunológico, atividade anticarcinogênica e antiinflamatória (PEDRIALI, 2005; BECHO et al., 2009).

Virtuoso et al. (2001) demonstraram que a utilização de rutina e betalaína, isoladamente ou associadas, tiveram ação hipolipidêmica sobre parâmetros como colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos. Da mesma forma, a administração de rutina (120mg/kg/semana) em ratos *Wistar* durante 15 dias, demonstrou um importante papel na prevenção da aterosclerose, pois elevou significativamente os níveis de colesterol HDL (*High Density Lipoprotein*) de $35,82 \pm 2,31\text{mg/dL}$ para $44,40 \pm 3,11\text{mg/dL}$ (RODRIGUES et al., 2003).

Estudos desenvolvidos por Ghodasara et al. (2010) demonstraram que, a utilização de rutina e curcumina associadas (20 e 60 mg/Kg massa corpórea, respectivamente) no tratamento de hiperoxalúria em ratos, não só inibiram a formação de cálculo renal por oxalato de cálcio, como também preveniram danos renais quando comparados ao grupo controle. A

utilização de rutina também demonstrou uma quimioproteção contra a formação da catarata, quando induzida por selenito em ratos (ISAI et al., 2009).

6.3 Ácido gálico

O ácido gálico, também conhecido como ácido 3,4,5- trihidroxibenzoico (Figura 4), possui fórmula molecular $C_7H_6O_5$ e apresenta-se sob a forma de um pó branco, sólido e solúvel em água. A molécula pode ser obtida através da hidrólise ácida de taninos hidrolisáveis e, em sua forma ácida, permite a introdução de substituintes que dão origem a diferentes análogos ésteres com propriedades farmacológicas variadas. As principais fontes de ácido gálico na dieta são frutas como morango, uva, laranja, limão, tangerina, em bebidas como vinho tinto e em diversos chás (ROSSO, 2005; SILVA et al., 2010).

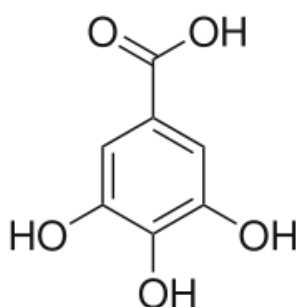


Figura 4 – Estrutura química do ácido gálico (3,4,5- trihidroxibenzoico)

6.3.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas

O ácido gálico apresenta excelente capacidade antioxidante pelo método de DPPH, com IC_{50} equivalente a $1,38 \pm 0,01$, superando compostos como ácido tânico e rutina nas concentrações testadas. O ácido gálico foi descrito como um dos principais componentes ativos do cravo, juntamente com o eugenol, e também como um dos principais polifenóis antioxidantes do vinho, onde estão presentes ainda antocianinas, catequinas e resveratrol (ROESLER et al., 2007).

A utilização do ácido gálico como um composto farmacologicamente ativo é datada do século XVIII, quando George Sampsom e John Lyell (1849) utilizavam o composto para o tratamento da microalbuminúria (ROSSO, 2005). Uma das principais propriedades terapêuticas do ácido gálico exploradas atualmente é a sua atividade antineoplásica frente a diversas linhagens de células tumorais, agindo de maneira efetiva e sem provocar danos às células normais (LU et al., 2010a).

No tratamento de duas linhagens celulares do câncer de próstata (22Rv1 dependente de andrógeno e DU145 andrógeno-independente), o ácido gálico promoveu uma significativa diminuição da viabilidade celular dose dependente através da estimulação da apoptose em ambas as linhagens (KAUR et al., 2009). Em células de glioma humano, o ácido gálico promoveu um decréscimo da proliferação celular e da capacidade de invasão via angiogênese (LU et al., 2010b).

Em testes realizados com células de leucemia promielocítica humana, o ácido gálico estimulou a indução da apoptose através da geração de espécies reativas do oxigênio e de íons cálcio (INOUE et al., 1994). Ele também demonstrou atividade antineoplásica frente a células A549, de adenocarcinoma de pulmão humano, e atividade antiinflamatória em camundongos (KROES et al., 1992; MAURYA et al., 2011).

6.4 Ácido cafeico

O ácido cafeico é o ácido hidroxicinâmico mais comumente encontrado na dieta. Possui fórmula molecular $C_9H_8O_4$ (Figura 5) e apresenta solubilidade em álcool. Está presente no mirtilo, cereja, pêra, maçã, ameixa, uva, laranja, tomate, batata, pomelo, própolis e café. Um consumo habitual de café resulta na ingestão de 250-500 mg de ácido cafeico por dia (MAURÍCIO, 2006; KANG et al., 2009).

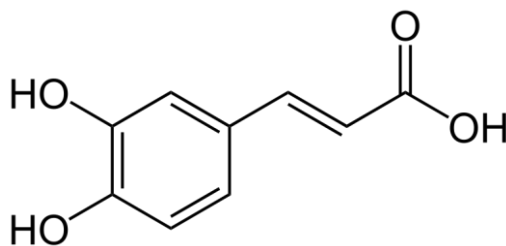


Figura 5 – Estrutura química do ácido cafeico (C₉H₈O₄)

6.4.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas

A atividade antioxidante do ácido cafeico é semelhante aos outros ácidos fenólicos, sendo potencialmente eficiente no sequestro de espécies reativas e como quelante de íons metálicos (PRAKASH et al., 2007). Dentre as propriedades terapêuticas do ácido cafeico estão: efeito antiinflamatório, efeito inibidor da xantina-oxidase, quimioproteção do estresse oxidativo induzido por peróxido em células, atenuação da oxidação do colesterol LDL e efeito hipotensor em ratos (IRAZ et al., 2005; MAURÍCIO, 2006). Jeong et al. (2011) demonstraram que o ácido cafeico isolado das folhas de *Erigeron annuus* (uma planta comumente encontrada na Coreia e na China) apresenta um elevado potencial antioxidante pelo método de *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) e uma atividade protetora frente à citotoxicidade induzida por estresse oxidativo em células neuronais PC12.

Um estudo no qual foi realizado o tratamento de camundongos diabéticos com ácido cafeico e ácido elágico, isoladamente, durante 12 semanas, demonstrou que esses compostos aumentaram os níveis de insulina plasmáticos e diminuíram os níveis de glicose. Além disso, houve uma diminuição do conteúdo de triglicerídeos no tecido cardíaco e no plasma, e dos níveis cardíacos de interleucina-1 β , interleucina-6 e fator de necrose tumoral, juntamente com um aumento da atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco (CHAO et al., 2009).

6.5 Ácido clorogênico

O ácido clorogênico é um éster formado pela junção do ácido cafeico com o ácido quínico (Figura 6). Ele foi inicialmente isolado em 1907, sob a forma de um composto

cristalino (clorogenato de cafeína) do qual se obteve o ácido puro. Apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ e é encontrado sob a forma de um pó cristalino com solubilidade em solventes orgânicos como álcool e dimetilsulfóxido (DMSO) (GARAMBONE e ROSA, 2007; TOSS, 2010).

As fontes de ácido clorogênico na dieta são café, frutas cítricas, maçã, pêra, tomate, frutas silvestres, alcachofra e berinjela. Ele é o principal constituinte fenólico do café, com uma concentração média de 200 mg para cada xícara de café americano. Nas plantas, algumas funções do ácido clorogênico são destacadas, como por exemplo a adstringência de alguns frutos ou partes de espécies vegetais e a capacidade de inibição das atividades enzimáticas do período de transição entre o final da fase de dormência da planta e o início do seu desenvolvimento (DE MARIA e MOREIRA, 2004; GARAMBONE e ROSA, 2007).

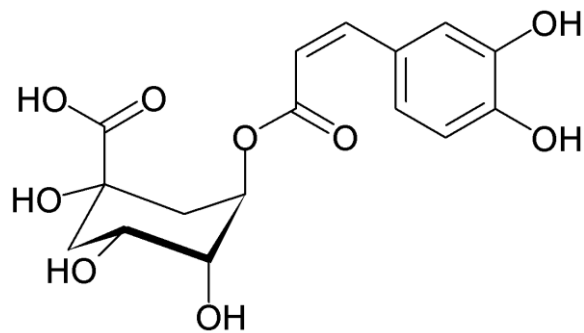


Figura 6 – Estrutura química do ácido clorogênico (éster da junção do ácido cafeico com o ácido quínico)

6.5.1 Propriedades antioxidantes e terapêuticas

Estudos de atividade antioxidante *in vitro* apontam o ácido clorogênico como um potente antioxidante, atuando no sequestro de espécies reativas e metais, e na modulação de algumas enzimas antioxidantes. Embora com uma atividade inferior aos outros ácidos fenólicos, devido à presença de poucas hidroxilas redutoras, o ácido clorogênico possui uma IC_{50} de aproximadamente $5,70 \pm 0,24$ na técnica de sequestro de radicais DPPH (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; GARAMBONE e ROSA, 2007; KIM et al., 2011).

Alguns estudos demonstram a atuação do ácido clorogênico na prevenção do diabetes melito tipo 2, efeito hipotensor, efeito hipolipidêmico em ratos obesos e possível ação anticarcinogênica *in vivo*, através da inibição de compostos oxidantes pró-carcinogênicos

(GARAMBONE e ROSA, 2007). Kim et al. (2011) demonstraram que o ácido clorogênico pode atenuar a formação de produtos finais de glicação avançada, responsáveis por grande parte das complicações do diabetes melito.

6.6 Carotenoides

6.6.1 Apresentação

Os carotenoides são corantes naturais amplamente encontrados tanto em vegetais (frutas, verduras e raízes) quanto em animais (alguns peixes, crustáceos e microorganismos). Suas colorações conferem tons que variam do amarelo ao vermelho, sendo a intensidade das cores relacionada à presença de um cromóforo formado por uma cadeia de duplas ligações conjugadas (SILVA e MERCADANTE, 2002; PENTEADO, 2003; AMBRÓSIO et al., 2006).

O principal exemplo são os carotenoides pró-vitâmnicos A, como o beta-caroteno que, após a absorção por difusão nas microvilosidades da metade superior do intestino, apresenta como principais produtos finais de clivagem nos tecidos o retinol e o ácido retinoico. Somente 50 a 60% dos carotenoides provenientes da dieta são absorvidos, o que varia com a biodisponibilidade, pois quando estiver aumentada, conseqüentemente, menor será a absorção. Este é um dos fatores pelo qual a ingestão de altas quantidades de carotenoides não causa hipervitaminose A (PENTEADO, 2003; COSTA e ROSA, 2010). Os carotenoides encontram-se em concentrações destacadas no tecido adiposo, fígado, músculo, testículo, pulmão e no próprio plasma, onde predominam o licopeno, que apresenta a maior atividade antioxidante, e o complexo luteína-zeaxantina (COSTA e ROSA, 2010).

A maior parte da vitamina A ingerida por humanos é oriunda dos precursores alfa, beta e gama-caroteno de frutas vermelhas, amarelas e vegetais verdes (BALL, 1998; PENTEADO, 2003). As principais frutas e vegetais que compõem a dieta de carotenoides em humanos são melancia, cenoura, espinafre, tomate, manga, damasco, melão, alface e beterraba (folhas) (DOUGLAS, 2006). Por outro lado, o óleo-de-dendê é responsável por 75% do total

da dieta de carotenoides em alguns países africanos, uma vez que possui uma concentração dessas substâncias dez vezes maior que a encontrada na cenoura (PENTEADO, 2003).

6.6.2 Estrutura química e classificação

Os carotenoides possuem uma estrutura polisoprenoide, com 40 átomos de carbono contendo duplas ligações conjugadas. Quimicamente, dividem-se em dois grupos: carotenos, que são carotenoides hidrocarbonados, ou seja, que possuem apenas carbono e hidrogênio em sua molécula; e xantofilas, que são os carotenoides oxigenados (cetonas, hidróxi, metóxi, epóxi ou ácido carboxílico) (GOODWIN, 1965; BRITTON et al, 1995; DOUGLAS, 2006).

No grupo dos carotenos, podemos citar como exemplo o licopeno e os alfa, beta e gama carotenos. No grupo das xantofilas, dentre as principais estão a luteína e a zeaxantina. Um grupo especial de carotenoides e extremamente importante é o dos retinóis, dentre os quais destacam-se o ácido retinoico todo-trans (ATRA), principalmente, bem como o ácido retinoico 9-cis (AMBRÓSIO et al., 2006; DOUGLAS, 2006).

Devido às diversas insaturações ao longo da estrutura molecular, os carotenoides são substâncias sensíveis à luz, à temperatura, ao pH ácido e a reações de oxidação. Assim, o armazenamento e a estocagem dessas substâncias devem ser cuidadosamente realizados. Como a maioria dos carotenoides são de natureza hidrofóbica e lipofílica, os melhores solventes para amostras frescas, que ainda contêm uma grande quantidade de água, são álcool, acetona e clorofórmio. Já para as amostras secas, os mais indicados são aqueles imiscíveis em água, como éter de petróleo, hexano e éter etílico (KRINSKY, 1989; PENTEADO, 2003; AMBRÓSIO et al., 2006).

6.6.3 Funções

A presença dos carotenoides tem extrema relevância em todas as espécies que os apresentam. Nas plantas, eles desempenham uma função fotoprotetora através da forma epóxi-xantófilos, que absorve o excesso de energia luminosa solar, e também participam da

fotossíntese, uma vez que são pigmentos acessórios. Nos animais, as principais são a função pró-vitáminica A, a de estimulação da diferenciação celular e da resposta imune, a modulação da oxidação celular e a depressão da oncogênese e da degeneração celular (DOUGLAS, 2006).

A atividade pró-vitáminica A dos carotenoides é condicionada pela presença de pelo menos um anel beta-ionona não substituído ligado à cadeia poliênica terminal, o que os torna precursores do retinol (COSTA e ROSA, 2010). O beta-caroteno, principalmente o isômero beta-caroteno-todo-*trans*, é o que possui maior atividade pro-vitáminica A (100%) por possuir dois anéis beta-ionona não substituídos em ambos os lados da cadeia de duplas ligações (BAUERNFEIND, 1972). Já alfa e gama-carotenos possuem menor atividade, aproximando-se da metade apresentada pelo beta-caroteno (ERDMAN, 1979; RONCADA et al., 1984; PENTEADO, 2003).

A vitamina A é armazenada no fígado sob a forma de éster de retinol, sendo liberado para a circulação na forma de retinol após a hidrólise do éster, processo regulado conforme a necessidade fisiológica. A vitamina A desempenha funções importantíssimas no organismo, através da formação de pigmentos de visão noturna, como a rodopsina presente nos bastonetes da retina, e de visão diurna, como a iodopsina, localizada nos cones da retina (DOUGLAS, 2006). Assim, a carência de vitamina A pode levar a níveis baixos de rodopsina nos bastonetes da retina, levando à chamada nictalopia ou cegueira noturna. Outras funções da vitamina A estariam relacionadas à manutenção da estrutura óssea, manutenção e crescimento do tecido epitelial, crescimento e reprodução (DOUGLAS, 2006).

A diferenciação celular de algumas estruturas em formação, como mesênquima e ectoderma, é estimulada por diversos carotenoides, especialmente o ácido retinoico (DOUGLAS, 2006). No entanto, o uso de carotenoides como beta-caroteno e cantaxantina demonstraram uma estimulação da diferenciação celular nas linhagens MCF-10A do epitélio mamário (ROCK et al., 1995). Quanto à resposta imune, alguns carotenoides como a xantina, cantaxantina, luteína e beta-caroteno agem estimulando linfócitos T_{H1} e monócitos, os quais são estimulados a aumentar a expressão de MHC-II (*Major Histocompatibility Complex – Class II*), diminuir a formação de interferon-gama e aumentar a formação de anticorpos (DOUGLAS, 2006).

A propriedade antioncogênica dos carotenoides está associada a sua capacidade de se comportar como um modulador nutricional do estresse oxidativo, como também observado em compostos como vitamina C, alfa-tocoferol e selênio (DOUGLAS, 2006). Em determinados momentos, alguns carotenoides agem como substâncias sequestrantes de radicais livres, exercendo função protetora do material genético. É o caso da astaxantina, que quando comparada a substâncias como o alfa-tocoferol, por exemplo, possui uma capacidade de combate a radicais livres 250 vezes maior (PENTEADO, 2003). No entanto, esses mesmos carotenoides podem atuar de maneira inversa, excitando mecanismos pró-oxidativos, como observado nos efeitos onco-deletérios em câncer pulmonar e nos processos de proteção da degeneração macular (BEATTY et al., 2000; DOUGLAS, 2006).

6.6.4 Propriedades antioxidantes e terapêuticas

Devido à estrutura formada por átomos de carbono contendo duplas ligações conjugadas, os carotenoides apresentam excelentes propriedades antioxidantes (DOUGLAS, 2006). São classificados como agentes redutores incomuns, uma vez que reduzem com maior eficiência os produtos de oxidação quando a baixos níveis de oxigênio. Assim, como na maioria dos tecidos as concentrações de oxigênio são baixas, os carotenoides desempenham papel fundamental como antioxidantes (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais eles exercem suas atividades no ciclo oxidativo *in vivo* estão baseados na desativação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ou no sequestro de radicais peroxila, o que confere uma diminuição da oxidação do DNA e de lipídios. A velocidade de desativação do $^1\text{O}_2$ pelos carotenoides é superior à dos tocoferóis, podendo ocorrer através da transferência física da energia de excitação do $^1\text{O}_2$ para o carotenoide ou mediante reação química entre ambos. A ação sobre o $^1\text{O}_2$ é a principal função antioxidante dos carotenoides (BARREIROS et al., 2006; DAMODARAN et al., 2008).

Os carotenoides estão associados a quimioprevenção de diversas doenças em humanos. Distúrbios cardiovasculares, hipertensão, degenerações maculares, neoplasias de mama, de próstata e doenças dérmicas podem ser prevenidas ou minimizadas após uma ingestão regular de carotenoides específicos (JENAB et al., 2006; TERAOKA et al., 2011;

MUKHERJEE et al., 2006; KOAY et al., 2010; WANG et al., 2008; LAURETANI et al., 2008).

Tamimi e cols. (2009) fizeram uma correlação entre a alta presença de carotenoides circulantes (alfa-caroteno, beta-criptoxantina, licopeno e luteína ou zeaxantina) e o risco de câncer de mama em mulheres o qual foi quantificado por densidade mamográfica. Assim, observaram que aquelas que apresentavam altas concentrações circulantes de carotenoides, tiveram uma redução de 40 a 50% no risco de desenvolvimento de câncer de mama. Outros estudos também desenvolvidos demonstraram uma capacidade semelhante desses carotenoides na prevenção do desenvolvimento de câncer de mama (DORJGOCHOO et al., 2009).

A exposição do endotélio vascular à fração oxidada do colesterol LDL (LDL-oxidada) é uma das principais causas do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ROSS, 2002; XAVIER et al., 2004). O beta-caroteno, devido a sua propriedade antioxidante, atua inibindo a oxidação da fração LDL, demonstrando uma ação protetora frente a doenças cardiovasculares (OSGANIAN et al., 2003; AMBRÓSIO et al., 2006).

Um estudo realizado por Bhosale et al. (2009), demonstrou que os carotenoides (especialmente luteína e zeaxantina) atuam protegendo a formação e oxidação de um constituinte importante da lipofuscina (AE2) encontrado na retina, responsável por mediar reações oxidativas que levam ao envelhecimento do epitélio da retina e degenerações maculares idade relacionadas (BEATTY et al., 2000).

Jenab et al. (2006) estabeleceram a associação entre as concentrações totais no plasma de sete carotenoides comuns (alfa-caroteno, beta-caroteno, luteína, zeaxantina, beta-criptoxantina, licopeno e cantaxantina), além de retinol, alfa e gama-tocoferol, com o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico em 244 indivíduos acompanhados por um período de 3,2 anos. Dentre os resultados, observaram que os indivíduos que possuíam altas concentrações dos carotenoides zeaxantina e beta-criptoxantina, além de retinol e alfa-tocoferol, apresentaram um risco significativamente menor para o desenvolvimento de câncer gástrico do que os demais analisados.

Em um estudo semelhante envolvendo quantificação plasmática, foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrofotometria de Massa (GC/MS) os níveis de carotenoides no plasma, incluindo

retinoides, de pacientes que apresentavam apneia do sono obstrutiva leve. Dentre outras conclusões, verificou-se que os indivíduos portadores desse distúrbio tinham concentrações plasmáticas significativamente baixas de retinil-palmitato, ácido retinoico 9-*cis*, beta-caroteno todo-*trans* e beta-caroteno 9-*cis*, quando comparados com os dos indivíduos controles (DAY et al., 2009).

Um grupo de 4412 indivíduos, incluindo homens e mulheres com idade entre 18 e 30 anos, tiveram os níveis plasmáticos de quatro carotenoides (alfa-caroteno, beta-caroteno, luteína/zeaxantina e beta-criptoxantina) monitorados durante 20 anos. Os resultados demonstraram uma relação inversa dos níveis de carotenoides com a pressão sanguínea. Além disso, aqueles que apresentaram a soma dos quatro carotenoides alta, tiveram um risco de hipertensão significativamente menor (HOZAWA et al, 2009).

Há evidências de que concentrações significativas de licopeno sérico, associadas a uma suplementação com beta-caroteno, proporcionam um aumento na velocidade de reparo do DNA após sofrer danos (TORBERGSEN e COLLINS, 2000).

6.6.5 Beta-caroteno

O beta-caroteno é uma molécula pertencente à família dos hidrocarbonetos ($C_{40}H_{56}$) e encontrado sob a forma de pó cristalino avermelhado. Possui ponto de fusão entre 176-182 °C, sendo insolúvel em água e solúvel em álcool, óleos e gorduras. O beta-caroteno é considerado o mais importante dentre os carotenoides, sobretudo por sua ação pró-vitamínica A (DOUGLAS, 2006; COSTA e ROSA, 2010). Ele pode apresentar-se na forma de três isômeros diferentes: beta-caroteno todo-*trans*, 9-*cis* beta-caroteno e 13-*cis* beta-caroteno, que possuem, respectivamente, atividade pró-vitamínica A de 100%, 37% e 45,6% (Figura 3) (COSTA e ROSA, 2010).

Há alguns anos atrás, não havia ainda um conhecimento fundamentado com relação ao real efeito quimiopreventivo do beta-caroteno. Pensava-se que sua ação poderia ser provocada por sua conversão em vitamina A, e não pela própria molécula de beta-caroteno. No entanto, observou-se que o beta-caroteno apresenta atividade antioxidante cinco vezes maior que a da vitamina A (WILLIS e WIANS, 2003; BARREIROS et al., 2006).

O beta-caroteno, como qualquer outro composto antioxidante, tem a necessidade de ajuste da dose utilizada, uma vez que poderá apresentar atividade pró-oxidante em doses elevadas. Concentrações superiores a 4-5 μM podem diminuir a capacidade antioxidante do composto ou até mesmo induzir a danos no material genético (WOODS et al., 1999). Doses entre 20-50 mg/dia podem aumentar o risco de cardiopatia e câncer em tabagistas (TALBOTT e HUGHES, 2008).

Por outro lado, concentrações adequadas de beta-caroteno estão associadas a um risco menor de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, catarata, hipertensão, apneia do sono obstrutiva leve, além da quimioproteção à célula e ao material genético, através da atividade antioxidante nos meios extra e intracelular, respectivamente (LOWE et al., 1999; OSGANIAN et al., 2003; AMBRÓSIO et al., 2006; TALBOTT e HUGHES, 2008; DAY et al., 2009; HOZAWA et al., 2009). O beta-caroteno também diminui o foto-envelhecimento provocado pela radiação ultra-violeta A em pele humana, por agir como um *quencher* de O_2 (TERAO et al., 2011).

7 FRUTOS DA AMAZÔNIA

O Brasil apresenta a maior biodiversidade vegetal do mundo, contendo mais de 55 mil espécies catalogadas e um total de 300 mil ainda não identificadas, presentes, sobretudo, na região amazônica. Com relação à produção de frutos, o país ocupa o terceiro lugar a nível mundial (6% da produção total). Apesar dos resultados expressivos, apenas 0,2%, da produção nacional é composta pela fruticultura amazônica, em cujos frutos têm sido demonstrados altos valores nutritivos e presença de compostos bioativos importantes (CANUTO et al., 2010).

Del Pozo-Insfran et al. (2006) demonstraram que os compostos fenólicos extraídos do açaí (*Euterpe oleraceae*) são capazes de induzir a apoptose de células leucêmicas humanas HL-60, provavelmente pela ativação da caspase – 3. Outras propriedades do açaí também descritas são a potente atividade antioxidante do extrato e a de inibição da produção de óxido nítrico pela linhagem celular RAW 264,7 (MATHEUS et al., 2003; CANUTO et al., 2010).

Fukumasu et al. (2008) demonstraram que camundongos induzidos à tumorigênese e tratados com guaraná (*Paullinia cupana*) apresentaram 68,6% de redução na área abrangente pelo tumor, 57,9% de redução no índice de proliferação tumoral e 4,85% de aumento no índice apoptótico celular, quando comparados com os animais do grupo controle que não receberam o tratamento. Krewer et al. (2011), avaliaram a ingestão habitual diária de guaraná em pó (bebida) por 637 idosos do município de Maués (Amazonas), encontraram que o grupo que ingeria guaraná apresentava menor prevalência de hipertensão, obesidade e síndrome metabólica, quando comparado ao grupo que não ingeria a bebida.

Uma descoberta importante diz respeito aos teores de vitamina C encontrados no camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). O fruto, encontrado próximo a rios, lagos e igapós da região amazônica, pode apresentar até quatro vezes a concentração de vitamina C presente na acerola. A ingestão de um fruto de camu-camu, com peso de 10 g, poderia ultrapassar a dose diária de vitamina C recomendada para um homem adulto em 233%, uma vez que algumas espécies isoladas podem apresentar até $6112 \pm 137,5$ mg vitamina C / 100 g em polpa fresca (YUYAMA et al., 2002).

Os frutos das palmeiras estão entre os principais explorados pela população local, seja para o consumo *in natura* ou para fins comerciais. Destes, podemos destacar o buriti (*Mauritia flexuosa*), o inajá (*Maximiliana maripa*), a bacaba (*Oenocarpus bacaba*), o patauá (*Oenocarpus bataua*), a pupunha (*Bactris gasipaes*) e o açai (*Euterpe oleraceae*). Deste último são consumidas mais de 180 mil toneladas por ano só na cidade de Belém (SHANLEY e MEDINA, 2005).

7.1 Tucumã

7.1.1 Apresentação

O tucumã é o fruto da palmeira *Astrocaryum aculeatum*, pertencente à família Arecaceae e popularmente conhecida como tucumã-do-amazonas, tucumanzeiro ou tucumã-açu (Figura 7). É encontrado principalmente no estado do Amazonas, de onde parece ser

nativo. No entanto, outros estados como Pará, Roraima, Rondônia, Acre e Mato Grosso também apresentam a planta (CAVALCANTE, 1991).

O tucumã-do-amazonas está presente em ambientes de terra firme, vegetação secundária e solos pobres e degradados. Apresenta estipe ereto medindo de 10 a 30 metros de altura, sendo coberto, em sua metade superior, por espinhos dispostos em anéis. As folhas apresentam espinhos em sua extensão e medem de 4 a 5 metros de comprimento, sendo suas fibras comumente usadas na fabricação artesanal de cestos, balaios, redes de dormir e pescar (CAVALCANTE, 1991; SOUZA et al., 1996).

O tucumã possui um período de germinação que pode variar de 2 a 3 anos (KOEBERNICK, 1971; SÁ, 1984). No entanto, Gentil e Ferreira (2005) demonstraram que a embebição das sementes com 30% de água durante nove dias, aumentou a germinação e reduziu seu tempo médio para apenas 104 dias. O tucumã-do-amazonas difere do tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare*) em diversos aspectos, mas principalmente pela cor da casca, tamanho do fruto (maior) e consistência da polpa, a qual é mais firme e menos fibrosa que a do tucumã-do-pará (SHANLEY e MEDINA, 2005).



Figura 7: População de Tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum aculeatum*). Adaptado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (www.inpa.gov.br)

7.1.2 Atividade exploratória

O tucumã-do-amazonas produz, em média, de três a quatro cachos por ano, com uma quantidade em torno de 240 frutos por cacho. A produtividade da palmeira é em torno de 12 Kg/ano, começando tardiamente, quando a árvore atinge sete anos ao mínimo, com altura entre 6 e 9 metros (SHANLEY e MEDINA, 2005). A atividade de exploração do tucumã gira em torno da comercialização da polpa do fruto, a qual é utilizada para o consumo *in natura* ou na fabricação de licores, doces, sorvetes, sucos e para o popular sanduíche de tucumã. Além disso, da polpa e da semente do fruto, são extraídos ainda diferentes óleos comestíveis (MENDONÇA, 1996).

O tucumã também tem importância como fonte de alimentação para os animais silvestres da região. Arara, papagaio, mutum, veado, catitu, queixada, cutia, paca e tatu alimentam-se do fruto, sendo a cutia, a principal responsável pela dispersão da palmeira, uma vez que enterra as sementes a alguns centímetros para procurá-las mais tarde (SHANLEY e MEDINA, 2005).

7.1.3 Caracterização do fruto

O tucumã tem peso variando entre 20 e 100 gramas, com coloração da casca em tons de verde ou amarelo. O comprimento do fruto gira em torno de 4,5 – 6,0 cm e o diâmetro de 3,5 a 4,5 cm. A polpa, de consistência firme, possui coloração que vai do amarelo ao alaranjado (Figuras 6), contendo 9% de proteínas, 55% de óleo e representando 22% do peso do fruto (SHANLEY e MEDINA, 2005).

Foram identificadas na polpa do tucumã as seguintes substâncias: carotenoides (62,65 ug/g de polpa fresca), sendo 21 formas diferentes, com predominância de 75% do beta-caroteno todo trans; flavonoides como catequina e quercetina, além de ácido ascórbico (58±4 mg/100g) (DE ROSSO e MERCADANTE, 2007; GONÇALVES, 2008). Barbosa et al. (2009), através de análises cromatográficas, identificaram um excelente potencial na produção de biocombustível a partir do óleo extraído das amêndoas do tucumã. Com relação à casca,

pouco se tem conhecimento. Os índios Apurinã afirmam que a casca do tucumã, quando preta, apresenta propriedades energéticas e é um protetor espiritual (SHANLEY e MEDINA, 2005).



Figura 8: Tucumãs (inteiros, parcialmente descascados, e seccionados). Adaptado do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (www.inpa.gov.br)

8 ENSAIOS *IN VITRO* NA BIOPROSPECÇÃO DE FRUTOS COM PROPRIEDADES FARMACOTERAPÊUTICAS

8.1 Ensaios de atividade antioxidante

8.1.1 Sequestro de radicais DPPH

A atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas pode ser avaliada por diversas técnicas. Dentre as mais utilizadas está a atividade sequestradora de radicais DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), inicialmente proposta por Brand-Willians et al. (1995). Esta técnica consiste na redução do radical DPPH, de cor púrpura, a difenil-picril-hidrazina, que apresenta cor amarela, através da ação de uma substância antioxidante.

A variação de cor provoca uma diminuição ou desaparecimento da absorbância a 518 nm, sendo proporcional à atividade antioxidante. Assim, através dos resultados podem ser estabelecidos parâmetros como a porcentagem de atividade antioxidante (AA%) e a concentração necessária para decrescer em 50% os radicais DPPH, chamada de concentração

eficiente (CE₅₀). Dessa forma, quanto maior a captura de radicais DPPH, menor será a CE₅₀ e maior será a atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

8.1.2 TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*)

O TRAP foi a primeira técnica desenvolvida para determinar a capacidade antioxidante total no plasma (VASCONCELOS et al., 2007). Ao contrário das técnicas que envolvem a transferência de elétrons, como o Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) e a Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox (TEAC), o TRAP baseia-se na transferência de átomos de hidrogênio para radicais peroxilas formados a partir de um azoiniciador, como por exemplo o 2,2' – azobis (2-aminopropano) dihidrocloridrato (AAPH) (HUANG et al., 2005).

Na técnica descrita por LISSI et al. (1992), o AAPH sofre decomposição térmica originando radicais peroxilas que reagem com o composto luminol adicionado no meio, produzindo uma luminescência que é proporcional à quantidade de radicais presentes na amostra. A administração de um antioxidante no sistema contendo tampão provoca uma diminuição da luminescência devido à captura dos radicais livres (NUNES, 2010). A diminuição da luminescência é proporcional à capacidade antioxidante da amostra, assim como o tempo necessário para que a luminescência inicial seja restabelecida (LISSI et al., 1992).

8.2 Ensaio de citotoxicidade

Os testes *in vitro* de citotoxicidade são o primeiro parâmetro de análise comportamental da célula frente a um composto testado. A partir deles, podemos estabelecer a potencialidade de aplicação clínica de uma droga ou extrato, ou até mesmo a biocompatibilidade de certas superfícies ou materiais quando em contato com a célula (CASTRO et al., 2004).

Um composto analisado em um teste de citotoxicidade *in vitro* não deve provocar a morte celular nem afetar suas funções. Dessa forma, por meio do cultivo com técnicas adaptadas à fisiologia celular, podem ser determinadas a taxa de apoptose, inibição do crescimento, estimulação da proliferação celular e outros efeitos relacionados (DAGUANO et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008).

Os ensaios utilizados nos testes de citotoxicidade podem ser baseados na integridade da membrana celular, na respiração e glicólise, na capacidade de incorporação de radioisótopos, no conteúdo de proteínas totais ou no metabolismo enzimático via ensaios colorimétricos (MASTERS, 2000). Dentre os mais utilizados estão o ensaio colorimétrico através do 3-(4,5)-dimetilialzólil -2,5 difeniltetrazólio (MTT), o método de exclusão por azul de tripan ou por *Fast Green*, e a determinação dos níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular (PERES e CURI, 2005).

O ensaio colorimétrico MTT é uma das técnicas mais empregadas na determinação da citotoxicidade, sendo também utilizada para a obtenção da taxa de proliferação celular em culturas (MASTERS, 2000). Proposto por Mosman et al. (1983), ele consiste na metabolização do reagente MTT, originalmente de cor amarela, em cristais de formazan de cor violácea, através da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial. Esta enzima permanece ativa somente em células viáveis, sendo, portanto, a intensidade da cor violácea proporcional ao número de células vivas.

Outros métodos como o de exclusão por azul de tripan e o da LDH também são utilizados. Eles permitem avaliar a integridade da membrana celular, a qual está comprometida nas células mortas. As células viáveis não se coram pelo tripan, ao contrário das células mortas, onde o corante preenche totalmente o citoplasma. Já no caso da LDH, quanto maiores os níveis da enzima no meio extracelular, maior o número de células mortas (MASTERS, 2000; PERES e CURI, 2005).

A cultura de células mononucleares do sangue periférico ou *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) é uma das mais utilizadas em ensaios de citotoxicidade, por se tratarem de células de fácil obtenção, de capacidade proliferativa considerável e por serem sensíveis a danos genéticos (DE GROOTE et al., 1992; VIALARD et al., 1999; PERES e CURI, 2005; BASTOS, 2008).

9 OBJETIVOS

9.1 Geral

Deteminar o perfil antioxidante, a presença de compostos bioativos e a citotoxicidade dos extratos etanólicos da polpa e da casca do tucumã.

9.2 Específicos

- Determinar o potencial antioxidante dos extratos da polpa e da casca do tucumã através das técnicas de sequestro de radicais 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e de Potencial Antioxidante Reativo Total (TRAP);
- Determinar a presença de polifenóis, taninos, flavonoides e alcaloides totais presentes nos extratos da polpa e da casca do fruto;
- Realizar a identificação de compostos bioativos nos extratos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos da polpa e da casca de tucumã em cultura de células mononucleares de sangue periférico (CSMP) através do ensaio colorimétrico com 3-(4,5)-dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio (MTT) e do método de exclusão com Azul de Tripan.

10 RESULTADOS

Os itens “Materiais e métodos” e “Resultados” referentes a esta dissertação, estão apresentados sob a forma de um manuscrito a seguir. A apresentação do manuscrito está baseada na versão submetida à revista *Food and Chemistry Toxicology* (Índice de impacto:

2.999, Qualis B1 na Área Ciências Biológicas II da CAPES), com o título de “The *in vitro* antioxidant activity and cytotoxicity of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, M.) peel and pulp extracts”.

**THE *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CITOTOXICITY OF TUCUMÃ
(*ASTROCARYUM ACULEATUM*, M.) PEEL AND PULP EXTRACTS**

Luiz Filipe Machado Garcia¹, Michele Rorato Sagrillo¹, Olmiro Cezimbra de Souza-Filho¹, Euler Esteves Ribeiro², Aline Augusti Boligon¹, Margareth Linde Athayde³, Rômulo Pilon Barcelos³, Ademir Faria Morel⁴, Clarice Pinheiro Mostardeiro,¹ Francine Cadoná³, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (RS), Brasil.

² Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas (AM), Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (RS), Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (RS), Brasil.

* Corresponding author: Ivana BM Cruz, UFSM, Av.Roraima 1000, Prédio 19, Zip Code: 90105900, Santa Maria-RS, Brazil. Phone: 55-55-32208163, Fax: 55-55-32208239, email: ibmcruz@hotmail.com

Grants and funding sources: CNPq, FAPEAM, FAPERGS, CAPES

ABSTRACT

The palm tucumã fruit (*Astrocaryum aculeatum*) is an amazon fruit traditionally consumed in regional breakfast. This fruit is a good source of carotenoid and oils. In this study, we performed the identification of bioactive compounds present in tucumã peel and pulp ethanolic extracts. The antioxidant activity and the potential cytotoxic extracts effect were also performed. The extracts presented higher β -carotene and quercetin concentrations. Gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and rutin as well as total tannins and alkaloids were also identified for the first time in tucumã fruit. Both extracts showed strong antioxidant activity evaluated by DPPH and TRAP assays. However, an elevated concentration ($>1000 \mu\text{g/mL}$) presented cytotoxic effects on peripheral blood mononuclear cell cultures. These results suggest that the peel and the pulp of tucumã extracts are a good source of bioactive compounds with important antioxidant activity and potentially beneficial effects on human health depending on its concentration.

Key-words: *Astrocaryum aculeatum*, tucumã, polyphenols, antioxidant activity, antioxidant compounds, cytotoxicity

Introduction

The tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) is a peculiar Amazon fruit, a favorite in Brazilian Amazonian region. The tucumã is a fruit belonging to the genus *Astrocaryum* with 40 species common in tropical South America, extending northwards reaching Central America, Trinidad and West Indies. Twenty-six species grow in Brazil including *Astrocaryum aculeatum* and *Astrocaryum vulgare* that are consumed by the native population. In the city of Manaus, located in the Amazonas state, the sold tucumã is the *A. aculeatum* (Shanley, Cymerys, Serra & Medina, 2011). This palm fruit is one of the traditional components of the regional breakfast. The fruit's pulp is also eaten as a filling for tapioca pancakes. Because of its high popularity, the tucumã is being sold in the Manaus local markets as well as on downtown streets (Shanley et al, 2011).

The tucumã is a drupe, void in shape with orange-green bark, weighing anywhere between 20 to 100g. The pulp contains 34% fruit; its weight corresponds to the external component that covers the seed. A mature tucumã tree (a minimum of seven years old) produces about 50kg of fruit per year (Shanley et al, 2011). The tucumã's centesimal composition analysis shows that the mesocarp contains 412.73 ± 2.12 kcal, 44.9 ± 0.30 g wet content, 10.9 ± 0.1 g fibers, 3.5 ± 0.07 g proteins, 8.5 ± 0.6 g carbohydrates and 40.5 ± 0.5 g fats per 100g of pulp. Previous studies have shown that the oil extracted from tucumã pulp puts forth 74.4% unsaturated and 25.6% saturated fatty acids rich in Omega 3, 6 and 9 fatty acids.

De Rosso & Mercadante (2007) performed identification and quantification of carotenoids from six Amazonian fruits including tucumã. The evaluation tucumã carotenoid's described 24 carotenoids of which 21 were chemically identified. All-trans- β -carotene was found to be the principal carotenoid, representing 75% of total carotenoid content in tucumã

followed by 13-cis- β -carotene, all-trans- α -carotene, all-trans- β -cryptoxanthin, each representing between 2.0 – 2.8% of total carotenoid content. The other 19 carotenoids represent 15% of the total content. The analysis showed that tucumã offers one of the highest concentrations of pro-vitamin A (beta-carotene) with 52mg/100g pulp. This concentration is approximately eight times higher than that found in carrots (6.6 milligrams/100g pulp). The mean consumption of 30g tucumã pulp can supply three times the daily vitamin A requirement for an adult.

Despite the nutritional properties previously described, few studies are available that investigate the functional properties of tucumã as it affects human health. Therefore, in this study, we quantified some bioactive compounds present in the peel and pulp of the tucumã ethanolic extracts and analyzed the *in vitro* antioxidant activity and cytotoxicity of different concentrations of these extracts.

1 Materials and Methods

1.1 Chemicals

All chemicals were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, chlorogenic acid and caffeic acid were purchased from Merck[®] (Darmstadt, Germany). Quercetin, rutin and β -carotene, as well as the other chemical reagents used in antioxidant activity analysis, were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The reagents to peripheral mononuclear cell culture (PBMC) were purchased from Invitrogen Co. (USA) and Cultilab Co. (São Paulo, Brazil). To obtain the tucumã extracts, we used rotary evaporator equipment (Fisatom, Perdizes, SP, Brasil) and liophylisator equipment (Terroni, Model LD 1500, São Carlos, SP, Brasil). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto Sampler (SIL-20A),

equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with the integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD (diode) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. The spectrophotometry analyses were performed using a spectrophotometer UV-1100 (Pró-Análise Co., São Paulo, Brasil); the chemiluminescence analyses were performed using the luminometer Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT USA); the *in vitro* cell viability analyses were performed using a microplate reader Spectramax M2/M2 (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, U.S.A).

1.2 Tucumã peel and pulp ethanolic extracts

Tucumã peel and pulp extracts were obtained from a composite sample representing a mixture of progenies from a native forest near Maues City (Amazonas State, Brazil), located in the Amazonian region (3.38°S, 57.71°W). Therefore, we used a composite sample since the tucumã is cultivated in crops but collected directly from native palm trees found in primary and secondary forests, pastures and home gardens (Shanley et al, 2011). Tucumã usually flowers from June to January, and produces fruit from February to August. We obtained the fruits extracted from Manaus's tucumã palms in February 2010.

The sample fruits (4kg) were transported to the Biogenomic Laboratory in the Center of Health Sciences of Universidade Federal de Santa Maria (Rio Grande do Sul State). The pulp and peel were manually removed and kept frozen at -18°C until extraction procedures were performed one week later, producing 800g peel and 400g pulp. The ethanolic tucumã extract was prepared from tucumã pulp and peel samples that were titrated and placed separately into a sealed amber glass containing an absolute ethanol solution, at a ratio of 1:5 (w / v). The extraction was performed over four days. The homogenate was filtered through Whatman No. 1 paper, then collected; the ethanol was removed using a rotary evaporator at

reduced pressure, 25° at 115 rpm. Following this procedure, the pulp and peel extracts were lyophilized and stored at -20°C until they were to be used. We obtained 3,359g of peel and 6,091g of pulp dried tucumã extract.

To perform the experimental assays, the extracts were first diluted in 40% ethanol in order to improve the extract's solubilization. This solution was then diluted in distilled water or a cellular medium culture to obtain $\leq 0.5\%$ ethanol concentration in all tucumã concentrations tested here. The ethanol was added in all control treatments to eliminate the potential influence of this molecule in the results obtained here.

1.3. Total phenolic content

The total phenolic content (TPC) was determined using Folin-Ciocalteu's method (Chandra & Mejia, 2004). Briefly, aliquots of 10 μ g lyophilized powdered tucumã peel and pulp extracts were, respectively, dissolved in 1ml deionized water. This solution (1.0ml) was mixed with 2ml of 20% sodium carbonate (Na₂CO₃) diluted in deionized water and 0.5 ml 1N Folin-Ciocalteu's phenol reagent. After incubation at room temperature for 10 minutes, the absorbance of the reaction mixture was measured at 730nm against a deionized water blank plus <0.5% ethanol on a spectrophotometer.

The total phenolic content of samples was calculated as a gallic acid equivalent from the calibration curve of gallic acid standard solutions (5, 10, 15, 20, 25 and 30 μ g/mL) of 0.2% aqueous gallic acid which followed the same method. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid was $y = 18.185x - 0.0266$ ($R^2 = 0.9783$). The results were expressed as mg gallic acid equivalent (mg GAE)/g dry plant extract material. The analytical experiments were performed in triplicate.

1.4 Determination of total flavonoid content

The determination of flavonoids was performed as described by Woisky and Salatino (1998). The absorbance was determined by spectrophotometer at 420nm. Ethanol was used as a blank. The equation obtained for the calibration curve of quercetin in the range of 0.012 - 0.200 mg/mL was $y = 0.0045x - 0.014$ ($r = 0.9997$). The content of flavonoids was established as quercetin mg/g dry extract. The experiments were conducted in triplicate.

1.5 Determination of total tannins content

The tannin content was performed using the method described by Morrison, Asiedu, Stuchbury and Powell (1995) with some modifications. Samples in concentrations of 0.25 mg/mL, 5mL of solution A (1g vanillin in 100mL of methanol) and solution B (8 mL HCl in 100 mL of methanol) were used in the experiment. The samples were read at 500nm in the spectrophotometer. The total tannin content was expressed in milligrams equivalents of catechin per gram of each fraction. The equation obtained for the calibration curve of catechin in the range of 0.001 - 0.025 mg/mL was $Y = 0.00015x + 0.005$ ($r = 0.9989$). The experiments were conducted in triplicate.

1.6 Determination of total alkaloid content

The alkaloid content was determined using the method described by Sreevidja and Mehrotra (2003), where Dragendorff's reagent precipitates alkaloids in plant materials. It is based on the formation of yellow bismuth complex in a nitric acid medium with thiourea lyophilized extracts of *Astrocaryum aculleatum* in concentrations of 20 mg/mL. A mixture of thiourea and nitric acid were used as a blank. The samples were read at 435nm in the

spectrophotometer. The equation obtained for the calibration curve of bismuth nitrate pentahydrate solution in the range of 0.01 - 0.09 mg/mL was $Y = 2.2783x + 0.0361$ ($r = 0.9997$). The experiments were conducted in triplicate.

1.7 Polyphenol characterization by HPLC-DAD-MS

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 μ m diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 minutes respectively, following the method described by Laghari, Ali Memon, Memon, Nelofar, Khan and Yasmin (2012) with slight modifications. The lyophilized extract of the peel and pulp of the tucumã were analyzed, dissolved in ethanol at a concentration of 3 mg/mL. The presence of six antioxidant compounds was investigated, namely, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, rutin and β -carotene. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.8 ml/min, injection volume 40 μ l and the wavelengths were 254nm for gallic acid, 325nm for caffeic and chlorogenic acids, 365nm for quercetin and rutin, and 450 nm for β -carotene. All samples and the mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore), then degassed by an ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standard references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 – 0.200 mg/ml for β -carotene, quercetin and rutin, and 0.050 – 0.250 mg/ml for gallic, caffeic and chlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing retention time with those of referenced standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). The following are calibration curves: for

gallic acid: $Y = 10523x + 1478.8$ ($r = 0.9999$); caffeic acid: $Y = 12765x + 1381.7$ ($r = 0.9995$); rutin: $Y = 12691 - 1165.0$ ($r = 0.9998$); quercetin: $Y = 13495x - 1092.6$ ($r = 0.9999$) and β -carotene: $Y = 13681x - 1518.7$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at an ambient temperature and in triplicate.

1.8 Antioxidant capacity: Radical-scavenging activity - DPPH assay

The antioxidant capacity of the tucumã pulp and peel extracts was evaluated by monitoring its ability to scavenge the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method previously described by Choi et al. (2002). Spectrophotometric analysis was used in order to determine the inhibition concentration of tucumã extracts. Additionally, the DPPH scavenging ability was calculated as IC_{50} (concentration which gives 50% inhibition). Eleven different ethanol dilutions of the extract 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 140; 200 and 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ were mixed with 1.0 mL of a 0.3 mM DPPH ethanol solution. The absorbance was measured at 518nm by the spectrophotometer against a blank after 30 minutes of reaction at room temperature in a dark place. The DPPH solution (1.0 mL, 0.3mM) plus ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and the rutin and ascorbic acid as natural antioxidant positive controls. Inhibition of free radicals by DPPH, by percentage (IP%) was calculated in the following way, according to the Equation 1: $IP\% = 100 - [(ABS_{\text{sample}} - ABS_{\text{blank}}) / ABS_{\text{control}}] \times 100$ where ABS_{sample} is the absorbance of the test compound, ABS_{blank} is the absorbance of the blank (containing 1.0mL of Ethanol plus 2.5mL of the plant extract solution) and ABS_{control} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the compound test). IP% was plotted against a sample concentration, and a linear regression curve was established in order to calculate the IC_{50} . Tests were carried out in triplicate.

1.9 Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP assay)

An adapted method of total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay was used to determine the capacity of tucumã extracts to trap a flow of water-soluble peroxy radical produced at a constant rate through thermal decomposition of 2,20-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Silva et al., 2007). The assay was performed in a 96-well plate. In brief, the reaction mixture containing 300µL of the free radical source (10mM AAPH) in 0.1 M glycine buffer (pH 8.6), 10µL of the test samples at different concentrations, and 10 µL of luminol (1mM) as the external probe to monitor radical production was incubated at 20°C. The chemiluminescence produced was directly proportional to the radical generation and counts per minute. The TRAP of tucumã extracts were evaluated for instantaneous inhibition of chemiluminescence as the area under curve (AUC). The total antioxidant reactivity (TAR) was calculated as the ratio of light intensity in the absence of samples (I0) = light intensity right after *A. aculeatum* addition (I) and expressed as a percentage of inhibition.

1.10 Cytotoxicity MTT and Trypan Blue assays

Plant extracts that have antioxidant activity can present in their composition unknown compounds or synergic molecule effects that cause cytotoxicity. Therefore, we performed two additional cytotoxicity assays to test the effect of tucumã extracts on cell viability: MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and a Trypan dye exclusion assays.

PBMCs were obtained from the blood of three healthy human donors from centrifugation with Ficoll-Histopaque to isolate the mononuclear cells. The PBMCs were immediately transferred to a 96-well microplate at 2.5×10^5 cells/well concentration. RPMI

1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin was the culture medium used in all cell treatment. The final volume to each well was 240 μ L. Extracts were sterilized by filtration (0.22 μ m nylon pore) before cell treatment to avoid pathogen contamination. The PBMCs were maintained in a suspension culture medium at 37°C in a 5% humidified CO₂ atmosphere for 24 hours; the PBMC viability was then assayed.

5 mg/ml MTT dissolved in phosphate buffered saline was added to each well and allowed to incubate for 4 hours. Further incubation with DMSO 200 μ L was added to each well to dissolve the formazan crystals. Absorbance values at 540nm were measured with a microplate reader. The MTT assay for cell viability was determined as an increase or decrease in cell numbers that resulted in a concomitant change in the amount of formazan formed indicating the degree of cytotoxicity caused by the test material (Suman & Jamil, 2006). Cell viability observed in each treatment was expressed as a percentage of the controlled absorbance value.

The Trypan blue exclusion method is used to identify the cells with loss of membrane integrity. Initially the cell density was determined using a counting Neubauer chamber. 0.4% Trypan blue in buffered isotonic salt solution, pH 7.2 to 7.3 (i.e., phosphate-buffered saline) was prepared. Trypan dye was added in 20 μ l aliquots of all treatments (1:1) and cells were immediately observed under a microscope at low magnification using a Neubauer chamber. The viability was determined using the following formula: cell viability = (number of viable cells / control viable cells) x 100. This formula expresses the viability as a percentage of the control value.

1.11 Statistical analysis

The chemical composition of tucumã peel and pulp extracts were presented as total concentration values as well as 100g of fresh tucumã peel and pulp fruit matter. This conversion was performed to permit a comparison of bioactive compound values with other fruits and vegetables. The total phenol contents, flavonoids, tannins and alkaloids of tucuman peel and pulp extracts were performed using t Student test ($p < 0.01$). Phenolic acids, flavonoides and β -carotene composition of tucuman extracts were performed using Tukey test ($p < 0.005$). Comparisons among DPPH and TRAP assays, as well as the cytotoxicity effect of tucumã peel and pulp extracts were performed using One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. $p < 0.05$ values were considered statistically significant. All analyses were performed using SPSS Software (18.0 Version).

2 Results and Discussion

Total phenol contents, flavonoids, tannins, alkaloids, β -carotene and five phenolics compounds present in the peel and pulp of the tucumã Amazonian fruit were quantified. Antioxidant activity, as well as the potential cytotoxic effect of the peel and tucumã on PBMCs, was also evaluated. The results are described below.

2.1 Total phenolic content, flavonoids, tannin and alkaloids of tucumã extracts

The TPC, flavonoid, tannin and alkaloid concentrations were determined in tucumã extracts (Table 1). The results showed higher concentrations of these bioactive compounds in the peel more than in pulp extracts.

The tucumã TPC values were higher than other common fruits such as apple, strawberry, pineapple, banana, peach, lemon, orange, pear, grapefruit, broccoli and tomato (Sun, Chu, Wu, & Liu, 2002; Lin & Tang, 2007). Our results also suggest that tucumã fruit presents the highest TPC content than other Amazonian native fruits as cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), bacuri (*Scheela phalerata*), graviola (*Annona muricata*), buriti (*Mauritia flexuosa*), tamarindo (*Tamarindus indica*), sweet passion fruit (*Passiflora alata*), granadilla (*Passiflora ligularis*), carambola (*Averrhoa carambola*), mana-cubiu (*Solanum sessiliflorum*), abiu (*Pouteria caimito*) and araçá-boi (*Psidium guineensis*) and lowest values than camucamu (*Myrciaria dubia*), cambuci (*Campomanesia phaea*) and uxi (*Endopleura uchi*) (Gonçalves, Lajolo, & Genovese, 2010). However, we must consider these comparisons with great moderation since there are variations in the techniques of extraction and analysis.

Table 1 here

Flavonoid and tannin contents were also determined in tucumã extracts (as seen in Table 1) with the highest value found in the peel extract. Taking the Marinova, Ribarova, and Atanassova (2005) study as our reference, the flavonoid concentration in tucumã peel was potentially higher than several common fruits like pears, apples and peaches; it also presents a similar concentration observed in black grapes. The tannin and alkaloid content found in tucumã peel and pulp extracts could be considered lower when compared to extracts of other fruits like red grapefruit and pomegranates. A lower tannin concentration infers some safe level in the tucumã consumption since an excess of tannins can cause lower proteic digestibility and gastric enzymatic inhibition (Lima, Paiva, Nogueira, Soares, Emrich & Silva, 2008).

2.2 *Flavonoids and Phenolic acids characterization*

The HPLC fingerprinting of tucumã lyophilized extracts revealed the presence of gallic acid (tR = 17.83 min; peak 1), chlorogenic acid (tR = 28.14 min; peak 2), caffeic acid (tR = 34.09 min; peak 3), rutin (tR = 41.53 min; peak 4) and quercetin (tR = 48.28 min; peak 5) (Figure 1). The percentage and mg/100g of fresh fruit values were also presented in Table 2.

Figure 1 here

Table 2 here

From five bioactive compounds analyzed here, four were described for the first time in tucumã extracts: rutin, gallic acid, caffeic acid and chlorogenic acid. Except for gallic acid that presented a higher concentration in tucumã pulp extract, all other molecules were more concentrated in the tucumã peel extract. In the status of a normal metabolism, the levels of oxidants and antioxidants in humans are maintained in balance, which is important for sustaining optimal physiological conditions. Among the bioactive compounds act on an oxidative metabolism, the phenolic compounds are the primary molecules with human health benefits.

In this study, we have also observed that rutin and quercetin presented high concentrations in both the peel and pulp extracts of tucumã. The quercetin concentration in the pulp of fresh fruit presented potentially higher values than those described by Gonçalves et al. (2010) that also identified quercetin in tucumã pulp (2.96mg/ 100g). Quercetin and rutin have been reported to exert numerous biochemical and pharmacological activities, such as free-radical scavenging, ultraviolet protection, effects on immune and inflammatory cell functions and anti-cancer effects (Choquenot, Couteau, Paparis, & Coiffard, 2008).

Tucumã pulp extract presented a higher gallic acid concentration than the peel extract. This compound and its structurally related compounds are found widely distributed in fruits, plants and teas, like green, black and mate teas (Chandra & Mejia., 2004). We estimated that ingestion of 100g of fresh tucumã corresponds to the gallic acid concentration ingested in approximately 130ml of red grape juice. This juice is considered one of the main gallic acid sources in the human diet. Investigations about gallic acid in vegetables have been performed since this compound presented anticarcinogenic activity in prostate, glioma and promyelocytic leukemia cells (Lu et al., 2010).

On the other hand, caffeic and chlorogenic acids were found in low concentrations of tucumã although the level of these compounds was higher in peel than pulp extracts. Both compounds presented beneficial effects on glycaemia, lipid and blood pressure control (Kim, Jeong, Kim, Lee, Kim, & Kim, 2011). Therefore, the tucumã fruit presents in its matrix a good source of bioactive compounds mainly related to anticarcinogenic activity.

2.3 β -carotene determination

This study confirms that tucumã fruit is a rich source of carotenoids. The percentage of β -carotene (tR = 57.64 min; peak 6) (Figure 1) and mg/100g of fresh fruit values were also presented in Table 2. We found higher β -carotene levels in the peel, the inedible part of the tucumã fruit, representing approximately 2.5 times more concentration than tucumã pulp. However, the β -carotene concentration found in tucumã pulp may be considered elevated. In functional terms, the β -carotene molecule is directly related to the production of Vitamin A. The dietary reference intake (DRI) values assume a 50% lower conversion of provitamin A carotenoids into active retinol by the body. For this reason, Vitamin A values are expressed as retinol activity equivalents (RAE).

The β -carotene concentration in the peel of fresh fruit was estimated to be 52.83mg/100g and in the pulp of fresh fruit 20.97mg/100g. From these values, we also calculated the Retinol Equivalents (REs) considering 1 RE = 6 μ g β -carotene and Retinol Activity Equivalents (RAEs) considering 1 RAE = 12 μ g of all-trans- β -carotene in a food matrix in both tucumã extracts. Fresh peel of the tucumã presented RE/100g = 8805.6 and RAE/100g = 4402.8, whereas fresh pulp of the tucumã presented RE/100g = 349.6 and RAE/100g = 174.8.

The results related to tucumã carotenoids described here are in concordance with the previous study performed by De Rosso et al. (2007). The all-trans- β -carotene was found to be the major carotenoid, representing 75% of the total carotenoid content in this fruit. Vitamin A concentrations found in the tucumã, described here and by De Rosso et al. (2007) can be considered an excellent source of provitamin A when compared with other tropical fruits such as acerola (De Rosso & Mercadante, 2005), papaya and banana (Wall, 2006).

Additionally, the β -carotene concentration may be considered high in tucumã extracts when compared with traditional vegetables rich in this compound. The β -carotene concentration in carrot juice (canned) is 9.3mg/100g, in a sweet potato (baked in its skin, without salt) is 11.5 mg/100g, and in spinach (frozen, chopped or leaf, cooked, boiled, drained, without salt) is 7.2 mg/100g (U.S. Department of Agriculture, 2011).

The relevance of high provitamin A concentration in tucumã fruit is related to several functions of this compound in the human body. Vitamin A plays a role in epithelial cell differentiation, immune function, growth, vision and reproduction (Tanumihardjo, 2011). Additionally, the β -carotene molecule was not related to Vitamin A conversion since investigations described that β - carotene has an antioxidant activity five times higher than Vitamin A and its consumption is associated with a decrease in chronic issues such as cardiovascular disease, hypertension and cataracts (Terao, Minami, & Bando, 2011).

2.4 Antioxidant capacity: DPPH assay and TRAP antioxidant assays

The tucumã peel and pulp extract scavenging activity against DPPH radicals was determined at 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 140, 240 µg/mL concentrations. For a positive control, we used rutin and ascorbic acid in the same concentrations of the extracts. We observed that both extracts presented a strong antioxidant capacity. At a concentration of 20µg/mL, the tucumã extracts inhibited > 80% of DPPH radicals. The 50% concentration to inhibit DPPH radicals (IC₅₀) was also calculated. The CI₅₀ of tucumã pulp extract was estimated at 11.24µg/ml; for tucumã peel extract, 8.98µg/ml; for rutin, 5.92µg/ml, and for ascorbic acid, 4.89µg/ml. The results obtained confirm previous reports of antioxidant activity of tucumã using the DPPH assay (Gonçalves et al., 2010). These values also suggest that tucumã extracts present ten times more antioxidant activity than green tea and two times more than aqueous extract of acerola (*Malpighia emarginata*) (Rotava et al., 2009).

We also analyzed the tucumã antioxidant activity from the TRAP assay. Initially this test was performed in five concentrations (1, 5, 10, 30 and 100µg/mL) similar to the concentrations tested in the DPPH assay. However, we found higher antioxidant activity (> 80% of inhibition) in all concentrations. For this reason, we extended the concentrations of the tucumã extracts to the lowest and highest concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 and 10000ng/mL).

As seen in Figure 2, 25 ng/mL of peel extract and 50 ng/mL of pulp extract started to inhibit the pro-oxidant pulse generated by the free radicalproducing system at the TRAP assay. At 500ng/mL (5µg/mL), the concentration of the inhibition levels was similar in both extracts (94.6 and 95.5%, respectively). The IC₅₀ to inhibit the prooxidant APH of the tucumã peel and pulp extracts was estimated in 102.38 ± 4.8 ng/mL e 224.57 ± 3.9 ng/mL, respectively.

Figure 2 here

2.5 Citotoxicity assays

The presence of several bioactive molecules is not a guarantee of safe consumption of fruits. Therefore, we performed an additional analysis to evaluate the potential cytotoxicity effects of tucumã extracts from *in vitro* human PBMCs viability analysis. The potential cytotoxicity effect of *A. aculeatum* was tested here using six concentrations of each extract (1, 3, 30, 10, 100 and 1000µg/mL) in MTT and Trypan assays, as can be seen in Table 3. The cell viability decreased in the 1000µg/mL concentration of tucumã extract in both assays tested. In the MTT assay, the 100µg/mL tucumã peel extracts decreased cell viability, whereas the tucumã pulp extracts decreased cell viability in only the highest concentration (1000µg/mL). Complementary investigations need to be performed to evaluate if the tucumã presents some cytotoxicity effect.

Table 3 here

The cytotoxic effect of higher concentrations of tucumã extracts can be related to some bioactive compound concentrations including β -carotene. Previous investigations showed that 4-5 μ M β -carotene decreases the antioxidant capacity of this compound and induces damage in genetic material triggering cellular apoptosis (Woods, Bilton & Young, 1999). These results suggest that further studies need to evaluate the potential genotoxic effect related to higher concentrations of tucumã extracts.

Finally, it is important to comment on some important methodological constraints related to this study. The central focus of this investigation is related to the analysis of tucumã peel and pulp extracts that were produced from a pooled fruit sample since this fruit is obtained by extractive production. Therefore, we could not estimate the potential variability of bioactive compounds in tucumã fruit. Additional studies to determine the influence of the tucumã origin on bioactive compound concentrations studied here need to be performed.

Another important question is related to the comparison of compound concentrations with other fruits broadly consumed in the world or present in tropical regions. In this manuscript, we tried to establish some comparison between bioactive compound concentrations observed in tucumã and the results from other fruits. We know that this comparison does not guarantee accurate or precise results; the best way to validate the data is the comparative analysis of bioactive compounds of several fruits. However, these comparisons can help us characterize the tucumã fruit and its biological antioxidant activity since most fruits cited in this study have important and proven effects on human physiology and health. Therefore, from these considerations, complementary investigations must be realized to confirm the results described here. This is important since even in fruits commercially produced, there are some variations in the quality and concentrations of polyphenols and other non-nutritional compounds, depending on the variety and environmental conditions of their cultivation. The methods of extraction and analysis also present an influence on the levels of these bioactive compounds. Additional studies need to be performed to estimate the average concentration of certain compounds in the tucumã fruit.

3 Conclusion

According to the data in this study, it is suggested that the ethanolic extracts of the tucumã fruit peel and the pulp present important bioactive compounds such as rutin, gallic acid, caffeic acid and chlorogenic acid in addition to the β -carotene and quercetin that have been previously described in literature. These compounds probably contribute to the highest antioxidant activity found in the tucumã extracts. However, additional investigations need to be performed to evaluate if these extracts present some clinical interest like antitumoral activity due the higher β -carotene concentrations and of other compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed with financial support (grants and fellowships) from Brazilian research agencies: FAPEAM, FAPERGS and CNPq. The authors would like to thank Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner for technical support.

REFERENCES

- Chandra, S., & Mejia, E.G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3583-3589.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., et al. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, *163*, 1161-1168.
- Choquet, B., Coureau, C., Papis, E., & Coiffard, L. J. M. (2008). Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *Journal of Natural Products*, *71*, 1117-1118.
- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2005). Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. *Food Research International*, *38*, 1073-1077.
- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 5062-5072.
- Gonçalves, A. E. S. S., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010). Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 4666-4674.
- Kim, J., Jeong, I. H., Kim, C.S., Lee, Y. M., Kim, J. M., & Kim, J. S. (2011). Chlorogenic acid inhibits the formation of advanced glycation end products and associated protein cross-linking. *Archives of Pharmacological Research*, *34*, 495-500.
- Laghari, A. H., Ali Memon, A., Memon, S., Nelofar, A., Khan, K. M., & Yasmin, A. (2012). Determination of free phenolic acids and antioxidant capacity of methanolic extracts obtained from leaves and flowers of camel thorn (*Alhagi maurorum*). *Natural Product Research*, *26*, 173-6.

- Lima, E.C., Paiva, R., Nogueira, R.C., Soares, F.P., Emrich, E.B., & Silva, Á.A.N. (2008). Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. *Ciência e Agrotecnologia*, *32*, 17-22.
- Lin, J. Y., & Tang, W. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, *101*, 140-147.
- Lu, J., Wu, D. M., Zheng, Y. L., Hu, B., Zhang, Z. F., Shan, Q., et al. (2010). Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol- induced neurotoxicity. *Journal of Pathology*, *222*, 199-212.
- Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, *40*, 255-260.
- Morrison, M., Asiedu, E. A., Stuchbury, T., & Powell, A. A. (1995). Determination of lignin and tannin contents of cowpea seeds coats. *Annals of Botany*, *76*, 287-290.
- Rotava, R., Zanella, I., Silva, L.P., Manfron, M.P., Ceron, C.S., Alves, S.H., et al. (2009). Antibacterial, antioxidant and tanning activity of grape by-product. *Ciência Rural*, *39*, 941-944.
- Shanley, P., Cymerys, M., Serra, M., & Medina, G. (2011). Fruit Trees and Useful Plants in Amazonian Life. Rome: FAO-CIFOR-PPI, <http://www.fao.org/docrep/015/i2360e/i2360e.pdf>
- Silva, E. G., Behr, G. A., Zanotto-Filho, A., Pasquali, M. A., Ravazolo, L. G., Bordignon, C. L., et al. (2007). Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *30*, 1488-1496.
- Sreevidja, N., & Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, *86*, 1124-1127.
- Suman, G., & Jamil, K. (2006). Application of human lymphocytes for evaluating toxicity of anti-cancer drugs. *International Journal of Pharmacology*, *4*, 374-381.
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 7449-7454.
- Tanumihardjo, S. A. (2011). Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *American Journal of Clinical Nutrition*, *94*, 658-665.
- Terao, J., Minami, Y., & Bando, N. (2011) Singlet molecular oxygen quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *48*, 57-62.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2011). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

Wall, M.M. (2006). Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa sp.*) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 434-445.

Woisky, R.G., & Salatino, A. (1998). Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37, 99-105.

Woods, J.A., Bilton, R.F., & Young, A.J. (1999). Beta-carotene enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 cells. *FEBS Lett.*, 449, 255-258.

Table 1

Contents of total phenol contents, flavonoids tannins and alkaloids of tucuman (*A.aculeatum*) peel and pulp extracts.

Lyophilized extracts	TPC \pm SE ¹	Flavonoids \pm SE ²	Tannins \pm SE ³	Alkaloids \pm SE ⁴
Peel	790.9 \pm 43.65 ^a	77.9 \pm 0.02 ^a	26.4 \pm 0.01 ^a	1.3 \pm 0.29 ^a
Pulp	663.9 \pm 92.40 ^b	40.6 \pm 0.06 ^b	6.4 \pm 0.05 ^b	0.7 \pm 0.05 ^b

¹TPC= total phenolic content expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) / 100 g peel or pulp fresh fruit; ²Flavonoids expressed as quercetin (mg/100 g peel or pulp fresh fruit); ³Tannins expressed as catechin (mg/ 100 g peel or pulp fresh fruit); ⁴Alkaloids expressed as bismuth nitrate pentahydrate solution (mg/ 100 g peel or pulp fresh fruit); * S.E. = standard error. Averages followed by different letters in each column differ by t Student test at p < 0.01.

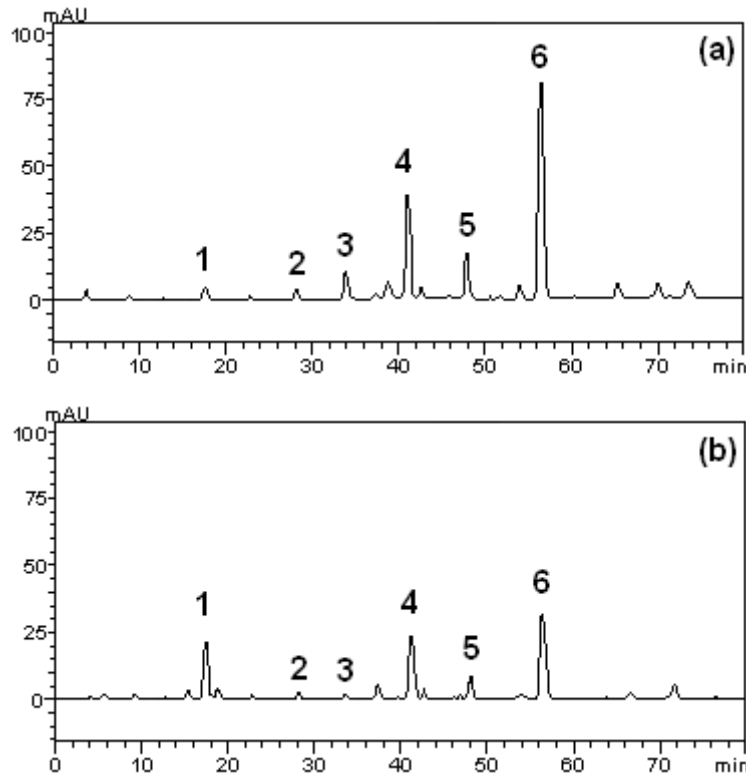


Figure 1 – Representative high performance liquid chromatography profile of *Astrocaryum vulgare*, lyophilized extract of bark (a) and lyophilized extract of pulp (b), detection UV was at 325nm. Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and β -carotene (peak 6). Chromatographic conditions are described in the Materials and Methods section.

Table 2

Phenolic acids, flavonoids and β -carotene composition of tucumã extracts (*A. aculeatum*).

Compounds	Peel extract (mg/100g)*	Pulp extract (mg/100g)*
β -carotene	52.8 \pm 0.05 ^a	21.0 \pm 0.10 ^b
Rutin	25.6 \pm 0.04 ^a	14.5 \pm 0.04 ^b
Quercetin	10.7 \pm 0.01 ^a	5.0 \pm 0.07 ^b
Gallic acid	3.2 \pm 0.01 ^a	10.8 \pm 0.03 ^b
Caffeic acid	7.0 \pm 0.11 ^a	0.7 \pm 0.01 ^b
Chlorogenic acid	2.6 \pm 0.03 ^a	0.9 \pm 0.02 ^b

* (mg/100g) = milligrams of compound to 100 grams of fresh fruit. Results are expressed as mean \pm standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.005$.

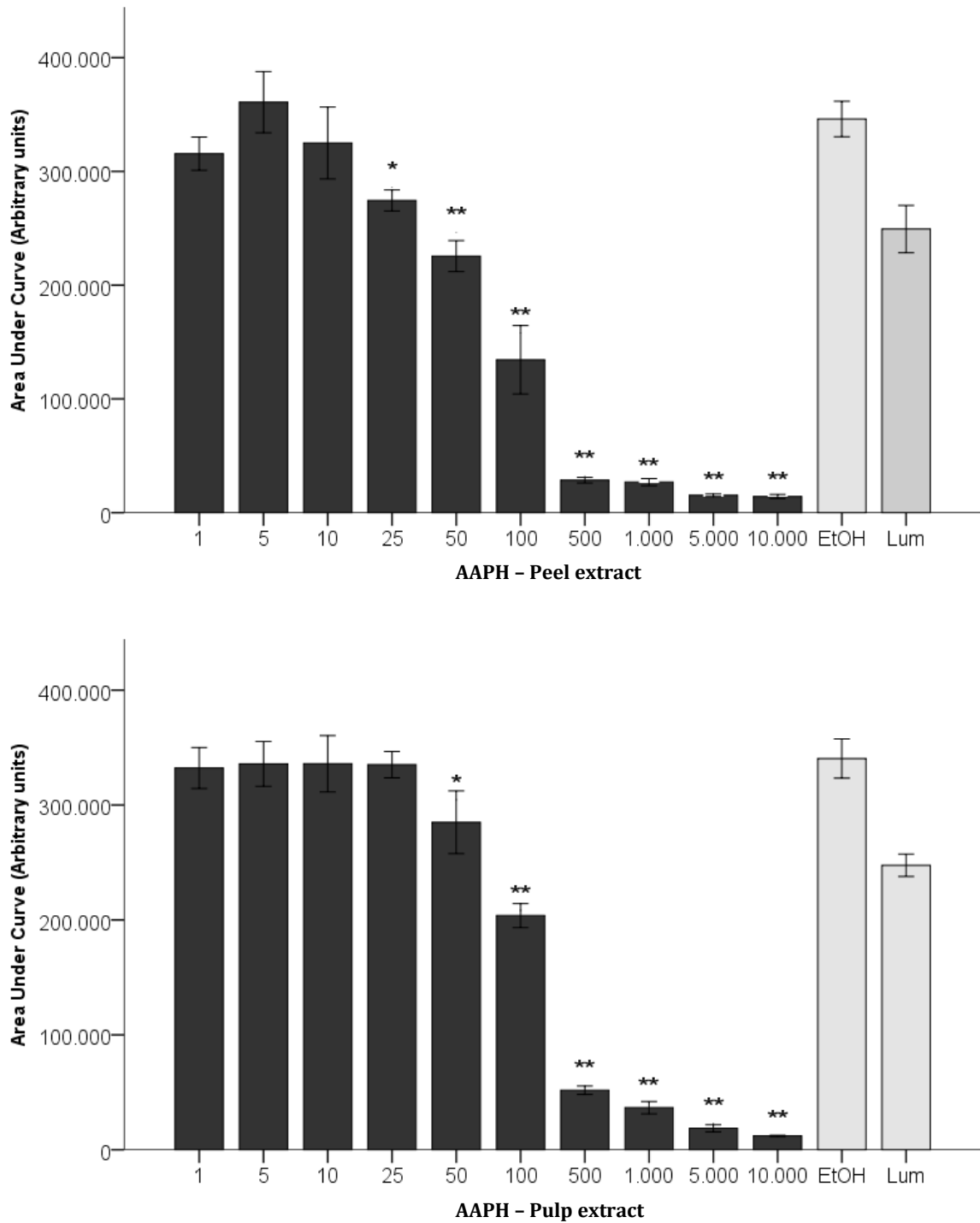


Figure 2 - Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) of tucuman extracts. Horizontal axis: tucuman pulp and peel extracts concentrations in nanograms/ml (ng/ml); EtOH = ethanol (vehicle). Lum = Luminol. * and ** represent significant differences using analysis of variance followed by Tukey test. p values ≤ 0.05 were considered significant.

Table 3

Effect of tucumã extracts (*A. aculeatum*) on peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) cytotoxicity

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	<u>MTT Assay Viability (%)</u> ¹		<u>Trypan Blue Assay Viability (%)</u> ¹	
	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Control	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
1	104.6 \pm 0.46 ^a	99.3 \pm 2.3 ^a	97.9 \pm 0.5 ^a	97.8 \pm 0.5 ^a
3	87.5 \pm 6.81 ^a	101.0 \pm 4.5 ^a	97.5 \pm 0.5 ^a	97.7 \pm 0.7 ^a
10	82.4 \pm 8.05 ^{ab}	84.9 \pm 4.0 ^{ab}	97.7 \pm 0.6 ^a	96.6 \pm 1.1 ^a
30	84.9 \pm 2.61 ^{ab}	89.2 \pm 1.7 ^{ab}	96.5 \pm 0.4 ^a	96.1 \pm 0.4 ^a
100	51.0 \pm 11.6 ^c	88.1 \pm 1.0 ^{ab}	95.4 \pm 0.5 ^a	94.6 \pm 1.0 ^a
1000	54.5 \pm 20.7 ^c	58.3 \pm 3.4 ^c	65.7 \pm 2.6 ^b	76.2 \pm 0.6 ^b

¹Viability (% in relation to control group that represents 100% of viability) evaluated by MTT assay; SE= standard error; Different letters in each treatment represent significant differences using analysis of variance followed by Tukey test. p values \leq 0.05 were considered significant.

11 DISCUSSÃO

A avaliação do conteúdo de polifenóis totais na polpa e na casca do tucumã demonstrou altos valores desses compostos. Comparando os resultados com o teor de polifenóis encontrado em algumas frutas e verduras popularmente conhecidas, pode-se dizer que o tucumã apresenta valores superiores à maçã, morango, abacaxi, banana, pêssego, limão, laranja, pêra, uva, pimentão vermelho, pimentão verde, melão, espinafre, tomate e brócolis (KAUR e KAPOOR, 2002; SUN et al., 2002; LIN e TANG, 2007). Além disso, o tucumã apresentou concentração de polifenóis quinze vezes superiores a da cenoura, seis vezes a da cebola e da laranja, e três vezes a encontrada na banana, considerada uma das principais fontes de polifenóis no Brasil (FALLER e FIALHO, 2009). Alguns vegetais como a cenoura negra (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.), encontrada na Ásia, o morango e a cebola vermelha demonstraram, em estudos desenvolvidos, valores semelhantes aos encontrados no tucumã, enquanto que a amora apresentou duas vezes maior concentração de polifenóis (KAUR e KAPOUR, 2002; LIN e TANG, 2007).

Os frutos amazônicos demonstram ser uma excelente fonte de polifenóis. Dentre os destaques, podem ser citados: açaí (*Euterpe oleracea*), bacuri (*Scheela phalerata*I) e buriti (*Mauritia flexuosa*), pertencentes à família *Arecaceae*, da qual o tucumã faz parte (CANUTO et al, 2010; TOSS, 2010). No estudo desenvolvido por Gonçalves et al. (2010), foram avaliadas as quantidades de polifenóis em 22 frutas brasileiras, sendo dez nativas da Amazônia, dentre as quais, o tucumã. Os resultados demonstraram que o tucumã é uma das principais fontes de polifenóis dentre os frutos mais consumidos na dieta amazônica, superando os resultados encontrados no cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), bacuri (*Scheela phalerata*I), graviola (*Annona muricata*), buriti (*Mauritia flexuosa*), tamarindo (*Tamarindus indica*), maracujá (*Passiflora alata*), maracujá doce (*Passiflora ligularis*), carambola (*Averrhoa carambola*), mana-cubiu (*Solanum sessiliflorum*s), abiu (*Pouteria caimito*) e araçá-boi (*Psidium guineensis*) e inferiores apenas ao camu-camu (*Myrciaria dubia*), cambuci (*Campomanesia phaea*) e uxi (*Endopleura uchi*). Os benefícios dos polifenóis já são amplamente conhecidos, caracterizando-se, principalmente, pela capacidade antioxidante única na prevenção ou redução do estresse oxidativo associado doenças crônicas ou a desordens do envelhecimento (QUIDEAU et al., 2011).

As concentrações de beta-caroteno encontradas no tucumã tornam o fruto uma excelente fonte de vitamina A. Um fato interessante é de que a casca do fruto apresenta 2,5 vezes mais beta-caroteno do que a polpa, a qual já demonstrou concentração elevada. Os valores de beta-caroteno na polpa de tucumã estão de acordo com estudos desenvolvidos por De Rosso e Mercadante (2007) que, inclusive, demonstraram que dentro das formas de beta-caroteno encontradas no tucumã, 93% corresponde ao beta-caroteno todo-trans, que possui atividade pró-vitáminica A de 100% (COSTA e ROSA, 2010). Pode-se dizer que a polpa e a casca do tucumã apresentam, respectivamente, duas e seis vezes mais beta-caroteno que o suco de cenoura, sendo que a ingestão de 11,36 g da polpa do fruto já forneceria as necessidades diárias de vitamina A para um indivíduo adulto, que é de 1000 µg de RE (equivalentes de retinol) (*U.S. Department of Agriculture*, 2011). Sabe-se que concentrações adequadas de beta-caroteno, além de potente ação antioxidante, auxiliam na prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, catarata, hipertensão e diminuem o foto-envelhecimento via radiação ultra-violeta A (LOWE et al., 1999; OSGANIAN et al., 2003; AMBRÓSIO et al., 2006; TALBOTT e HUGHES, 2008; DAY et al., 2009; HOZAWA et al., 2009; TERAQ et al., 2011).

Da mesma forma que polifenóis e carotenoides, as concentrações de flavonoides, taninos e alcaloides demonstraram valores superiores na casca do fruto quando comparados à polpa. O conteúdo de flavonoides encontrado na polpa é equivalente ao encontrado na maçã verde (sem casca) e uva branca. Já os valores da casca igualam-se aos encontrados na uva preta (MARINOVA et al., 2005). Atualmente, mais de 8000 estruturas são classificadas dentro do grupo dos flavonoides, que representam a principal classe de compostos bioativos (QUIDEAU et al., 2011). Esses compostos crescem em importância à medida que estudos comprovam as suas ações na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e neoplasias. O tratamento isolado com alguns flavonoides tem possibilitado a obtenção de resultados experimentais significativos. Além disso, alguns trabalhos demonstram que há um mecanismo de ação sinérgico quando na interação desses compostos entre si, ou com outras substâncias como vitaminas e fármacos sintéticos, o que acaba, geralmente, em efeitos potencializados. (PATHAK et al., 1991; ARAÚJO e CHAVES, 2005; RUSSO e SPERANZA SÁNCHEZ, 2006; ALINKEEL et al., 2008).

O conteúdo de taninos totais encontrados na casca e na polpa do tucumã é considerado baixo, quando comparado à casca da romã (20%), ao jambolão (16%), à casca do café (0,073%) e à casca da uva (0,941%) (FETROW e AVILA, 2000; ALBERTON et al., 2001;

MACEDO et al., 2005). Os taninos possuem a capacidade de ligação a proteínas, formando precipitados (complexo tanino-proteína), mecanismo através do qual a planta atua no controle de insetos, bactérias e fungos (PANSERA et al., 2003). Apresentam atividade antioxidante, antiinflamatória, cicatrizante e são responsáveis pela adstringência de alguns frutos, como no caso do tucumã (MONTEIRO et al., 2005). A importância desses compostos nos extratos vegetais é destacada em diversos trabalhos que demonstram sua excelente atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas bacterianas (AERTS et al., 1999; SCALBERT, 1991). No entanto, o excesso de taninos pode provocar danos à saúde, como baixa digestibilidade protéica, inibição enzimática e toxicidade hepática (MONTEIRO et al., 2005; LIMA et al., 2008). Assim, a moderada ou baixa concentração desses compostos, presentes em 30% das espécies vegetais superiores, é de grande interesse. Os resultados aqui apresentados confirmam que essas substâncias aparecem em maiores concentrações nas cascas e folhas de vegetais quando comparados à polpa dos frutos, uma vez que o tucumã apresentou quatro vezes mais taninos na casca em relação à polpa (PANSERA et al., 2003). O teor de alcaloides totais em ambos os extratos também foi baixo (1.3 ± 0.29 mg/100 g na casca e $0,7 \pm 0,05$ mg/100 g na polpa). A presença desses compostos no tucumã é de suma importância, uma vez que diversos alcaloides indólicos isolados de vegetais atuam como agonistas parciais em receptores alfa-adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos (OLIVEIRA et al., 2009).

Dos cinco compostos bioativos identificados no tucumã, quatro são descritos pela primeira vez como constituintes químicos do fruto (rutina, ácido gálico, ácido cafeico e ácido clorogênico). Esses compostos isolados apresentam, além de função antioxidante, atividade antineoplásica, cardioprotetora, antialérgica, hipolipidêmica e hipoglicêmica (VIRTUOSO et al., 2001; GARAMBONE e ROSA, 2007; JEONG et al., 2009; KAUR et al., 2009). A rutina foi o polifenol com maiores concentrações em ambos os extratos, seguida da quercetina na casca e do ácido gálico na polpa. Diversos estudos demonstram o potencial farmacológico desse composto, concentrando-se principalmente em sua atividade hipolipidêmica (VIRTUOSO et al., 2001). Ao contrário dos outros flavonoides, a rutina não apresenta efeitos pró-oxidantes. Além disso, ela promove um aumento na absorção de vitamina C, a qual está presente na polpa do tucumã (PATHAK et al., 1991; PEDRIALI, 2005; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010).

A presença de quercetina e ácido gálico conferem ao tucumã propriedades antineoplásicas. A quercetina tem demonstrado sua ação através da diminuição da

proliferação e viabilidade de células cancerosas prostáticas e de várias linhagens celulares do câncer de mama (ALINKEEL et al., 2008; JEONG et al., 2009). A concentração de quercetina encontrada na polpa foi superior à encontrada por Gonçalves et al. (2010) ($2,96 \pm 0,05$ mg/100 g). Com relação ao ácido gálico, alguns estudos demonstram sua forte ação antitumoral sem comprometer a integridade de células normais. Dentre as linhagens testadas e que apresentaram resultados significativos estão as do câncer de próstata, glioma humano e de leucemia promielocítica humana (INOUE et al., 1994; KAUR et al., 2009; LU et al., 2010b). O extrato da polpa de tucumã apresentou uma concentração significativa de ácido gálico (10,8 mg/100g) sendo o único composto isolado com teor superior à casca (cerca de três vezes). A ingestão de 100 g da polpa fresca do tucumã corresponde à quantidade de ácido gálico que é ingerida em aproximadamente 130 ml de suco de uva, considerada uma de suas principais fontes (SHAHRZAD e BITSCH, 1996). Ácido cafeico e ácido clorogênico apresentaram-se em baixas concentrações nos extratos, com predomínio na casca. São atribuídas a esses compostos: ação hipoglicemiante, hipolipidêmica e hipotensora (GARAMBONE e ROSA, 2007; CHAO et al., 2009).

Nos ensaios de atividade antioxidante realizados, o tucumã demonstrou resultados extremamente significantes tanto na polpa quanto na casca. Comparando os valores de IC_{50} encontrados para os extratos do tucumã (casca = $8,98 \mu\text{g/ml}$ e polpa = $11,24 \mu\text{g/ml}$) pelo método DPPH, pode-se afirmar que eles apresentam um potencial antioxidante duas vezes maior que o extrato aquoso de acerola, dez vezes maior que o extrato aquoso de caju, quatro vezes maior que extrato etanólico da casca de araticum (*Annona crassiflora*) e dez vezes maior que o chá verde (*Camelia sinensis*). O extrato da casca de tucumã apresentou valores semelhantes aos encontrados no extrato etanólico de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) ($IC_{50} = 9,44 \mu\text{g/ml}$) e no extrato de semente de uva desengordurada ($IC_{50} = 8,08 \mu\text{g/ml}$) (ROESLER et al., 2007; ROTAVA et al., 2009).

Comparando com os controles utilizados (ácido ascórbico e rutina), ambos os extratos apresentaram valores de IC_{50} inferiores, no entanto, o extrato da casca apresentou um valor próximo do encontrado na rutina ($IC_{50} = 8,08 \mu\text{g/ml}$). Há uma relação direta entre os valores de polifenóis encontrados e a atividade antioxidante descrita. É demonstrado que quercetina, rutina, ácidos gálico, cafeico e clorogênico são excelentes doadores de hidrogênio, o que justifica, em parte, os resultados encontrados na redução do radical livre orgânico DPPH. Com exceção do ácido gálico, esses compostos mostraram-se em maior concentração na casca do que na polpa, o que sugere ser um dos motivos da diferença de atividade antioxidante

encontrada entre ambas. Alguns frutos convencionais como tangerina, maçã e manga também demonstraram atividade antioxidante superior em suas cascas em relação às polpas, pelo mesmo método (FALLER e FIALHO, 2009). Os resultados de atividade antioxidante encontrados para a polpa de tucumã estão de acordo com os estudos previamente descritos por Gonçalves et al. (2010).

Já no método de TRAP, os resultados obtidos foram ainda mais expressivos. Em um primeiro momento, os extratos de tucumã haviam sido utilizados no teste em uma escala de $\mu\text{g/ml}$. No entanto, observou-se que a atividade antioxidante ultrapassou os 90% em 5 $\mu\text{g/ml}$ da casca. Isso forçou a utilização dos extratos em uma escala de ng/ml , o que demonstrou atividades antioxidantes significativas a partir das concentrações de 25 e 50 ng/ml , respectivamente para casca e polpa.

As principais justificativas para a expressividade de tais resultados estão fundamentadas no fato de que, além de altas concentrações de polifenóis, os extratos de tucumã também apresentaram altas concentrações de carotenoides. Embora se tenha conhecimento de que a principal função dos carotenoides é na redução do íon superóxido, alguns trabalhos têm demonstrado que eles apresentam uma grande capacidade de redução de radicais peroxilas (BARREIROS et al., 2006; DAMODARAN et al., 2008). O mecanismo pelo qual isso ocorre é a adição desses radicais a uma das duplas ligações 5-6, 5'-6' ou 15-15' da cadeia de um caroteno, o que provoca a formação de um composto altamente estabilizado que dá origem a dois éteres cíclicos mais o radical alcoxila. A reação ocorre a baixas pressões de oxigênio, sendo que um dos principais carotenoides com o qual se relaciona esse efeito é o beta-caroteno (CARDOSO, 1997; BARREIROS et al., 2006). Essas informações justificam, em parte, não só o potencial de captura de radicais peroxilas observados no teste TRAP, mas também, o maior potencial antioxidante da casca em relação à polpa, uma vez que apresentou maiores concentrações de beta-caroteno (2,5 vezes mais).

Por outro lado, foi observado nos extratos de tucumã um efeito citotóxico dose-dependente, através dos ensaios de MTT e exclusão por Azul de Tripán. Através da técnica de MTT, na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, o extrato da casca demonstrou uma diminuição significativa da viabilidade (51%), o que não foi observado para o extrato da polpa na mesma concentração (88%). Já na concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$, os dois extratos demonstraram citotoxicidade, uma vez que os valores de viabilidade diminuíram significativamente. Esses resultados também foram semelhantes nessa concentração pelo método de exclusão com Azul

de Tripan. Sabe-se que um antioxidante, na verdade, é um agente redox, podendo em concentrações elevadas, provocar desde um aumento na peroxidação lipídica até danos no DNA (DE LA LASTRA e VILLEGAS, 2007).

Macedo et al. (2008) demonstraram que concentrações elevadas do extrato aquoso de *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca) acaba promovendo quebras nas ligações fosfodiésteres do DNA. Relacionando esse efeito com a capacidade antioxidante dos extratos, pode-se afirmar que a concentração de 100 µg/ml supera em 8 e 10 vezes as IC₅₀ da casca e da polpa, e portanto, 4 a 5 vezes o limiar de atividade antioxidante máximo para radicais livres (pelo método DPPH). No entanto, a principal justificativa para tais efeitos pode ser devido à alta concentração de beta-caroteno presente nos extratos. Estudos demonstram que em concentrações superiores a 4-5 µM, o beta-caroteno pode diminuir sua capacidade antioxidante ou até mesmo induzir a danos no material genético (WOODS et al., 1999). As concentrações do composto no tratamento com 100 µg/ml do extrato da casca chegam a 12 µM de beta-caroteno.

12 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, podem ser feitas as seguintes conclusões:

- O tucumã é rico em polifenóis totais, flavonoides e beta-caroteno, podendo ser indicado no suprimento das necessidades diárias dessas substâncias;
- A casca do tucumã, até então nunca antes explorada, mostrou-se como componente importantíssimo do fruto, uma vez que apresentou resultados significativamente superiores à polpa para a grande maioria dos compostos bioativos identificados;
- A alta atividade antioxidante apresentada pelo tucumã acaba destacando o fruto dentre os demais que são consumidos na dieta amazônica;
- A relevância dos compostos bioativos isolados da polpa e da casca do tucumã conferem ao fruto um potencial terapêutico promissor, sobretudo, na prevenção/tratamento de neoplasias;

- Houve relação positiva entre a concentração de beta-caroteno e a captura de radicais peroxilas, confirmando a afinidade do composto por tais espécies reativas;
- Os extratos demonstraram citotoxicidade somente em altas concentrações testadas, o que pode estar relacionado a níveis elevados (tóxicos) de beta-caroteno e/ou à presença excessiva de compostos antioxidantes como polifenóis e carotenoides.

REFERÊNCIAS

- AERTS, T. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 75, p. 1-12, 1999.
- AKBAS, S. H.; TIMUR, M.; OZBEN, T. The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells. **Journal of Surgical Research**, v. 125, p. 49-55, 2005.
- ALBERTON, J. R., RIBEIRO, A., SACRAMENTO, L. V. S., FRANCO, S. L., LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 37-50, 2001.
- ALINKEEL, R.; BINDUKUMAR, B.; REYNOLDS, J. L.; SIKES, D. E.; MAHAJAN, S. E.; CHADHA, K. C.; SCHWARTZ, S. A. The Dietary Bioflavonoid, Quercetin, Selectively Induces Apoptosis of Prostate Cancer Cells by Down-Regulating the Expression of Heat Shock Protein 90. **National Institute of Health Prostate**, v. 68, p. 1773–1789, 2008.
- ALMEIDA, J. S.; LIMA, F.; DA ROS, S.; BULHÕES, L. O. S.; CARVALHO, L. M.; BECK, R. C. R. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603–1610, 2010.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 19, p.233-243, 2006.
- APOLINÁRIO, A. C.; MONTEIRO, M. M. O.; PACHÚ, C. O.; DANTAS, I. C. *Allium sativum* L. como agente terapêutico para diversas patologias: uma revisão. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 2, p. 1-6, 2008.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; Flavonoids in vegetable food commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124–1131, 2004.
- ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 28, p. 996-999, 2005.

ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, p. 25-31, 2008.

ASSELIN, E.; SEXTON, É.; VAN THEMSCHE, C.; LEBLANC, K.; PARENT, S.; LEMOINE, P. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. **Molecular Cancer**, p. 5-45, 2006.

ATTELE, A. S.; ZHOU, Y-P.; XIE, J-T.; WU, J. A.; ZHANG, L.; DEY, L.; PUGH, W.; RUE, P. A.; POLONSKY, K. S.; YUAN, C-S. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. **Diabetes**, v. 51, p. 1851-1858, 2002.

BALL, G. F. M. **Bioavailability and analysis of vitamins and foods**. London: Chapman e Hall, 1998.

BARBOSA, B. S.; KOOLEN, H. H. F.; Barreto, A. C.; Silva, J. D.; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M. Aproveitamento do Óleo das Amêndoas de Tucumã do Amazonas na Produção de Biodiesel. **Acta Amazonica**, v. 39, p.371 – 376, 2009.

BARREIRO, E. J.; Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química nova**, v. 13, p. 29-39, 1990.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.113-123, 2006.

BASTOS, L. M. **Ação *in vitro* da Neuwidase sobre a infecção por *T. gondii* em fibroblastos humanos e na produção de mediadores inflamatórios por células mononucleares do sangue periférico**. Uberlândia: UFU, 2008. Dissertação (Pós-graduação em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

BAUERNFEIND, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 456-473, 1972.

BEATTY, S.; KOH, H.; PHIL, M.; HENSON, D.; BOULTON, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey Ophthalmology**, v. 45, p.115–134, 2000.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, p. 21 - 25, 2009.

BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 285-292, 2004.

BERNARDES, N. R.; PESSANHA, F. F.; OLIVEIRA, D. B. Alimentos Funcionais: uma breve revisão. **Ciência e Cultura**, v. 6, p.11-19, 2010.

BHOSALE, P.; SERBAN, B.; BERNSTEIN, P. S. Retinal Carotenoids Can Attenuate Formation of A2E in the Retinal Pigment Epithelium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, p. 175–181, 2009.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOLIGON, A. A.; MAGOGA, B. R.; FELTRIN, A. C.; JANOVIK, V.; ATHAYDE, M. L. Potencial antioxidante *in vitro*, conteúdo de fenóis e flavonoides nos ramos de *Scutia buxifolia* Reissek. **Saúde**, v. 35, p. 34-38, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Presidência da República. Decreto no. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **DOU**. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids: isolation and analysis.**, v. 1-A. Berlin: Birkhauser Verlag, 1995.

BUSH, R. K.; TAYLOR, S. L. **Adverse reactions to food and drug additives, in allergy: principles and practice.** St. Louis: Mosby, 1998.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1196-1205, 2010.

CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenoides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**, v. 20, p. 535-540, 1997.

CASTRO, C. M. M. B.; AGUIAR, J. L. A.; MELO, F. A. D.; FERREIRA e SILVA, W. T.; MARQUES, E.; DA SILVA, D. B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, p. 119-123, 2004.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5 ed. Belém: Edições CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991.

CÉSAR, T. B.; RODRIGUES, L. U.; ARAÚJO, M. S. P.; APTEKMANN, N. P. Suco de laranja reduz o colesterol em indivíduos normolipidêmicos. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 23, p. 779-789, 2010.

CHAO, P. C.; HSU, C. C.; YIN, M. C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, s.v., p. 6-33, 2009.

CHENG, Q. Recent Patents on Carotenoid Production in Microbes. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, p. 202-211, 2007.

CHOO, J. J. Green tea reduces body fat accretion caused by high-fat diet in rats through beta-adrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 671-676, 2003.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro, RJ: Rubio, 2010.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Matéria**, v. 12, p.134-139, 2007.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

DAY, R. M.; MATUS, I. A.; SUZUKI, Y. J.; YEUM, K. J.; QIN, J.; PARK, A. M.; JAIN, V.; KURU, T.; TANG, G. Plasma levels of retinoids, carotenoids and tocopherols in patients with mild obstructive sleep apnoea. **Respirology**, v. 14, p. 1134-1142, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40, 2004.

DE GROOTE, D.; ZANGERLE, P. F.; GEVAERT, Y.; FASSOTTE, M. F.; BEGUIN, Y.; NOIZAT-PIRENNE, F.; PIRENNE, J.; GATHY, R.; LOPEZ, M.; DEHART, I.; IGOT, D.; BAUDRIHAYE, M.; DELACROIX, D.; FRANCHIMONT, P. Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. **Cytokine**, v. 4, p. 239-248, 1992.

DE LA LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanism and clinical implications. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1156-1161, 2007.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, p. 586-592, 2004.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.5062-5072, 2007.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1222–1229, 2006.

DEVASAGAYAM, T. P.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **Journal of The Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794–804, 2004.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 11-14, 2004.

DORJGOCHOO, T.; GAO, Y. T.; CHOW, W. H.; SHU, X. O.; LI, H.; YANG, G.; CAI, Q.; ROTHMAN, N.; CAI, H.; FRANKE, A. A.; ZHENG, W.; DAI, Q. Plasma carotenoids, tocopherols, retinol and breast cancer risk: results from the Shanghai Women Health Study (SWHS). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 117, p.381–389, 2009.

DOUGLAS, C. R. **Fisiologia aplicada à nutrição**. 2. ed. São Paulo, SP : Robe, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DUTRA, M. G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. Anápolis: CUA, 2009. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio-ambiente), Centro Universitário de Anápolis, 2009.

ERDMAN, J. W. Effect of preparation and service of food on nutrient value. **Food Technology**, v. 33, n. 2, p. 38-48, 1979.

FAINTUCH, J.; SCHMIDT, V. D.; HORIE, L. M.; BARBEIRO, H. V.; BARBEIRO, D. F.; SORIANO, F. G.; CECCONELLO, I. Propriedades antinflamatórias da farinha de linhaça em pacientes obesos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, p. 273-277, 2006.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Frutas, hortaliças e disponibilidade de polifenóis no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 211-218, 2009.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional da saúde**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2000.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

FINLEY, J. W.; DAVIS, C. D.; FENG, Y. Selenium from high Selenium broccoli protects rats from colon cancer. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2384-2389, 2000.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, MARQUES, M. P. M. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 6, p.747-766, 2006.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 229-235, 2007.

GATES, M.; TSCHUDI, G.; The synthesis of morphine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 1109-1110, 1952.

GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S.A.N. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). **Acta Amazônica**, v. 35, p. 337-342, 2005

GHODASARA, J.; PAWAR, A.; DESHMUKH, C.; KUCHEKAR, B. Inhibitory effect of rutin and curcumin on experimentally-induced calcium oxalate urolithiasis in rats **Pharmacognosy Research**, v. 2, p. 388–392, 2010.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. São Paulo: USP, 2008. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 2008.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010.

GOODWIN, T. W. Chemistry and biochemistry of plant pigments. **Academic Press**, 1965.

HARBORNE, J. B. Phenolics In: MANN, J., DAVIDSON, R. S., HOBBS, J. B., BANTHORPE, D. V. **Natural Products. Their chemistry and biological significance**. New York: Longman scientific & Technical, p. 361-388, 1994.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 394–396, 2009.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2379-2883, 1992.

HOZAWA, A.; JACOBS JUNIOR, D. R.; STEFFES, M. W.; GROSS, M. D.; STEFFEN, L. M.; LEE, D. H.; Circulating Carotenoid Concentrations and Incident Hypertension: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. **Journal of Hypertension**, v. 27, p. 237–242, 2009.

HU, W.; HUANG, C.; WANG, M-H. Chemical composition, nutritional value, and antioxidant constituents of *Kalopanax pictus* leaves. **Food Chemistry**, v. 131, p. 449–455, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 497-507, 2002.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; KOIDE, T.; SAKAPUCHI, N.; OGIHARA, Y.; YABU, Y. Antioxidants, gallic acid, induces apoptosis in HL-60 RG cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, p. 898–904, 1994.

IRAZ, M.; FADILLIOGLU, E.; TASDEMIR, S.; ERDOGAN, S. Role of vagal activity on bradycardic and hypotensive effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE). **Cardiovascular Toxicology**, v. 5, p. 391-396, 2005.

ISAI, M.; SAKTHIVEL, M.; RAMESH, E.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. Prevention of selenite-induced cataractogenesis by rutin in Wistar rats. **Molecular Vision**, v. 15, p. 2570–2577, 2009.

JENAB, M.; RIBOLI, E.; FERRARI, P.; FRIESEN, M.; SABATE, J.; NORAT, T.; SLIMANI, N.; TJÖNNELAND, A.; OLSEN, A.; OVERVAD, K.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; CLAVEL-CHAPELON, F.; BOEING, H.; SCHULZ, M.; LINSEISEN, J.; NAGEL, G.; TRICHOPOULOU, A.; NASKA, A.; OIKONOMOU, E.; BERRINO, F.; PANICO, S.; PALLI, D.; SACERDOTE, C.; TUMINO, R.; PEETERS, P. H.; NUMANS, M. E.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; BÜCHNER, F. L.; LUND, E.; PERA, G.; CHIRLAQUE, M. D.; SÁNCHEZ, M. J.; ARRIOLA, L.; BARRICARTE, A.; QUIRÓ, J. R.; JOHANSSON, I.; JOHANSSON, A.; BERGLUND, G.; BINGHAM, S.; KHAW, K.T.; ALLEN, N.; KEY, T.; CARNEIRO, T.; SAVE, V.; DEL GIUDICE, G.; PLEBANI, M.; KAAKS, R.; GONZALEZ, C.A. Plasma and dietary carotenoid, retinol and tocopherol levels and the risk of gastric adenocarcinomas in the European prospective investigation into cancer and nutrition. **British Journal of Cancer**, v. 95, p.406 – 415, 2006.

JEONG, C-H.; JEONG, H. R.; CHOI, G. N.; KIM, D-O.; LEE, U.; HEO, H. J. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chinese Medicine**, s.v., p. 6:25, 2011.

JEONG, J. H.; AN, J. Y.; KWON, Y. T.; RHEE, J. G.; LEE, Y. J. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. **Celular Biochemistry**, v. 106, p. 73–82, 2009.

JIANG, M. C.; YANG-YEN, H. F.; YEN, J. J.; LIN, J. K. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. **Nutrition and Cancer**, v. 26, p.111–120, 1996.

KANG, N. J.; LEE, K. W.; SHIN, B. J.; JUNG, S. K.; HWANG, M. K.; BODE, A. M.; HEO, Y. S.; LEE, H. J. DONG, Z. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 321–330, 2009.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 153-161, 2002.

KAUR, M.; VELMURUGAN, B.; RAJAMANICKAM, S.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Gallic acid, na active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorogenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. **Pharmacology Research**, v. 26, 2133-2140, 2009.

KIM, J.; JEONG, I. H.; KIM, C. S.; LEE, Y. M.; KIM, J. M.; KIM, J. S. Chlorogenic acid inhibits the formation of advanced glycation end products and associated protein cross-linking. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, p. 495-500, 2011.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, p.1283-1287, 2006.

KELLY, G. S. Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v. 16, p. 172-194, 2011.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 241-248, 2009.

KOAY, D. C.; ZERILLO, C.; NARAYAN, M.; HARRIS, L. N.; DIGIOVANNA, M. P. Anti-tumor effects of retinoids combined with trastuzumab or tamoxifen in breast cancer cells: induction of apoptosis by retinoid/trastuzumab combinations. **Breast Cancer Research**, v. 12, p. 1-19, 2010.

KOEBERNIK, J. Germination of palm seed. **Principes**, v. 15, p. 134-137, 1971.

KREWER, C. C.; RIBEIRO, E. E.; RIBEIRO, E. A. M.; MORESCO, R. N.; ROCHA, M. I. U. M.; MONTAGNER, G. F. F. S.; MACHADO, M. M. M.; VIEGAS, K.; BRITO, E.; CRUZ, I. B. M. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1367-1374, 2011.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, p. 617-635, 1989.

KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J. J.; QUARLES VAN UFFORD, H. C.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Anti-Inflammatory Activity of Gallic Acid. **Planta Medica**, v. 58, p. 499-504, 1992.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, p. 99-107, 2001.

LAURETANI, F. M. D.; SEMBA, R. D.; DAYHOFF-BRANNIGAN, M.; CORSI, A. M.; DI IORIO, A.; BUIATTI, E.; BANDINELLI, S.; GURALNIK, J. M.; FERRUCCI, L. Low total plasma carotenoids are independent predictors of mortality among older persons: The InCHIANTI study. **European Journal of Nutrition**, v.47, p. 335-340, 2008.

LIMA, A. J. B.; CORRÊA, A. D.; ALVES, A. P. C.; ABREU, C. M. P.; DANTAS-BARROS, A. M. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, p. 416-421, 2008.

LIN, J. Y.; TANG, W.Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 140-147, 2007.

LINDENSCHMIDT, R. C.; TRIKA, A. F.; GUARD, M. E.; WITSCHI, H. P. The effect of butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. **Toxicology**, v. 38, p. 151-160, 1986.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radic Res Commun**, v. 17, p. 299-311, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LOWE, G. M.; BOOTH, L. A.; YOUNG, A. J.; BILTON, R. F. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. **Free Radicals Research**, v. 30, p. 141-151, 1999.

LU, J.; WU, D. M.; ZHENG, Y. L.; HU, B.; ZHANG, Z. F.; SHAN, Q.; ZHENG, Z. H.; LIU, C. M.; WANG, Y. J. Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol- induced neurotoxicity. **Journal of Pathology**, v. 222, p. 199-212, 2010a.

LU, Y.; JIANG, F.; JIANG, H.; WU, K.; ZHENG, X.; CAI, Y.; KATAKOWSKI, M.; CHOPP, M.; TO, S-S. T. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, p. 102-107, 2010b.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 833-838, 2005.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, p. 255-260, 2005.

MASTERS, J. R. W. **Animal Cell Culture**. New York: Oxford University Press, 2000.

MATHEUS, M. E.; MANTOVANI, I. S. B.; SANTOS, G. B.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S.; FERNANDES, P. D. Ação de extratos do açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 03-05, 2003.

MAURÍCIO, A. Q. **Estudo da atividade antioxidante do ácido cafeico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético**. Brasília: UFB, 2006. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química), Universidade de Brasília, 2006.

MAURYA, D. K.; NANDAKUMAR, N.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, p. 85–90, 2011.

MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. A. **A cafeína do café**. Campinas: IAC, 1991.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, p. 1-11, 2002.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NUNES, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 193-201, 2008.

MENDONÇA, M. S. **Aspectos morfológicos das sementes de algumas espécies de palmeiras (Arecaceae - Palmae) da Amazônia**. Manaus: UFAM, 1996. Tese (curso de Professor Titular), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1996.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOSMAN, T. I. M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, S.; DATE, A.; PATRAVALE, V.; KORTING, H. C.; ROEDER, A. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. **Clinical Interventions in Aging**, v. 1, p. 327–348, 2006.

NASSER, A. L. M.; DOURADO, G. K.; MANJATE, D. A.; CARLOS, I. Z.; CESAR, T. B. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, p. 275-279, 2011.

NEVES, J. M.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; GOMES, L. R. Atividade antioxidante e avaliação *in vitro* da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de *Mentha x piperita*. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, p. 344-354, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-37, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NUNES, J. M. **Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de extratos de *Hipericum polyanthemum* Klotzsh ex Reichardt aclimatizado**. Porto Alegre: UFRGS, 2010. Trabalho

de conclusão de curso (Faculdade de Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

OBRENOVICH, M. E.; LI, Y.; PARVATHANENI, K.; YENDLURI, B. B.; PALACIOS, H. H.; LESZEK, J.; ALIEV, G. Antioxidants in health, disease and aging. **CNS and Neurological Disorders Drug Targets**, v. 10, p. 192–207, 2011.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, 2009.

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, p. 1971-1974, 2009.

OSGANIAN, S. K.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E.; SPIEGELMAN, D.; MANSON, J. E.; WILLETT, W. C. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1390-1399, 2003.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 17-22, 2003.

PARKY, D. C. **Great moments in pharmacy**. Detroit: Northwood Institute Press, 1966.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. **Fitoterapia**, v. 62, p. 371-389, 1991.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. São Paulo: USP, 2005. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, 2005.

PELUZIO, M. C. G.; TEIXEIRA, T. F. S.; OLIVEIRA, V. P.; SABARENSE, C. M.; DIAS, C. M. G. C.; ABRANCHES, M. V.; MALDONADO, I. R. S. C. Efeito do extrato de uva e α -Tocoferol em camundongos Apo E $-/-$, modelo de doença cardiovascular. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, p. 253-260, 2011.

PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP : Manole, 2003.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Journal Brazilian of Society Food and Nutrition**, v. 34, p. 231-247, 2009.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PRAKASH, D.; SURI, S.; UPADHYAY, G.; SINGH, B. N. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 58, p. 18-28, 2007.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586-621, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 65-70, 2005.

ROCK; C. L.; KUSLUSKI, R. A.; GALVEZ, M. M.; ETHIER, S. P. Carotenoids induce morphological changes in human mammary epithelial cell cultures. **Nutrition and Cancer**, v.23, p. 319 – 333, 1995.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 53-60, 2007.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 16, p. 315-320, 2003.

RONCADA, M. J.; WILSON, D.; OKANI, E. T.; AMINO, S. Prevalência de hipovitaminose A em pré-escolares de municípios da área metropolitana de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde pública**, v. 18, p. 218-224, 1984.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19–34, 2002.

ROSSO, R. **Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido gálico**. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; DA SILVA, L. P.; MANFRON, M. P.; CERON, C. S.; ALVES, S. H.; KARKOW, A. K.; DOS SANTOS, J. P. A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Ciência Rural**, v.39, p. 941-944, 2009.

ROZEMA, J.; BJÖRN, L. O.; BORNMANN, J. F.; GABERSCIK, A.; HÄDER, D. P.; TROST, T. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis of the evolution of UV-B absorbing compounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 66, p. 2-12, 2002.

RUSSO, R. O.; SPERANZA SÁNCHEZ, M. Los flavonoides en la terapia cardiovascular. **Rev. Costarricense Cardiología**, v. 8, p. 13-18, 2006.

SÁ, S. T. V. **Superação da dormência das sementes de tucumã (*Astrocaryum tucuma* Mart.)**. Manaus: UFAM, 1984. Monografia (Graduação em Agronomia), Universidade Federal do Amazonas, 1984.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some Pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 741, p. 223-231, 1996.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: CIFOR, 2005.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanau (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-462, 2006.

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

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenoides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.254-258, 2002.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, A. G. C.; SOUSA, N. R.; SILVA, S. E. L.; NUNES, C. D. M.; COUTO, A. C.; CRUZ, L. A. A. **Fruteiras da Amazônia**. Brasília: Embrapa, 1996.

SUZUKI, Y.; ISHIHARA, M.; SEGAMI, T.; ITO, M. Anti-ulcer effects of antioxidants, quercetin, alpha-tocopherol, nifedipine and tetracycline in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 78, p. 435-441, 1998.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

TAMIMI, R. M.; COLDITZ, G. A.; HANKINSON, S. E. Circulating carotenoids, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer. **Cancer Research**, v. 69, p. 9323, 2009.

TALBOTT, S. M.; HUGHES, K. **Suplementos dietéticos: para profissionais de saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

TERAO, J.; MINAMI, Y.; BANDO, N. Singlet molecular oxygen_ quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging. **Journal of Clinical Biochemistry Nutrition**, v. 48, p. 57-62, 2011.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, p. 7-13, 2003.

TORBERGSEN, A. C.; COLLINS, A. R. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage: the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. **European Journal of Nutrition**, v. 39, p. 80-85, 2000.

TOSS, D. **Extração de compostos fenólicos de *Butia capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico**. Porto Alegre: UFRGS, 2010. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24**. Nutrient Data Laboratory Home Page, 2011. <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

VENDEMIALE, G.; GRATAGLIANO, I.; ALTOMARE, E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 29, p. 49-55, 1999.

VIALARD, J. F.; PELLEGRIN, J. L.; RANCHIN, V.; SCHAEVERBEKE, T.; DEHAIS, J.; LONGY-BOURSIER, M.; RAGNAUD, J. M.; LENG, B.; MOREAU, J. F. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN- γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 115, p. 189-195, 1999.

VIRTUOSO, L. S.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; TINOCO, A. L. A. Efeitos da rutina, colestiramina e betalaína no controle de lipídeos em soro de coelhos hiperlipidêmicos **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, p. 85-89, 2001.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2000.

WANG, L.; GAZIANO, J. M.; NORKUS, E. P.; BURING, J. E.; SESSO, H. D. Associations of plasma carotenoids with risk factors and biomarkers related to cardiovascular disease in middle-aged and older women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 747-754, 2008.

WILLIS, M. S.; WIANS, F. H. J. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. **Clinica Chimica Acta.**, v. 330, p. 57-83, 2003.

WISNIAK, J. Carl Wilhelm Scheele. **Revista CENIC Ciências Químicas**, v. 40, p. 165-173, 2009.

WOODS, J. A.; BILTON, R. F.; YOUNG, A. J. Beta-carotene enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 cells. **FEBS Letters**, v. 449, p. 255-258, 1999.

XAVIER, H. T.; ABDALLA, D. S. P.; MARTINEZ, T. L. R.; RAMIRES, J. A. F.; GAGLIARDI, A. R. T. Efeitos da Lipoproteína LDL-oxidada Sobre a Proliferação e a Motilidade Espontânea *in Vitro* de Células Endoteliais de Artérias Coronárias Humanas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 6, p. 488-492, 2004.

YAMAMOTO, Y.; OUE, E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.70, p. 933-939, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazonica**, v. 32, p. 169-174, 2002.