

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ISRAEL LUNA ALVES

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ÓLEO DO FRUTO DA SUCUPIRA
(Pterodon pubescens)

Porto Alegre

2023

ISRAEL LUNA ALVES

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ÓLEO DO FRUTO DA SUCUPIRA
(Pterodon pubescens)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dr.^a Giovana Domeneghini Mercali

Coorientadora: Dr.^a Simone Hickmann Flôres

Coorientadora: Dr.^a Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Alves, Israel Luna
Extração assistida por ultrassom de óleo do fruto
da sucupira (*Pterodon pubescens*) / Israel Luna Alves.
-- 2023.
154 f.
Orientadoras: Giovana Domeneghini Mercali, Simone
Hickmann Flôres.

Coorientadora: Ligia Damasceno Ferreira Marczak.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Extração assistida por ultrassom. 2. Teor de
lipídeos. 3. Atividade antioxidante. 4. Terpenoides.
5. Flavonoides. I. Mercali, Giovana Domeneghini,
orient. II. Flôres, Simone Hickmann, orient. III.
Marczak, Ligia Damasceno Ferreira, coorient. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autor: Israel Luna Alves (Engenheiro de Alimentos/Universidade Federal da Paraíba)

Título da Dissertação: Extração assistida por ultrassom de óleo do fruto da sucupira (*Pterodon pubescens*)

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aprovada em: __/__/____

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Débora Pez Jaeschke
Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. Carlos Henrique Pagno
Faculdade de Sogipa

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Maria, por sempre terem priorizado minha educação, por apoiarem minhas decisões e pela paciência diante das consequências delas. Grato pelo amor e cuidado.

À minha orientadora, Prof^a Giovana Domeneghini Mercali, e às minhas coorientadoras, Prof^a Simone Hickmann Flôres e Ligia Damasceno Ferreira Marczak por todo ensinamento, pelo tempo dedicado, pelas palavras de motivação, pela paciência e pelo estímulo a busca dos melhores *outcomes* não fugindo da realidade.

À CAPES pelo auxílio financeiro de 1 ano que consegui obter na minha chegada a Porto Alegre.

Ao LATEPA como um todo que foi minha segunda casa pela maior parte do meu mestrado. À Naira pela ajuda nas primeiras análises executadas e pela orientação no uso dos equipamentos e funcionamento do laboratório. À Iasmim e à Roberta, colegas em períodos distintos, pela ajuda em atividades diversas do laboratório e pelas conversas agradáveis. À Eloah, bolsita de iniciação científica, pelo auxílio nos experimentos realizados.

À Prof^a Patrícia Malheiros por me receber em seu laboratório e tê-lo disponibilizado, assim como suas alunas, a Fabíola e a Thaís, que me orientaram no decorrer das análises pertinentes a atividade antimicrobiana. Fui bem recebido por todos, tanto do 203 como do 205, ao longo de todo o período que utilizei as dependências dos laboratórios.

A equipe técnica do ICTA, em especial, o Rodrigo, a Ana e a Andressa pelo auxílio no decorrer de diversas análises, em especial no processo de esterificação e nas tentativas de identificação dos compostos. Grato também pelas conversas interessantes e pela simpatia.

Aos integrantes do laboratório 211 que me atenderam nos diversos momentos que precisei usar o laboratório.

À Caroline Carboni por intermediar o contato com o LANAGRO, pela conseqüente ajuda nas análises das cromatografias e na interpretação dos resultados.

A todos os professores do ICTA com quem tive aula. Apesar de terem sido no modo remoto, foram bastante enriquecedoras.

A todos que de alguma forma estimularam o meu “social” durante todo meu período em Porto Alegre, dos pequenos confrats internos dos laboratórios 201, 203 e 205, aos almoços no RU (Vale e Saúde) e às partidas do Brasil na copa em frente ao DAEDA com a pipoca da Michele. Em particular, à Raquel, à Raíza, ao Gabriel, à Victória, à Carol e à Justine.

À minha família pela torcida e às amigas que se fizeram presentes mesmo a distância em momentos difíceis incluindo a minha irmã, Marília, a Thaynara e o Victor.

*Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ?
Telle est la beauté et la noblesse de la science :
un désir sans fin de repousser les frontières du
savoir, de traquer les secrets de la matière et de
la vie sans idée préconçue des conséquences
éventuelles.*

Marie Skłodowska-Curie

RESUMO

O fruto da sucupira (*Pterodon pubescens*) possui um óleo valioso com alto teor de ácidos graxos e rico em compostos bioativos, como flavonoides e terpenoides. Esses compostos conferem ao óleo diversas propriedades bioativas, como antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. O uso do ultrassom para extração desse óleo pode ser empregado no intuito de otimizar o processo, com redução do tempo, da quantidade de solvente empregada e auxiliar na preservação dos compostos termolábeis. Nesse trabalho, o uso da extração assistida por ultrassom (EAU) para obtenção do óleo de sucupira foi avaliado sob a execução de um planejamento fatorial rotacional completo 2². Foram avaliados os efeitos da intensidade do ultrassom (%) e da concentração de etanol (%) em relação ao teor de lipídeos, a capacidade antioxidante, a cor e a capacidade redutora. O teor máximo de lipídeos foi de 26,91 g/100g, sendo superior ao obtido pelo método de Soxhlet (23,38 g/100g) e estatisticamente igual ao método de Bligh & Dyer (25,93 g/100g). O extrato obtido na condição otimizada (90% de intensidade de ultrassom e 80% de concentração de etanol) foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana, e a estrutura morfológica do fruto antes e após a extração foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, o extrato foi caracterizado quimicamente através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, do inglês *gas chromatography–mass spectrometry*) e cromatografia líquida com tempo de voo quadrupolo acoplada a espectrometria de massas (HPLC-q-ToF-MS, do inglês *high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry*). Observou-se um potencial de atividade antimicrobiana contra *Salmonella* e *E. coli* através do teste de sensibilidade. Compostos como β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, α -copaeno e espatulenol, responsáveis por atividades biológicas de interesse, foram identificados através da GC-MS. A análise da LC-q-ToF-MS identificou compostos como catequina, luteolina, quercetina, taxifolina e seus derivados, pertencentes ao grupo dos flavonoides.

Palavras-chave: flavonoides, terpenoides, atividade antioxidante, sonicação, teor de lipídeos.

ABSTRACT

The sucupira fruit (*Pterodon pubescens*) contains a valuable oil with a high content of fatty acids and rich in bioactive compounds, such as flavonoids and terpenoids. These compounds give the oil various bioactive properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial. The use of ultrasound for the extraction of this oil can be employed to optimize the process, reducing time, the amount of solvent used, and promoting the preservation of thermolabile compounds. In this study, the use of ultrasound-assisted extraction (UAE) for obtaining sucupira oil was evaluated using a complete 2² factorial rotational design. The effects of ultrasound intensity (%) and ethanol concentration (%) on lipid content, antioxidant capacity, color, and reducing capacity were assessed. The maximum lipid content was 26.91 g/100g, which was higher than that obtained by the Soxhlet method (23.38 g/100g) and statistically equal to the Bligh & Dyer method (25.93 g/100g). The extract obtained under the optimized conditions (90% ultrasound intensity and 80% ethanol concentration) was evaluated for antimicrobial activity and the morphological structure of the fruit was assessed by scanning electron microscopy (SEM). Furthermore, the extract was chemically characterized using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (HPLC-q-ToF-MS). Potential antimicrobial activity against *Salmonella* and *E. coli* was observed through the sensitivity test. Compounds such as β -caryophyllene, caryophyllene oxide, α -humulene, α -copaene, and spathulenol, responsible for biologically relevant activities, were identified through GC-MS. LC-q-ToF-MS analysis identified compounds such as catechin, luteolin, quercetin, taxifolin, and their derivatives, belonging to the flavonoid group.

Keywords: flavonoids, terpenoids, antioxidant activity, sonication, lipid content.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Árvore, flores e fruto das espécies <i>Pterodon pubescens</i> (A, B e C) e <i>Pterodon emarginatus</i> (D, E e F)..... | 22 |
| Figura 2 - Estrutura química de (a) isopreno e diterpenos isolados de <i>Pterodon</i> sp.; (b) estrutura linear do geranilgeraniol; e (c) estrutura cíclica dos compostos vouacapanos. As linhas tracejadas indicam onde as quatro unidades de isopreno são unidas..... | 27 |
| Figura 3 - Os quatro principais tipos de metabólitos secundários presentes nos tecidos vegetais..... | 40 |
| Figura 4 - Fluxograma de obtenção e caracterização de compostos bioativos de matriz vegetal..... | 41 |
| Figura 5 - Tecnologias de extração convencional e emergentes que podem ser empregadas em matrizes vegetais..... | 42 |
| Figura 6 - Diagrama do equipamento de extração Soxhlet..... | 46 |
| Figura 7 - Equipamentos de ultrassom: A) banho de ultrassom; B) sonda em sistema em batelada e C) sonda em sistema de fluxo contínuo..... | 50 |
| Figura 8 - Etapas de pré-processamento da sucupira: A) triturador forrageiro; B) sucupira triturada; C) sucupira peneirada; D) sucupira embalada a vácuo..... | 52 |
| Figura 9 - Sistema de sonicação: a) banho de aquecimento, b) banho de manutenção, c) painel de válvulas de aquecimento, d) célula encamisada, e) agitador magnético, f) e g) equipamento de US..... | 54 |
| Figura 10 - Representação da aplicação das amostras nas placas de Petri para o teste de sensibilidade a antimicrobianos (1 a 7 representando, respectivamente, BT1, ET1-05, ET1-10, ET1-15, BT2, ET2-10 e ET2-20)..... | 62 |
| Figura 11 - Teor de lipídeos em função da concentração de etanol (%) e da intensidade do US (%)...... | 74 |
| Figura 12 - Capacidade antioxidante em função da concentração de etanol (%) e da intensidade do ultrassom (%). | 75 |
| Figura 13 - Cor em função da concentração de etanol (%) e da intensidade do ultrassom (%)...... | 76 |
| Figura 14 - Otimização da intensidade de ultrassom e da concentração de etanol a fim de maximizar o teor de lipídeos, a capacidade antioxidante e a cor..... | 77 |
| Figura 15 - Micrografias de MEV da sucupira <i>in natura</i> (controle) e submetida ao tratamento ultrassônico sob três ângulos diferentes para cada amostra..... | 79 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16 - Resultado do teste de sensibilidade aos três <i>pools</i> de bactérias referentes as 7 amostras sob o tratamento 1 (BT1, ET1-05, ET1-10 e ET1-15) e o tratamento 2 (BT2, ET2-10 e ET2-20)..... | 81 |
| Figura 17 - Resultado do teste da CIM aos três <i>pools</i> de bactérias referentes as 7 amostras sob o tratamento 1 (BT1, ET1-05, ET1-10 e ET115) e o tratamento 2 (BT2, ET2-10 e ET2-20)..... | 82 |
| Figura 18 - Cromatograma obtido via CG-MS para o extrato da sucupira obtido por extração exaustiva..... | 86 |
| Figura 19 - Cromatogramas dos extratos do ponto otimizado (azul) e da extração exaustiva (marrom) do fruto da sucupira a 280 nm. | 93 |
| Figura 20 - Cromatograma de absorção no UV-visível e espectro de massas da catequina no modo negativo..... | 94 |
| Figura 21: Curva analítica do ácido gálico para análise da capacidade redutora..... | 103 |
| Figura 22: Cromatograma obtido via CG-FID para o extrato da sucupira obtido por extração exaustiva..... | 107 |
| Figura 23: Cromatograma obtido via CG-MS para o extrato da sucupira obtido por extração exaustiva..... | 108 |
| Figura 24: Cromatograma obtido via CG-FID para o extrato da sucupira no ponto otimizado..... | 108 |
| Figura 25: Cromatograma obtido via CG-MS para o extrato da sucupira no ponto otimizado..... | 108 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição centesimal dos frutos <i>P. emarginatus</i> | 24 |
| Tabela 2 - Substâncias bioativas presentes em frações lipídicas de <i>Pterodon emarginatus</i> , obtidas pelos métodos de extração de Soxhlet e Bligh & Dyer. | 25 |
| Tabela 3 - Composição química de óleos essenciais de onze amostras de <i>P. emarginatus</i> do Cerrado brasileiro..... | 28 |
| Tabela 4 - Fitoquímicos investigados de frutos da sucupira sob a denominação <i>Pterodon pubescens</i> | 31 |
| Tabela 5 - Fitoquímicos investigados de frutos da sucupira sob a denominação de <i>Pterodon emarginatus</i> | 32 |
| Tabela 6 - Fitoquímicos investigados da sucupira sob a denominação de <i>Pterodon polygalaeflorus</i> | 33 |
| Tabela 7 - Atividades biológicas da sucupira e de seus compostos isolados avaliadas em diferentes amostras..... | 36 |
| Tabela 8 - Parâmetros de processo, vantagens e desvantagens de diferentes técnicas de extração. | 44 |
| Tabela 9 - Delineamento experimental para realização da extração assistida por ultrassom. | 55 |
| Tabela 10 - Codificação das amostras para análise da atividade antimicrobiana após os tratamentos de remoção de álcool..... | 61 |
| Tabela 11 - Composição centesimal da sucupira. | 68 |
| Tabela 12 - Resultados do planejamento fatorial completo composto central de 2 ² para extração de compostos de interesse da sucupira utilizando US..... | 70 |
| Tabela 13 - Magnitude dos efeitos dos fatores sobre teor de lipídeos, capacidade antioxidante, cor e capacidade redutora e os coeficientes do modelo reduzido. | 71 |
| Tabela 14 - Valores de F _{calculado} , F _{tabelado} e coeficiente de determinação (R ²) para as variáveis de resposta estudadas. | 72 |
| Tabela 15 - Teor de lipídeos obtido pelos métodos convencionais de Soxhlet e de Bligh & Dyer e pela extração assistida por ultrassom (EAU). | 78 |
| Tabela 16 - Compostos identificados na sucupira e no extrato obtido por EAU por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)..... | 88 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 17 - Compostos fenólicos identificados ou tentativamente identificados em extrato de sucupira por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC- MS). | 95 |
| Tabela 16 - Pontos da curva analítica Trolox para avaliação da atividade antioxidante | 104 |
| Tabela 17 - Representação da microplaca de 96 poços na execução da análise da concentração inibitória mínima | 106 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| % | percentual |
| ° C | graus Celsius |
| µmol | micromol |
| µL | microlitro |
| AA | ácido ascórbico |
| ABTS | ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) |
| ANOVA | análise de variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AOAC | <i>Association of Official Analytical Chemists</i> |
| APCI | <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| B&D | Bligh & Dyer |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BP | Baird-Parker |
| b.w. | <i>body weight</i> |
| C | cor |
| CA | capacidade antioxidante |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> |
| CE | concentração de etanol |
| CIM | concentração inibitória mínima |
| CLSI | <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> |
| cm | centímetro |
| CMM | Centro de Microscopia e Microanálise |
| CR | capacidade redutora |
| EAG | equivalentes de ácido gálico |
| EASI | <i>easy ambient sonic-spray ionization</i> |
| EAU | extração assistida por ultrassom |
| ESI | <i>electrospray ionization</i> |
| GC-MS | <i>gas chromatography mass spectrometry</i> |
| h° | <i>hue</i> |
| HAT | <i>hydrogen atom transfer</i> |
| ICTA | Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos |

| | |
|----------------|--|
| IN | instrução normativa |
| IPNI | <i>International Plant Name Index</i> |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| IUS | intensidade do ultrassom |
| kg | quilograma |
| kHz | quilohertz |
| $K\lambda$ | extinção específica em determinado comprimento de onda |
| LabCEMM | Laboratório Central de Microscopia e Microanálise |
| LATEPA | Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos |
| LC-q-ToF-MS | <i>liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> |
| m/z | razão massa-carga |
| meq | miliequivalente |
| MEV | microscopia eletrônica de varredura |
| mg | miligrama |
| MM | massa molar |
| nA | nanoampère |
| nm | nanômetro |
| NIST | <i>National Institute of Standards and Technology</i> |
| OD | <i>optical density</i> |
| ORAC | <i>oxygen radical absorbance capacity</i> |
| p.c. | <i>post cibum</i> |
| POWO | <i>Plants of the World Online</i> |
| PUC-RS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |
| R ² | coeficiente de determinação |
| RDC | resolução da diretoria colegiada |
| SET | <i>single-electron transfer</i> |
| TEAC | <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> |
| TL | teor de lipídeos |
| UFC | unidades formadoras de colônia |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| US | Ultrassom |
| UV-Vis | <i>ultraviolet-visible</i> |
| VRB | <i>violet red bile lactose</i> |
| XLD | <i>xylose-lysine-desoxycholate</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | <i>Objetivo geral</i> | 19 |
| 2.2 | <i>Objetivos específicos</i> | 19 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 20 |
| 3.1 | <i>O gênero Pterodon</i> | 20 |
| 3.1.1 | A sucupira..... | 21 |
| 3.1.2 | Composição química e as atividades biológicas | 23 |
| 3.2 | <i>O metabolismo vegetal secundário</i> | 39 |
| 3.3 | <i>O processo de extração</i> | 41 |
| 3.3.1 | Extrações convencionais – Soxhlet e Bligh & Dyer | 46 |
| 3.3.2 | Extração assistida por ultrassom | 48 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 52 |
| 4.1 | <i>Preparo da amostra e armazenamento</i> | 52 |
| 4.2 | <i>Caracterização físico-química</i> | 53 |
| 4.3 | <i>Extração assistida por ultrassom</i> | 53 |
| 4.4 | <i>Planejamento experimental</i> | 54 |
| 4.5 | <i>Caracterização dos extratos</i> | 56 |
| 4.5.1 | Teor de lipídeos..... | 56 |
| 4.5.2 | Capacidade antioxidante..... | 57 |
| 4.5.3 | Capacidade redutora..... | 59 |
| 4.5.4 | Cor | 59 |
| 4.6 | <i>Microscopia eletrônica de varredura</i> | 60 |
| 4.7 | <i>Caracterização do óleo extraído na condição otimizada</i> | 60 |
| 4.7.1 | Atividade antimicrobiana | 60 |
| 4.7.2 | Caracterização química | 63 |
| 4.8 | <i>Análises estatísticas</i> | 67 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| 5.1 | <i>Composição da sucupira</i> | 68 |
| 5.2 | <i>Extração assistida por ultrassom de compostos de interesse da sucupira</i> | 69 |
| 5.3 | <i>Otimização das variáveis de extração</i> | 76 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.4 | <i>Microscopia eletrônica de varredura</i> | 78 |
| 5.5 | <i>Caracterização do extrato obtido no ponto otimizado</i> | 80 |
| 5.5.1 | Atividade antimicrobiana | 80 |
| 5.5.2 | Caracterização química | 84 |
| 6 | CONCLUSÕES | 101 |
| 7 | PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS | 102 |
| | APÊNDICE E - CROMATOGRAMAS GC-FID E GC-MS ORIUNDOS DA EXTRAÇÃO EXAUSTIVA E DO EXTRATO OTIMIZADO | 107 |
| 8 | REFERÊNCIAS..... | 109 |

1 INTRODUÇÃO

Todo material vegetal pode ser rico em compostos bioativos, os quais abrangem uma ampla gama de constituintes químicos, como vitaminas, minerais, antioxidantes, compostos fenólicos, entre outros. Isso reflete um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos, antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenos. Os compostos bioativos são metabólitos secundários, ou seja, compostos naturais que desempenham um papel crucial na adaptação e interação das plantas com o meio ambiente, atuando como mecanismos de defesa contra herbívoros, pragas e patógenos. Desta forma, o perfil de compostos bioativos para cada vegetal é variável. Diante da crescente demanda por compostos naturais que promovem a saúde, há um foco cada vez maior nos compostos bioativos de origem vegetal.

A extração desses compostos de fontes vegetais é um passo crucial no aproveitamento do seu potencial bioativo. Métodos tradicionais, como a extração Soxhlet e Bligh & Dyer, têm sido eficazes, mas apresentam desvantagens, tais como longos tempos de extração, elevado consumo de solventes prejudiciais ao meio ambiente e potencial degradação dos compostos bioativos devido ao calor, (Berndmeyer et al., 2014; Fei et al., 2014). À medida que os avanços científicos e tecnológicos continuam a remodelar o cenário da extração de produtos naturais, as tecnologias emergentes ganharam destaque. Dentre elas, a extração assistida por ultrassom (EAU) surgiu como uma alternativa eficiente e mais ecologicamente correta quando comparada às técnicas convencionais. A EAU utiliza a energia mecânica gerada por ondas sonoras de alta frequência para romper as membranas celulares e facilitar a liberação de compostos bioativos. Esta tecnologia oferece diversas vantagens, como tempos de extração reduzidos, menor necessidade de solventes e preservação de compostos termicamente sensíveis.

No contexto da diversidade de plantas exploradas pelo seu conteúdo de metabólitos secundários, a *Pterodon pubescens*, comumente conhecida como sucupira, destaca-se como uma candidata promissora. Nativa do bioma do Cerrado brasileiro, essa planta é conhecida por seus frutos alongados de casca dura e lenhosa que encapsulam um óleo rico em uma série de compostos bioativos, como os ácidos graxos, flavonoides, saponinas e compostos terpenoides. Esse óleo apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, promovendo aplicações potenciais nas áreas de nutracêuticos e medicina natural. A pesquisa sobre a extração do óleo da sucupira representa uma oportunidade para explorar os compostos

bioativos e suas aplicações. Ao desvendar sua composição química e atividades biológicas, é possível desenvolver novos produtos naturais, descobrir novas drogas e medicamentos, intervir em processos agrícolas e impulsionar inovações biotecnológicas. Assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar o uso do ultrassom como uma tecnologia alternativa na extração de óleo do fruto da sucupira, avaliando a composição química e o perfil de compostos bioativos obtido.

Esta dissertação está estruturada em capítulos. O Capítulo 2 descreve os objetivos do presente trabalho. O Capítulo 3 apresenta uma revisão sobre a sucupira, destacando aspectos desde seu gênero a sua composição química. Além disso, discorre-se sobre os compostos bioativos de origem vegetal e sobre os processos de extração que podem ser utilizados, especialmente o uso do ultrassom. O Capítulo 4 descreve os materiais e métodos utilizados para realização desse trabalho. No Capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos, considerando diversas referências da literatura. Por fim, os Capítulos 6 e 7 apresentam as conclusões e perspectivas futuras para realização de novos trabalhos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a utilização do ultrassom como uma tecnologia alternativa na extração de óleo do fruto da sucupira e caracterizá-lo quanto a sua composição química e atividade antimicrobiana.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- avaliar o efeito da intensidade do ultrassom e da concentração de etanol na extração assistida por ultrassom de óleo do fruto da sucupira;
- comparar a extração assistida por ultrassom com o método tradicional de Soxhlet e Bligh & Dyer;
- avaliar a qualidade do óleo do fruto da sucupira pela determinação da capacidade antioxidante, capacidade redutora e características físico-químicas;
- avaliar a atividade antimicrobiana do óleo do fruto da sucupira através do método de difusão em ágar, determinando a concentração inibitória mínima;
- determinar a composição química do óleo de sucupira obtido pelos três métodos de extração, utilizando técnicas analíticas de cromatografias gasosa e líquida acopladas a espectrometria de massas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Inicialmente, esse capítulo discutirá sobre o gênero no qual se enquadra a sucupira (*Pterodon* sp.), ressaltando importâncias encontradas na literatura. Em seguida, a sucupira será abordada discutindo suas características gerais, composição de seu fruto com destaque ao óleo. Na sequência, será apresentada uma diversidade de atividades biológicas que podem ser alcançadas através dos compostos presentes no óleo do seu fruto. Por conseguinte, será abordado o processo de extração, com foco na extração por Soxhlet e Bligh & Dyer, como métodos tradicionais, e na extração assistida por ultrassom (EAU), detalhando princípios, funcionamento e aplicações.

3.1 O gênero *Pterodon*

De forma geral, o gênero *Pterodon* compreende espécies arbóreas aromáticas de 8-20 m de altura que possuem características próprias de terrenos secos e arenosos do cerrado; apresentam frutos em formato de criptossâmara secos e leves, permitindo a dispersão pelo vento, o que pode explicar a alta abundância do gênero no Cerrado (Pinto, 2017). Ao longo dos anos, seis espécies foram descritas para esse gênero: *P. apparicioi* Pedersoli, *P. macrophyllus* Klotzsch, *P. abruptus* (Moric.) Benth, *P. pubescens* (Benth.) Benth, *P. polygalaeiflorus* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vogel. (Pinto, 2017). A base de dados ILDIS (*International Legume Database and Information Service*, 2015) lista os seis nomes, porém atribui o status de “aceito” apenas para *P. abruptus* e *P. emarginatus* enquanto *P. polygalaeiflorus* foi chamada de “variante”. A base de dados IPNI (*International Plant Names Index*, 2021) lista as seis espécies, todavia através do seu programa POWO (*Plants of World Online*), reconhece apenas três espécies, sendo elas *P. abruptus*, *P. apparicioi* e *P. emarginatus*. O programa Flora do Brasil 2023 (Reflora) admite quatro dessas espécies atribuindo o status de “aceito” para *P. abruptus*, *P. apparicioi*, *P. emarginatus* e *P. pubescens*. A maior causa dessa divergência é dada pela delimitação entre *P. pubescens*, *P. emarginatus* e *P. polygalaeiflorus* ora vistas como três táxons distintos, ora como dois e ora como apenas um.

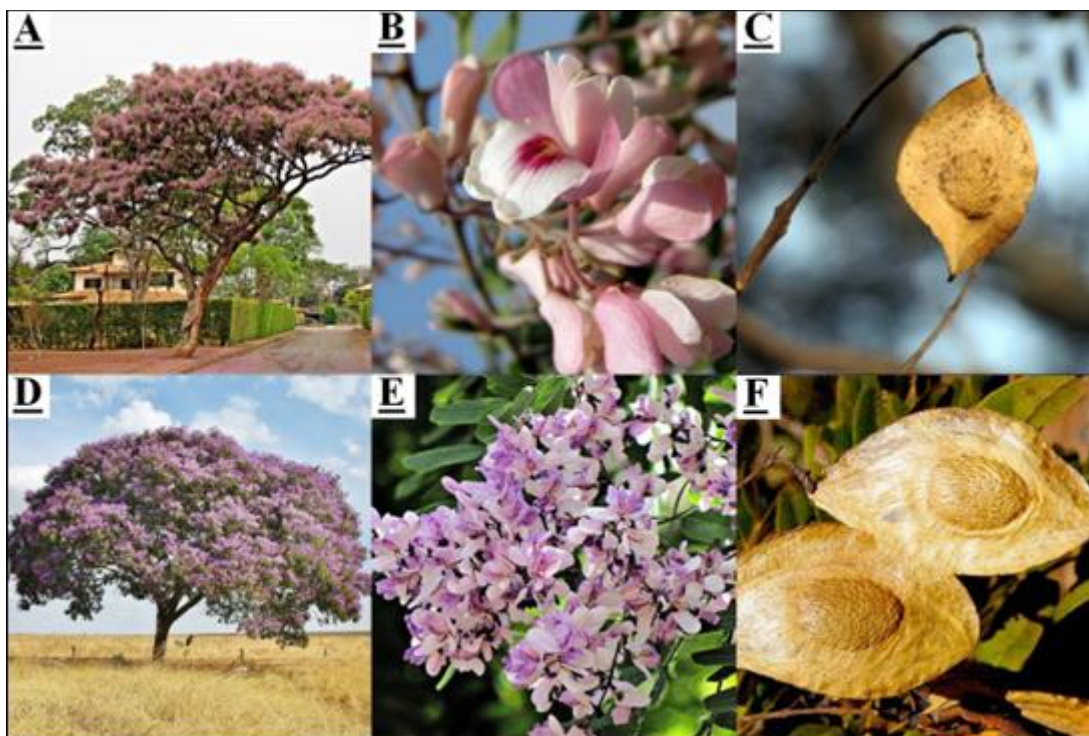
Estudos mais recentes na área de genética das populações têm sido mais precisos na distinção dessas duas espécies. Através do desenvolvimento de marcadores microssatélites, Pinto (2017) observou que *P. emarginatus* apresenta nível intermediário de diversidade genética, e Melo (2018), transferindo marcadores polimórficos da *P. pubescens* na *P. emarginatus*, conseguiu identificar um alto potencial de discriminação individual entre as duas espécies.

3.1.1 A sucupira

As espécies *P. pubescens* e *P. emarginatus* são popularmente conhecidas como sucupira, faveiro, sucupira-branca, sucupira-lisa ou fava-de-sucupira. A Embrapa (2023), por sua vez, denomina *P. pubescens* como sucupira-branca e *P. emarginatus* como sucupira-lisa. Essas espécies são arbóreas, semidecíduas, heliófitas e xerófitas, nativas e não endêmicas do Brasil. Suas árvores alcançam de 8 a 16 m com troncos cilíndricos de 30 a 60 cm de diâmetro revestido por casca lisa branco-amarelada, folhas com raque marginada, fruto com rafe aparente, hilo na posição lateral coberto por um arilo e um embrião liso (Leite et al., 2014). A morfologia do fruto é eurispérmica, variando entre ovoide, oblonga, elíptica e oblongo-elíptica; a coloração varia de marrom-claro a marrom escuro, quase negro (Ferreira et al., 2001).

A distribuição geográfica de ambas as espécies é semelhante, sendo encontradas no Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste e, nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Pantanal. As espécies *P. emarginatus* e *P. pubescens* e apresentam períodos distintos de floração, com picos em agosto e setembro, respectivamente. As diferenças morfológicas entre as duas espécies são discretas; em geral, *P. emarginatus* apresenta folíolos grandes e mais largos, botões florais com base mais estreita do que o ápice, o qual é arredondado. Por outro lado, os botões florais da *P. pubescens* são alongados, com a base da mesma largura que o ápice. A diferença morfológica de maior destaque são as flores de coloração do róseo claro, quase branco, a róseo escuro em *P. pubescens* e roxo em *P. emarginatus* (Rocha, 2006). A Figura 1 apresenta as principais diferenças da árvore, flores e fruto entre as duas espécies.

Figura 1 - Árvore, flores e fruto das espécies *Pterodon pubescens* (A, B e C) e *Pterodon emarginatus* (D, E e F).



Fonte: Ramalho-Carvalho, (2010) & Silva-Júnior, (2005)

Tendo em vista a divergência na literatura em relação às diferentes espécies, doravante as espécies *P. emarginatus*, *P. pubescens* e *P. polygalaeiflorus* quando não especificadas serão denominadas somente como sucupira.

O potencial de uso dessas espécies é diverso, sendo utilizadas nos setores madeireiro (Carvalho, 2020; Lima et al., 2012) e paisagismo (Aquino et al., 2007; Lorenzi, 2002), e para reflorestamento e recuperação de áreas degradadas por serem tolerantes a luz solar e crescerem bem em solos de baixa fertilidade (Lorenzi, 2002; Oliveira e Paiva, 2005). Destaca-se o potencial de uso medicinal dessas espécies, principalmente pela concentração de resinas nos frutos (Dutra, 2008; Pinto et al., 2014). Estudos científicos comprovaram suas propriedades farmacológicas, tais como analgésicas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antitumorais, antirreumáticas, antioxidantes, angiogênicas, antimicrobianas, leishmanicidas e antiproliferativas (Dutra et al., 2009; Hansen et al., 2012; Moraes et al., 2012; Arrais-Silva et al., 2014). Essas propriedades estimulam a comercialização dos frutos (equivocadamente chamados de sementes) em mercados populares (Dutra et al., 2009). Por possuírem ação anti-inflamatória, popularmente são utilizados na elaboração de infusões e extratos alcóolicos para combater dores de coluna e garganta, doenças reumáticas e, até mesmo, como tônico e

depurativo (Euzébio et al., 2009; Machado et al., 2018). Nesse contexto, é importante identificar os compostos presentes na sucupira, e caracterizar seus extratos.

3.1.2 Composição química e as atividades biológicas

Diversos estudos fitoquímicos demonstraram a presença de alcaloides, saponinas, glicosídeos e esteroides na casca das árvores da sucupira (Bustamante et al., 2010), esteroides, sesquiterpenos, isoflavonas e saponinas nas folhas (Negri et al., 2014; Santos et al., 2010), isoflavonas e triterpenos na madeira (Braz-Filho et al., 1971; Marques et al., 1998) e isoflavonas, sesquiterpenos e diterpenos no óleo do fruto (Dutra et al., 2009; Fascio, 1976; Pimenta et al., 2006; Pinto et al., 2013).

As principais substâncias isoladas do gênero *Pterodon* são os terpenos, os quais constituem a maior classe de metabólitos secundários. As substâncias dessa classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir de acetil coenzima A (CoA) ou de intermediários glicolíticos (Taiz e Zeiger, 2009).

Apesar da planta, como um todo, apresentar compostos importantes, o fruto é a parte de maior interesse por apresentar compostos com propriedades bioativas, em particular os terpenos geranilgeraniol e os compostos vouacapânicos, os quais são relatados como grandes responsáveis pelas diversas atividades de interesse exercidas pela sucupira (Spindola et al., 2010). Os frutos contêm um núcleo de endosperma envolto em células periféricas com alto teor de substâncias lipídicas (Oliveira e Paiva, 2005), como é possível observar em sua composição centesimal através da Tabela 1.

Costa-Singh e Jorge (2019) identificaram e quantificaram os compostos bioativos presente na fração lipídica dos frutos da *P. emarginatus* utilizando dois métodos de extração: Soxhlet e Bligh & Dyer. No primeiro foi utilizado éter de petróleo aquecido (40-60 °C) e no segundo uma mistura de clorofórmio, metanol e água (proporção de 2:1:0,8). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 - Composição centesimal dos frutos *P. emarginatus*.

| Análise | Valor |
|----------------------------------|--------------|
| Teor de umidade (%) | 6,08 |
| Cinzas (%) | 0,64 |
| Lipídeos (%) | 22,85 |
| Proteínas (%) | 2,96 |
| Carboidratos (%) | 64,34 |
| Valor total calórico (Kcal/100g) | 506,40 |

Fonte: Neto (2015).

Como pode ser observado na Tabela 2, dez ácidos graxos foram identificados com destaque para o ácido cáprico e láurico, dentre os ácidos graxos saturados, e o ácido oleico e linoleico, dentre os ácidos graxos insaturados. O ácido cáprico é usado como aditivo alimentar em sucos de frutas, sorvetes e alimentos enlatados; apresenta atividades antifúngicas, juntamente com atividades anti-inflamatórias e antivirais (Huang et al., 2011; Murzyn et al., 2010). Do ponto de vista metabólico, a ingestão de ácido cáprico é diretamente absorvida pelo intestino e transportada para o fígado onde sofre β -oxidação, resultando na produção de três metabólitos significativos (β -hidroxibutirato, acetona e acetoacetato), juntos referidos como corpos cetônicos de acetil-CoA (Schönfeld e Wojtczak, 2016). Esses corpos cetônicos gerados no fígado atuam como uma fonte secundária de energia para o cérebro, que depende da glicose como fonte primária de energia (Wlaź et al., 2012). Ainda, o ácido cáprico pode ser empregado para diminuir o risco de doença de Alzheimer, Parkinson, epilepsia, ansiedade, depressão, autismo, etc (Shekhar et al., 2022).

Existe um grande interesse nos óleos vegetais industriais com alto teor de ácido láurico, uma vez que esse ácido é utilizado, principalmente, como aromatizante na indústria alimentícia e como tensoativo em cosméticos, sabões e detergentes, devido a seu alto poder espumante e por ser biodegradável (Crews et al., 2006). Outro aspecto importante é sua atividade antifúngica, principalmente contra fungos patogênicos (Solano et al., 2020).

Tabela 2 - Substâncias bioativas presentes em frações lipídicas de *Pterodon emarginatus*, obtidas pelos métodos de extração de Soxhlet e Bligh & Dyer.

| Composto | Fórmula molecular | Extração por Soxhlet | Extração por Bligh & Dyer |
|-----------------------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| <i>Lipídeos (%)</i> | | | |
| | | 39,15 ± 0,09 ^a | 31,65 ± 0,03 ^b |
| <i>Ácidos graxos (%)</i> | | | |
| Cáprico (C10:0) | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | 23,81 ± 0,03 | 21,19 ± 0,04 |
| Láurico (C12:0) | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | 11,06 ± 0,04 | 9,71 ± 0,06 |
| Palmítico (C16:0) | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 6,62 ± 0,02 | 7,72 ± 0,03 |
| Palmitoléico (C16:1) | C ₁₆ H ₃₀ O ₂ | 1,57 ± 0,03 | 1,67 ± 0,01 |
| Esteárico (C18:0) | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 2,22 ± 0,02 | 2,71 ± 0,05 |
| Oleico (C18:1 <i>n</i> -9) | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | 17,80 ± 0,05 | 18,27 ± 0,02 |
| Linoleico (C18:2 <i>n</i> -6) | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | 28,42 ± 0,01 | 31,29 ± 0,14 |
| Araquidônico (C20:0) | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | 5,43 ± 0,02 | 4,49 ± 0,02 |
| Gadolênico (C20:1) | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | 1,74 ± 0,03 | 1,63 ± 0,03 |
| α-linolênico (C18:3 <i>n</i> 3) | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | 1,33 ± 0,01 | 1,31 ± 0,02 |
| Saturados | - | 49,15 ± 0,03 ^a | 45,82 ± 0,16 ^b |
| Monossaturados | - | 21,11 ± 0,03 ^b | 21,57 ± 0,04 ^a |
| Poliinsaturados | - | 29,75 ± 0,01 ^b | 32,61 ± 0,13 ^a |
| <i>Tocoferóis (mg/kg)</i> | | | |
| γ-tocoferol | C ₂₈ H ₄₈ O ₂ | 5,14 ± 0,06 ^a | 4,17 ± 0,06 |
| δ-tocoferol | C ₂₇ H ₄₆ O ₂ | 16,80 ± 0,10 ^a | 15,53 ± 0,06 |
| Total | - | 21,97 ± 0,06 ^a | 19,70 ± 0,10 |
| Vitamina E* | - | 1,46 ± 0,01 ^a | 1,20 ± 0,01 |
| <i>Fitoesteróis (mg/100 g)</i> | | | |
| Colesterol | C ₂₇ H ₄₆ O | 1,96 ± 0,01 ^a | 1,96 ± 0,01 ^a |
| Campesterol | C ₂₈ H ₄₈ O | 33,46 ± 0,03 ^a | 8,37 ± 0,01 ^b |
| Stigmaesterol | C ₂₉ H ₄₈ O | 2,79 ± 0,01 ^a | 2,79 ± 0,01 ^a |
| β-sitoesterol | C ₂₉ H ₅₀ O | 8,36 ± 0,01 ^b | 11,16 ± 0,01 ^a |
| Total | - | 46,58 ± 0,03 ^a | 24,29 ± 0,01 ^b |
| <i>Carotenóides totais (μg/g)</i> | | | |
| β-caroteno | C ₄₀ H ₅₆ | 12,97 ± 0,16 ^a | 9,84 ± 0,16 ^b |

Tabela 2 (continuação) - Substâncias bioativas presentes em frações lipídicas de *Pterodon emarginatus*, obtidas pelos métodos de extração de Soxhlet e Bligh & Dyer.

| <i>Fenólicos totais (mg EAG/g)**</i> | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------|---------------------------|
| Ácido gálico | C ₇ H ₆ O ₅ | 5,54 ± 0,23 ^b | 10,84 ± 0,08 ^a |

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três determinações. Valores com letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). *Atividade da vitamina E expressa como o equivalente de α -tocoferol. ** Fenólicos totais expressos em (miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra. Fonte: Costa-Singh e Jorge (2019).

Com relação ao ácido oleico, a sua alta concentração nos óleos os torna desejáveis em termos nutricionais e culinários, apresentando alta estabilidade quando utilizados com aquecimento. O ácido oleico é considerado altamente estável à oxidação, sendo também utilizado como agente antipolimerização. As indústrias de óleos comestíveis têm procurado processar óleos vegetais com alto teor de ácido oleico. A predominância de ácidos graxos de cadeia média (C₆-C₁₂) e alto teor de ácido oleico no óleo de sucupira pode representar uma opção adicional como ingrediente para a indústria de processamento de alimentos (De Roos et al., 2001). Além disso, o ácido oleico pode ser usado como excipiente em produtos farmacêuticos e como agente emulsificante ou solubilizante em produtos aerossóis (Choulis, 2011).

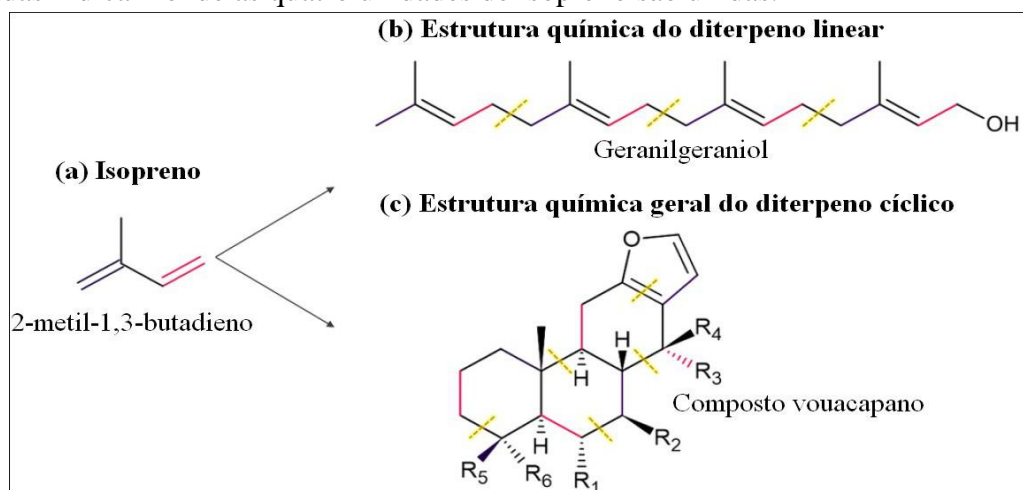
Em relação aos tocoferóis, enquanto o α -tocoferol apresenta maior atividade biológica como a vitamina E, os γ - e δ -tocoferóis apresentam maior atividade antioxidante (Schmidt e Pokorný, 2005; Shadidi e Nazck, 2005). A fração lipídica extraída da sucupira por Soxhlet apresentou quantidade significativa de tocoferóis totais, maior do que o óleo extraído por Bligh & Dyer. O isômero δ -tocoferol foi encontrado em maior quantidade nesta fração (16,80 mg/kg), não sendo detectados α - e β -tocoferóis.

Os fitoesteróis também possuem propriedades interessantes para a saúde, como antioxidante, antitumoral, imuno regulatória, entre outras (Xinmei; et al., 2015); são constituintes que estão presentes em menor quantidade na fração insaponificável da matéria vegetal. A composição dos esteróis nas frações lipídicas da sucupira (46,58 mg/100 g) coincide com a gama de fitoesteróis totais encontrados em óleos de coco e palma (Codex Alimentarius Commission, 2008). De acordo com o *Code of Federal Regulations* (Food and Drug

Administration, 2010), dietas com baixo teor de gordura saturada e colesterol e que incluem 2 g/dia de fitoesteróis podem reduzir o risco de doenças cardíacas. Um estudo clínico mostrou que a ingestão de 1,6 a 2 g de fitoesteróis por dia foi capaz de reduzir a absorção de colesterol pelo intestino em 30% e os níveis sanguíneos de lipoproteínas de colesterol de baixa densidade (LDL-c) em 8-10%. Nesse estudo, concluiu-se que a ingestão de até 3 g/dia de fitoesteróis é segura e eficaz para alcançar uma redução significativa da colesterolemia (Marangoni e Poli, 2010).

Diversos estudos realizaram a caracterização química da sucupira, destacando o isolamento de di- e sesquiterpenos como compostos específicos de interesse devido às atividades biológicas que apresentam (Mahajan; Monteiro, 1973; Dutra et al., 2016; Oliveira et al., 2017). Como as várias substâncias da classe dos terpenos são derivadas do ácido mevalônico, suas estruturas moleculares são compostas por variações de unidades de isopreno (Fig. 2a). Os diterpenos contêm quatro unidades de isopreno em sua estrutura básica e podem ser lineares (como o geranylgeraniol, Fig. 2b) ou cíclicos com estrutura vouacapânica, também referidos como diterpenos furanos (Fig. 2c) (Dewick, 2002).

Figura 2 - Estrutura química de (a) isopreno e diterpenos isolados de *Pterodon* sp.; (b) estrutura linear do geranylgeraniol; e (c) estrutura cíclica dos compostos vouacapanos. As linhas tracejadas indicam onde as quatro unidades de isopreno são unidas.



Fonte: Alcantara et al., (2021).

Os compostos fenólicos são importantes pois contribuem para a atividade antioxidante. De acordo com Nucci-Martins et al., (2015), os compostos fenólicos em maior concentração

na sucupira são (E)-cariofileno, γ -muroloeno e biciclogermacreno entre os sesquiterpenos e 6 α -acetoxivouacapano, 6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17-eno e 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano entre os diterpenos. Alves et al., (2013) investigaram a variabilidade química de onze amostras diferentes de óleos essenciais dos frutos de *P. emarginatus* extraídas de cinco localidades do Cerrado brasileiro. Os resultados obtidos por GC-MS e analisados pela técnica de Análise de Componentes Principais e Agrupamento identificaram dois grupos: *cluster I*, contendo β -cariofileno e δ -elemeno, e *cluster II*, contendo α -copaeno, β -cubebeno, alo-aromadendreno, α -cubebeno e γ -muroloeno. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos pelos autores.

Tabela 3 - Composição química de óleos essenciais de onze amostras de *P. emarginatus* do Cerrado brasileiro.

| Composto (%) | Locais de amonstragem ^a | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Co | Ca | NA1 | NA2 | NA3 | NA4 | NA5 | Ju1 | Ju2 | Ju3 | Ja |
| 6-metil-2-heptanol | - | - | - | - | - | - | - | 1,32 | 3,18 | 0,45 | - |
| α -cubebeno | 0,90 | - | 1,59 | 0,30 | 1,04 | 0,43 | 0,16 | - | - | - | - |
| acetato de citronelila | - | 0,65 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -ilangeno | - | 1,66 | - | - | - | - | - | 1,78 | - | 2,48 | - |
| α -copaeno | 4,74 | - | 13,2 | 10,9 | 13,9 | 6,92 | 2,09 | - | - | - | - |
| β -cubebeno | - | 1,00 | 4,64 | 4,61 | 8,61 | 5,32 | 1,61 | 0,76 | - | - | - |
| β -elemeno | 16,6 | 0,38 | - | - | - | - | - | - | 13,0 | 13,8 | 16,7 |
| longifoleno | - | - | - | - | 0,82 | - | 0,14 | - | - | - | - |
| α -gurjuneno | - | - | - | - | - | 0,47 | - | - | - | - | - |
| β -cariofileno | 20,3 | 39,8 | 2,32 | 17,7 | 4,64 | 3,17 | 68,1 | 49,8 | - | 17,2 | 49,8 |
| α -humuleno | 4,63 | 16,9 | 0,88 | 5,47 | 0,94 | 0,63 | 4,97 | 5,01 | - | 1,58 | 7,65 |
| alo-aromadendreno | - | - | 11,1 | 1,00 | 8,04 | 5,10 | 1,49 | - | - | 1,81 | - |
| 9-epi-(E)-cariofileno | 2,99 | 1,04 | - | - | - | - | - | 1,38 | - | - | - |
| dauca-5,8-dieno | 9,81 | - | - | - | - | - | - | 26,1 | - | - | - |

Tabela 3 (continuação) - Composição química de óleos essenciais de onze amostras de *P. emarginatus* do Cerrado brasileiro.

| Composto (%) | Locais de amonstragem ^a | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|
| | Co | Ca | NA1 | NA2 | NA3 | NA4 | NA5 | Ju1 | Ju2 | Ju3 | Ja |
| γ-gurjuneno | - | - | 0,99 | 0,90 | 0,60 | 0,17 | - | - | - | - | - |
| γ-muroleno | 1,20 | 6,59 | 1,59 | 36,4 | 41,3 | 48,2 | 14,9 | - | - | 41,9 | 1,93 |
| α-amorfeno | - | - | - | - | 0,61 | 0,45 | 0,13 | - | - | - | - |
| biciclogermacreno | 3,89 | 0,74 | - | 5,91 | 13,5 | 22,1 | 4,17 | 3,13 | - | 12,4 | - |
| α-muroleno | 1,21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| germacreno A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,30 | 4,93 |
| δ-amorfeno | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,45 | - |
| γ-cadineno | 1,98 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| δ-cadineno | 3,82 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| espatulenol | 13,8 | - | 37,1 | - | - | - | - | 4,72 | - | 1,86 | - |
| óxido de cariofileno | 8,33 | - | - | - | - | - | - | 4,18 | - | 0,45 | 4,72 |
| globulol | 0,52 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| salvial-4(14)-en-1-ona | - | - | 1,87 | 0,42 | - | - | - | - | - | - | - |
| humuleno epóxido II | 1,86 | 5,16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-cadinol | 1,16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14-hidroxi (E)-cariofileno | 0,51 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (2E,6Z)-farnesol | 0,96 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)-acetato de nerolidila | - | - | 3,87 | 3,33 | 0,47 | 0,91 | - | - | - | - | - |
| n-hexadecanol | - | 0,61 | - | - | - | - | - | - | 6,03 | - | - |
| (E,E)-geranil linalol | - | - | - | - | - | - | - | - | 11,54 | - | - |
| hidrocarbonetos sesquiterpênicos | 72,1 | 68,1 | 37,8 | 85,7 | 94,0 | 93,5 | 98,2 | 87,9 | 13,0 | 96,9 | 81,1 |

Tabela 3 (continuação) - Composição química de óleos essenciais de onze amostras de *P. emarginatus* do Cerrado brasileiro.

| Composto (%) | Locais de amonstragem ^a | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Co | Ca | NA1 | NA2 | NA3 | NA4 | NA5 | Ju1 | Ju2 | Ju3 | Ja |
| sesquiterpenos oxigenados | 27,1 | 5,2 | 38,9 | 0,42 | - | - | - | 8,90 | - | 2,31 | 4,72 |
| diterpenos | - | - | - | - | - | - | - | - | 11,5 | - | - |
| outro | - | 1,26 | 3,87 | 3,33 | 0,47 | 0,91 | - | 1,32 | 9,21 | 0,45 | - |
| Total identificado | 99,2 | 74,5 | 80,6 | 89,4 | 94,5 | 94,4 | 98,2 | 98,2 | 33,7 | 99,6 | 85,8 |

^aCo: Correntina/Bahia; Ca: Campestre/Goiás; NA: Nova América/Goiás; Ju: Jussara/Goiás; Ja: Jaciara/Mato Grosso. Fonte: (Alves et al., 2013).

A primeira investigação quanto à atividade biológica a *P. pubescens* ocorreu em 1967 através do isolamento do sesquiterpeno 14,15-epoxigeranilgeraniol do óleo essencial do fruto, mostrando ser um excelente agente químico profilático na esquistossomose (Mors et al., 1967). Em seguida, foram isolados terpenos (Fascio, 1976; Fascio et al., 1970), diterpenos (Mahajan e Monteiro, 1970) e isoflavanos (Braz-Filho et al., 1971). Em 1973, foi identificada ação cercaricida do óleo do fruto (Mahjan e Monteiro, 1973), assim como atividade antimicrobiana *in vitro* (Neto, 1973), motivando os estudos com as espécies do gênero *Pterodon*.

Hoscheid et al., (2012), usando GC-MS, identificaram o diterpeno predominante observado no perfil cromatográfico da fração hexânica do extrato etanólico de *P. pubescens* como 14,15-epoxigeranilgeraniol (tempo de retenção: 34,41 min.). Segundo os autores, compostos com tempo de retenção entre 42,21 e 48,02 min correspondem a derivados de vouacapanos presentes na fração analisada. As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os diversos compostos já identificados na sucupira de acordo com a denominação utilizada na literatura.

Desde a descoberta de diterpenos furânicos, especialmente o ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -óico, eles têm sido usados como protótipo para a síntese de novas moléculas com diferentes atividades biológicas em vários estudos (Belinelo et al., 2002; Euzébio et al., 2009; Rubinger et al., 2004). Acredita-se que as atividades biológicas do óleo dos frutos da sucupira estejam diretamente relacionadas ao teor de diterpenos furânicos (Spindola et al., 2009).

Tabela 4 - Fitoquímicos investigados de frutos da sucupira sob a denominação *Pterodon pubescens*.

| Composto | Referência |
|---|--|
| 14,15-epoxigeranilgeraniol | Cabral et al., 2013; Hoscheid et al., 2012; Mors et al., 1967 |
| 15-dihidroxigeranilgeraniol | Cabral et al., 2013 |
| Geranilgeraniol | Mors et al., 1967; Spindola et al., 2011 |
| 16-epoxigeranilgeraniol | Fascio et al., 1970 |
| 16,17-Epoxigeranilgeraniol | Fascio et al., 1970 |
| 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-14(17)-eno | Coelho et al., 2005 |
| 7 β -acetoxivouacapano | Coelho et al., 2005 |
| Metil 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato | Coelho et al., 2005; Spindola et al., 2011 |
| Metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato | Giarola et al., 2022; Hoscheid et al., 2012; Servat et al., 2010 |
| Metil 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapano-17 β -oato | Giarola et al., 2022; Hoscheid et al., 2012; Servat et al., 2010 |
| Vouacapano-6 α ,7 β ,14 β ,19-tetraol | Vieira et al., 2008 |
| 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano | Spindola et al., 2009 |
| 7 β -diacetoxivouacapano | Spindola et al., 2009 |
| 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -metileno-ol | Spindola et al., 2009 |
| 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato metil éster | Servat et al., 2010; Spindola et al., 2010 |
| 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano | Pereira et al., 2012 |
| Epoxifarnesol | Pereira et al., 2012 |
| E-cariofileno | Nucci et al., 2012 |
| γ -muroleno | Nucci et al., 2012 |
| Biciclogermacreno | Nucci et al., 2012 |
| 6 α -acetoxivouacapano | Nucci et al., 2012 |
| 6 α ,7 β -Dimetoxivouacapan-17-eno | Nucci et al., 2012 |
| Metil-6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato | Hoscheid et al., 2012; Servat et al., 2012 |

Tabela 5 - Fitoquímicos investigados de frutos da sucupira sob a denominação de *Pterodon emarginatus*.

| Composto | Referência |
|---|--|
| 14,15-dihidroxi-14,15-dihidrogeranilgeraniol | Mahjan & Monteiro, 1973 |
| 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -al | Fascio, 1976 |
| 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato | Fascio, 1976 |
| Ácido 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -óico | Galceran et al., 2011 |
| Metil-6 α ,7 β -diacetoxi-14-hidroxivinaticoato | Fascio, 1976 |
| Metil-6 α ,7 β -diacetoxi-12,16-di-hidro-12,14-di-hidroxi-16-oxovinhaticoato | Fascio, 1976 |
| Alo-aromadendreno | Vila Verde et al., 2018 |
| Aromadendreno | Donati et al., 2015 |
| Biciclogermacreno | Dutra et al., 2009 |
| Germacreno D | Dutra et al., 2009 |
| Germacreno D-4-ol | Donati et al., 2015 |
| Trans-cariofileno | Dutra et al., 2009 |
| α -copaeno | Vila Verde et al., 2018 |
| α -humuleno | Dutra et al., 2009; Vila Verde et al., 2018 |
| β -cariofileno | Hoscheid et al., 2013 |
| E-cariofileno | Vila Verde et al., 2018 |
| β -elemeno | Dutra et al., 2009 |
| γ -elemeno | Vila Verde et al., 2018 |
| δ -elemno | Donati et al., 2015 |
| α -muroleno | Donati et al., 2015 |
| γ -muroleno | Donati et al., 2015; Vila Verde et al., 2018 |
| Espatuleno | Dutra et al., 2009 |
| Óxido de cariofileno | Donati et al., 2015 |
| Lupeol | Oliveira et al., 2012 |
| 14,15-Epoxigeranilgeraniol | Hansen et al., 2012 |
| Trans- α -bisabolol | Vila Verde et al., 2018 |
| cis-sesquisabineno | Vila Verde et al., 2018 |

Tabela 6 - Fitoquímicos investigados da sucupira sob a denominação de *Pterodon polygalaeflorus*.

| Composto | Referência |
|---|---|
| Ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico | Fascio et al., 1975; Arriaga et al., 2000 |
| Metil 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato | Arriaga et al., 2000; Fascio et al., 1975; Leal, 2015 |
| Metil 6 α -acetoxi-7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -oato | Fascio et al., 1975; De Fátima Reis et al., 2015 |
| Vouacapano 6 α ,7 β ,14 β -triol | Fascio et al., 1975 |
| Metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato | Campos; et al., 1994 |
| Metil 6 α ,7 β tiocarbonildioxivouacapan-17 β -oato | Rubinger et al., 2004 |
| 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapo-14(17)-eno | Campos; et al., 1994; Leal, 2015 |
| 6 α -hidroxivouacapano | Arriaga et al., 2000 |
| 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano | Leal, 2015 |
| Vouacapano 6 α ,7 β ,14 β ,19-tetraol | Demuner et al., 1996 |
| Taxifolina | Arriaga et al., 2000 |
| 6 α -acetoxivouacapano | Pimenta et al., 2006 |
| Vouacapano | Pimenta et al., 2006 |
| Trans-cariofileno | Evangelista et al., 2007 |
| α -copaeno | Evangelista et al., 2007; Leal, 2015 |
| γ -muroleno | Evangelista et al., 2007 |
| α -humuleno | Evangelista et al., 2007; Leal, 2015 |
| Aloaromadendreno | Evangelista et al., 2007 |
| Biciclogermacreno | Evangelista et al., 2007 |
| δ -cadineno | Evangelista et al., 2007 |
| α -cubeneno | Evangelista et al., 2007 |
| γ -cadineno | Evangelista et al., 2007 |
| β -gurjuneno | Evangelista et al., 2007 |
| Aromadendreno | Evangelista et al., 2007 |
| α -calacoreno | Evangelista et al., 2007 |
| δ -elemene | Evangelista et al., 2007 |

Tabela 6 (continuação) - Fitoquímicos investigados da sucupira sob a denominação de *Pterodon polygalaeflorus*.

| Composto | Referência |
|--|--------------------------------------|
| α -gurjunene | Evangelista et al., 2007 |
| β -elemene | Evangelista et al., 2007; Leal, 2015 |
| Espatuleno | Evangelista et al., 2007; Leal, 2015 |
| Germacreno D | Evangelista et al., 2007; Leal, 2015 |
| Germacreno B | Leal, 2015 |
| β -cariofileno | Leal, 2015; Leonhardt et al., 2010 |
| Farnesol | Leal, 2015; F. Pinto et al., 2013 |
| Óxido de cariofileno | Leal, 2015; F. Pinto et al., 2013 |
| β -humuleno | Pinto et al., 2013 |
| Metil-7 β -acetoxi-6 α -hidroxivouacapan-17 β -oato | Pinto et al., 2013 |

Alguns estudos demonstram que os diterpenos do tipo vouacapano poderiam ser usados como modelo para desenvolver novos agentes anticancerígenos (De Omena et al., 2006; Pimenta et al., 2006). Por conseguinte, estudos de atividades antiproliferativas em células tumorais de extratos brutos de sucupira também foram realizados (Euzébio et al., 2009; Spindola et al., 2009; Vieira et al., 2008). Euzébio et al., (2009) corroboraram essa evidência mostrando que 6 α ,7 β -hidroxivouacapan-17 β -lactona inibiu o crescimento de células cancerígenas humanas. Esses achados foram confirmados por Pereira et al., (2011) ao demonstrarem que o metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato (SF5) induziu significativamente efeitos citotóxicos e antiproliferativos em células K562.

Um estudo comparativo dos extratos etanólico, hexânico e diclorometano de frutos de *P. polygalaeflorus* demonstrou um maior efeito antinociceptivo do extrato hexânico (100% de inibição), alcançado em doses orais menores (0,5 mg/kg b.w.), em comparação com o observado para derivados de vouacapano isolados em outros estudos. A análise fitoquímica identificou que 90% do material era composto por hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e diterpenos furanos (Pinto et al., 2013).

Compostos como o geranilgeraniol e o éster metílico 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapano-17 β -oato de *P. pubescens* e o ácido 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapano-17 β -óico de *P. emarginatus* foram

avaliados separadamente para verificar suas contribuições na atividade antinociceptiva de extratos brutos (Galceran et al., 2011; Spindola et al., 2010, 2011). Geranilgeraniol e éster metílico de $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan- 17β -oato demonstraram atividades relacionadas à inibição de receptores vanilóides (VR1), receptores periféricos de glutamato (Spindola et al., 2010) e síntese e liberação de serotonina (Galceran et al., 2011). O composto ácido $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapano- 17β -óico apresentou efeito analgésico periférico predominante (Spindola et al., 2011).

Cardoso et al., (2008) avaliaram o efeito do extrato de etanol de frutos de *P. pubescens* na supressão de linfócitos T e B e na produção de óxido nítrico por macrófagos e forneceram evidências de que o extrato poderia suprimir as respostas imunes celular e humoral em ratos saudáveis em concentrações mais baixas (10–2 mg/kg, p.c.). A atividade imunomoduladora demonstrada é um efeito desejado pelo potencial de aplicação dos frutos no tratamento de pacientes com doenças imunoinflamatórias ou autoimunes crônicas. Pesquisas realizadas com o diterpeno $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapano- 17β -óico (50 mg/kg p.c.), isolado de *P. emarginatus*, mostraram inibição significativa do edema em modelos de edema induzido por carragenina e prostaglandina E2, indicando que esse derivado do vouacapano é um dos agentes responsáveis pela ação anti-inflamatória (Galceran et al., 2011).

O extrato etanólico dos frutos de *P. polygalaeflorus* apresentou atividade broncodilatadora em traqueia isolada de porquinho da índia (EC50: 1,7 mg/mL), corroborando seu uso em doenças respiratórias (Leal et al., 2000). Além disso, o óleo essencial de *P. polygalaeflorus* e seu principal constituinte β -cariofileno mostraram ter atividade antiespasmódica e causar relaxamento do tônus muscular no íleo isolado de rato (IC50: 394,35 e 68,65 μ g/mL,); seu efeito inibitório na contratilidade intestinal foi mediado principalmente por um mecanismo intracelular (Evangelista et al., 2007).

A administração oral da fração hexânica dos frutos de *P. pubescens* em ratos (250 mg/kg/p.c. por dia) por 21 dias reduziu consideravelmente o colesterol total (34,18%) e os níveis de triglicerídeos (41,63%) em comparação com os do grupo controle, sem causar alterações no consumo de água e alimentos. Até então, é o único estudo relatando efeitos de redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos (Hoscheid et al., 2013).

Quanto à atividade antimicrobiana, Dutra et al., (2009) mostraram que o óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* inibiu o crescimento de *S. aureus* (concentração inibitória mínima

de 2,5 mg/mL). As frações hexânica e butanol da *P. emarginatus* apresentaram atividade *in vitro* significativa contra *Leishmania amazonensis* (IC50 de 50,06 e 46,65 µg/mL, respectivamente). Segundo os autores, esses resultados indicam que as moléculas bioativas encontradas nos frutos da *P. emarginatus* podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou como fontes de matérias-primas farmacêuticas com atividades antimicrobiana e leishmanicida.

O ácido 6 α ,7 β -di-hidroxiouacapan-17 β -óico isolado de *P. polygalaeiflorus* apresentou resultados promissores como agente antiproliferativo contra linhagens celulares de câncer humano. Da mesma forma, os derivados semissintéticos 6 α -hidroxiouacapano-7 β ,17 β -lactona e 6-oxouacapano-7 β ,17 β -lactona apresentaram citotoxicidade efetiva e seletiva contra as linhagens celulares de câncer de ovário (NCI-ADR/RES e OVCAR-03) e células de leucemia eritromieloblástica (K562), respectivamente (Euzébio et al., 2009).

Os extratos hexânico e metanólico dos frutos de *Pterodon polygalaeiflorus* apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (Pimenta et al., 2006). Nesse estudo, os extratos hexânicos mostraram a melhor atividade, o que pode estar relacionado à presença de diterpenos furânicos como metil 6 α ,7 β -di-hidroxiouacapano-17 β -oato, 6 α -hidroxiouacapano-7 β ,17 β -lactona, 6 α -acetoxiouacapano e ácido 6 α ,7 β -diidroxiouacapan-17 β -óico (De Omena et al., 2006; Pimenta et al., 2006).

A Tabela 7 sumariza as diversas atividades biológicas da sucupira e/ou de seus compostos isolados já determinadas experimentalmente.

Tabela 7 - Atividades biológicas da sucupira e de seus compostos isolados avaliadas em diferentes amostras

| Denominação | Amostra | Atividade | Referência |
|-----------------------|---|--|-----------------------|
| <i>P. emarginatus</i> | Óleo obtido através da prensagem a frio de frutas | Larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> | Oliveira et al., 2016 |
| <i>P. emarginatus</i> | Óleoresina do fruto | Larvicida contra <i>Culex quinquefasciatus</i> | Oliveira et al., 2017 |
| <i>P. emarginatus</i> | Óleo obtido através da prensagem a frio do fruto | Antioxidante | Pacheco et al., 2019 |
| <i>P. emarginatus</i> | Óleo essencial do fruto | Anti-helmíntica | Valentim et al., 2018 |

Tabela 7 (continuação) - Atividades biológicas da sucupira e de seus compostos isolados avaliadas em diferentes amostras.

| Denominação | Amostra | Atividade | Referência |
|--|---|---|---|
| <i>P. emarginatus</i> e <i>P. pubescens</i> | Óleoresina do fruto, extrato hexânico do fruto e extrato por fluido supercrítico | Leishmanicida | Santos et al., 2016; Kawakami et al., 2021 |
| <i>P. pubescens</i> | Extrato hexânico do fruto | Antirreumática / antiartrítica | Hoscheid et al., 2017 |
| <i>P. emarginatus</i> | Óleo obtido através da prensagem a frio do fruto | Antiinflamatória | Pascoa et al., 2015 |
| <i>P. emarginatus</i> | Extrato etanólico do fruto | Antiinflamatória | Pascoa et al., 2015 |
| <i>P. pubescens</i> | Fração hexânica de extrato etanólico | Antiinflamatória | Hoscheid et al., 2013 |
| <i>P. pubescens</i> | Extrato etanólico do fruto | Antiartrítica | Goes et al., 2020 |
| <i>P. pubescens</i> | Extrato bruto do fruto e isômeros 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato metílico e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato metílico | Anti-nociceptiva | Servat et al., 2012 |
| <i>P. pubescens</i> | Extrato etanólico do fruto | Cicatrização de feridas | Salles et al., 2020 |
| <i>P. emarginatus</i> | Extrato aquoso com nanopartículas de prata | Antimicrobiana | Toledo et al., 2020 |
| <i>P. pubescens</i> | Óleo obtido do extrato hexânico do fruto | Antitumoral | Outuki et al., 2018 |
| <i>P. polygalaeflorus</i> | Óleo essencial do fruto | Antiespasmódica | Leonhardt et al., 2010 |
| <i>P. polygalaeflorus</i> | 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona isolado do extrato hexânico | Anticancerígena (células de leucemia eritromieloblástica, K562) | Euzébio et al., 2009 |
| <i>P. polygalaeflorus</i> | 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona isolado do extrato hexânico | Anticancerígena (células de câncer de ovário) | Euzébio et al., 2009 |
| <i>P. pubescens</i> | Geranilgeraniol isolado do óleo do fruto | Antiplaquetária | Calixto et al., 2007 |

Tabela 7 (continuação) - Atividades biológicas da sucupira e de seus compostos isolados avaliadas em diferentes amostras.

| Denominação | Amostra | Atividade | Referência |
|---------------------------|--|---|----------------------------|
| <i>P. emarginatus</i> | Óleo essencial do fruto | Antimicrobiana (<i>S. aureus</i> ATCC 25923) | Dutra et al., 2009 |
| <i>P. pubescens</i> | Extrato etanólico e frações do fruto | Imunomodulatória | Coelho et al., 2005 |
| <i>P. polygalaeflorus</i> | 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-oato de sódio | Anti-edematogênica | Galceran et al., 2011 |
| <i>P. pubescens</i> | Fração hexânica do extrato do fruto | Anti-edematogênica | Silva et al., 2004 |
| <i>P. pubescens</i> | Geranilgeraniol e éster metílico de 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato isolados do extrato bruto do fruto | Antinociceptivo | Spindola et al., 2010 |
| <i>P. pubescens</i> | Éster metílico de 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato isolado do extrato diclorometânico do fruto | Anticancerígena (células tumorais de próstata, PC-3) | Spindola et al., 2009 |
| <i>P. pubescens</i> | Extrato etanólico do fruto e geranilgeraniol isolado do óleo do fruto | Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> | Menna-Barreto et al., 2008 |
| <i>P. pubescens</i> | Microencapsulados com extrato bruto e vouacapanos obtidos do fruto | Anti-nociceptiva (dor de origem neurônica) e anticâncer (ovário e mama) | Servat et al., 2010 |
| <i>P. emarginatus</i> | Óleo-resina e 6 α ,19 β -diacetoxi-7 β ,14 β -dihidroxivouacapan, 6 α -acetoxi-7 β ,14 β -dihidroxivouacapan e metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato isolados | Anti-COVID-19 (pela redução ou controle cronológico dos mediadores inflamatórios IL-6, COX-2, fosfolipase A2 e INF- γ durante o processo de infecção por SARS-CoV-2) | Oliveira et al., 2021 |

Considerando que o presente estudo trabalha com o fruto da planta, doravante o termo “sucupira” será utilizado para se referir ao fruto. Será especificada a planta e/ou parte dela em momentos que se faça necessário.

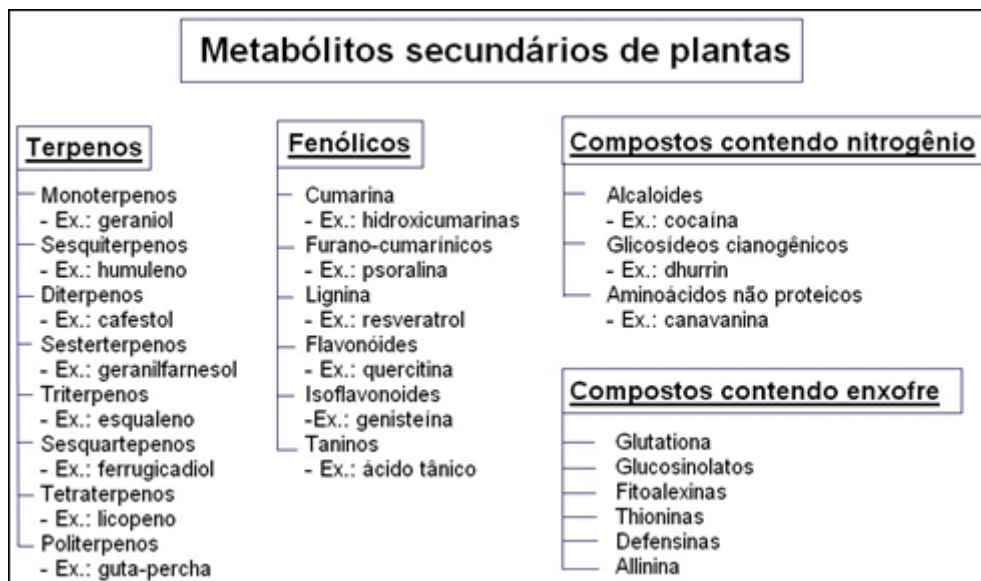
3.2 O metabolismo vegetal secundário

Todo organismo vegetal produz constituintes químicos, os quais fazem parte de suas atividades metabólicas normais. Esses podem ser divididos em metabólitos primários (açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos), que estão envolvidos no crescimento, fotossíntese, reprodução e que são encontrados em todas as plantas. Os metabólitos secundários possuem um papel ecológico, como atrativos de polinizadores, representando adaptações químicas ao estresse do meio ambiente, ou são responsáveis pela defesa química da planta contra microrganismos, insetos e predadores maiores, ou mesmo outras plantas (Heldt e Piechulla, 2011). A produção e composição dos metabólitos secundários nas plantas é referente ao balanço entre biossíntese e transformações que ocorrem durante o crescimento, em detrimento, principalmente, de fatores genéticos e ambientais, da relação com microrganismos e do manejo agrônomico implementado (Botrel et al., 2010; Morsy, 2014). Apesar de não se conhecer todas as funções dos metabólitos secundários, pode-se assumir que todos desempenham uma função vital para o bem-estar dos organismos.

Os metabólitos secundários podem ser classificados com base na sua estrutura química (presença de anel ou unidades de açúcar), na composição (presença ou ausência de nitrogênio), na via pela qual é biossintetizado, na origem da planta ou na sua solubilidade em vários solventes (Aguirre-Becerra et al., 2021; Roopan e Madhumitha, 2018; Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (Simões et al., 2016). Uma classificação simples inclui quatro grupos principais (Figura 3): (1) terpenos (originários da via do mevalonato, compostos quase que inteiramente de carbono e hidrogênio); (2) fenólicos (originários de açúcares simples, contendo anéis benzênicos, hidrogênio e oxigênio); (3) compostos contendo nitrogênio; e (4) compostos contendo enxofre (Simões et al., 2016; Taiz e Zeiger, 2009).

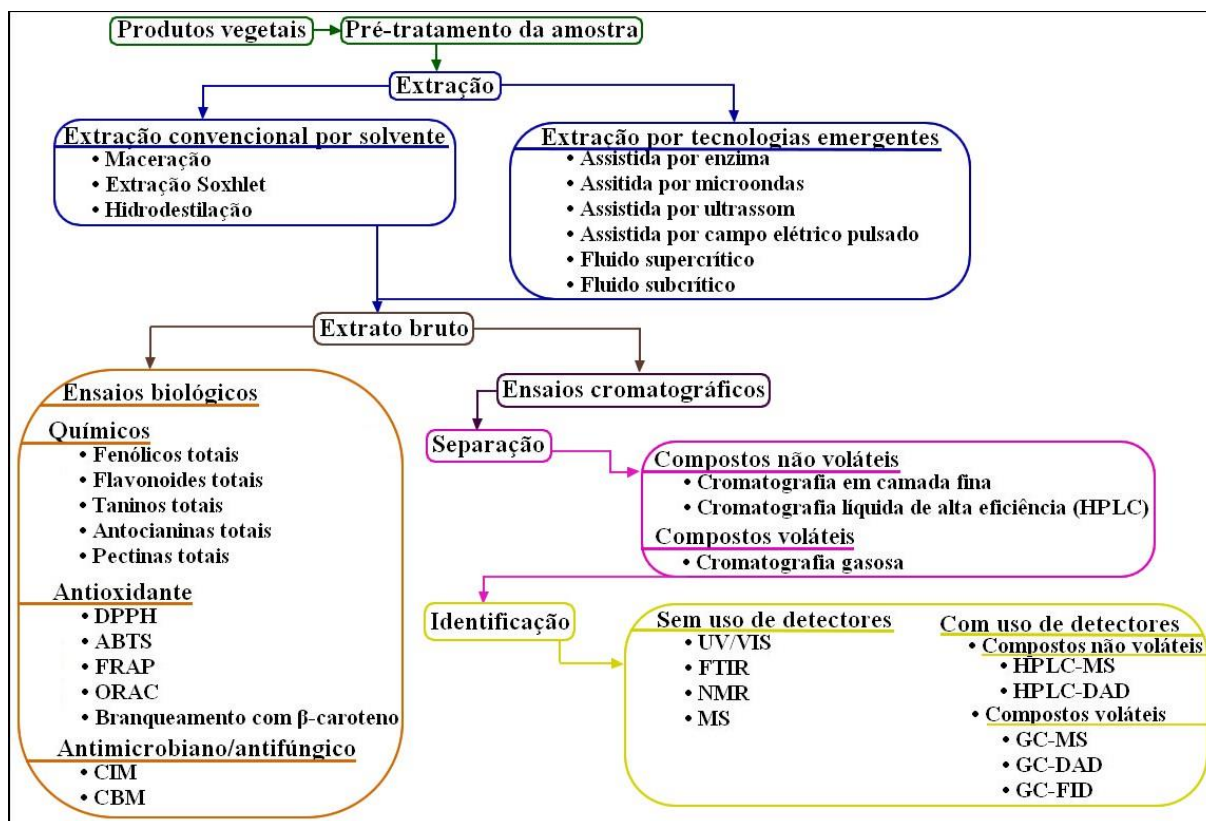
Figura 3 - Os quatro principais tipos de metabólitos secundários presentes nos tecidos vegetais.



Fonte: Adaptado de Twaij e Hasan (2022).

Muitos desses compostos secundários são utilizados em alimentos de alto valor nutritivo, temperos, aromas e fragrâncias, óleos vegetais, resinas, inseticidas, fungicidas, matérias-primas agrícolas, suplementos, bem como medicamentos, gerando produtos de alto valor agregado (Taiz e Zeiger, 2009; Waksmundzka-Hajnos et al., 2008). Por apresentarem diversos tipos de atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, a separação, identificação e caracterização desses compostos é de grande importância. A Figura 4 mostra um fluxograma para obtenção e caracterização de compostos bioativos de origem vegetal.

Figura 4 - Fluxograma de obtenção e caracterização de compostos bioativos de matriz vegetal.



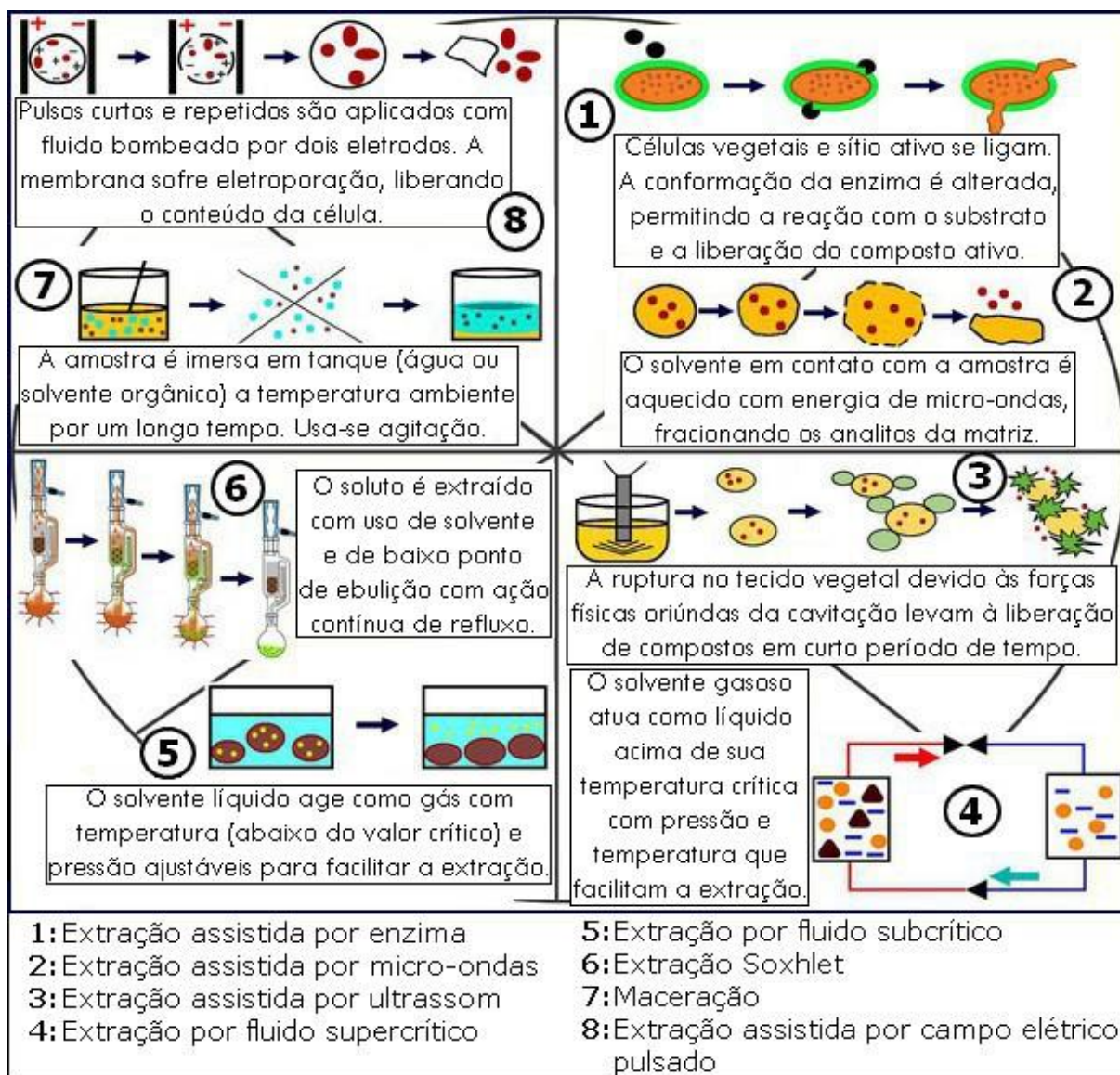
Fonte: Adaptado de Patra; Abdullah e Pradhan (2022).

3.3 O processo de extração

A extração é uma operação unitária que visa a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (Chanioti et al., 2014). A extração por solvente foi um dos primeiros métodos de separação estabelecidos e é atualmente um dos mais utilizados em indústrias de alimentos para se obter compostos bioativos, como antioxidantes e antimicrobianos, que são usados como ingredientes (Andreo e Jorge, 2006; Zia et al., 2019). A extração completa e eficiente de compostos bioativos de materiais vegetais sempre foi um desafio, não havendo um método de extração único que possa ser adotado para todas as matrizes (Rombaut et al., 2014). Um diagrama esquemático das diversas tecnologias de extração disponíveis, juntamente com seu mecanismo de ação, é apresentado na Figura 5. Essas tecnologias são selecionadas com base

em suas vantagens, desvantagens, princípios de operação e tipos de equipamentos disponíveis, além da matriz vegetal alvo.

Figura 5 - Tecnologias de extração convencional e emergentes que podem ser empregadas em matrizes vegetais.



Em geral, os principais fatores que influenciam a eficiência da extração são o tipo de solvente utilizado, o tamanho das partículas da amostra, o tempo de extração, a temperatura e a razão sólido/solvente (Garavand et al., 2019). O tamanho das partículas deve ser o menor possível para aumentar a área superficial de contato da amostra com o solvente. Entre alguns outros fatores relacionados ao material vegetal, pode-se citar a umidade, a complexidade da textura e resistência da célula. O uso de temperaturas elevadas favorece a difusão de massa.

Entretanto, temperaturas altas podem causar a perda de compostos voláteis durante o processo de extração e causar a degradação de compostos termolábeis. A proporção entre sólido e solvente deve ser adequada para não promover a saturação do solvente (Zwingelstein et al., 2020).

Os métodos tradicionais de extração (extração por solvente, maceração, e extração por Soxhlet, por exemplo) em geral necessitam de longos tempos de processo e utilizam quantidades elevadas de solventes tóxicos e não amigáveis ao meio ambiente (Chuyen et al., 2018). Portanto, há um crescente interesse por métodos de extração alternativos que possibilitem um menor consumo de solvente, tempos reduzidos de processo, e maiores rendimentos de extração (Manzoor et al., 2019; Roobab et al., 2018). Nos últimos anos, as pesquisas focaram no desenvolvimento de novas técnicas; de 2000 a 2019, 60% desses estudos foram feitos utilizando a extração por fluido supercrítico, 15% a extração assistida por ultrassom e 14% a extração assistida por micro-ondas (Belwal et al., (2020). A Tabela 8 apresenta as principais vantagens, desvantagens e os parâmetros utilizados pelas diferentes técnicas de extração.

Tabela 8 - Parâmetros de processo, vantagens e desvantagens de diferentes técnicas de extração.

| Parâmetros | Vantagens | Desvantagens | Referência |
|---|---|---|--|
| <i>Extração convencional por solvente</i> | | | |
| Solvente: razão solvente:amostra, tipo, ponto de fusão e implicações da mistura). Processo: temperatura e pressão. | Baixo custo, operação simples, utilizável para compostos termolábeis. | Grande quantidade de solvente é necessária, longo tempo de extração, eficiência baixa, pode ocorrer degradação dos compostos. | Ares et al., 2018; Gu et al., 2019; Mehmood et al., 2019; Taofiq et al., 2019. |
| <i>Extração assistida por enzima (EAE)</i> | | | |
| Enzima: tipo, concentração, composição, propriedades e razão da mistura. Solvente: tipo e força iônica. Processo: temperatura, pH e tempo. | Alta recuperação de fotoquímicos, consome pouca energia, número baixo de etapas necessárias, baixa temperatura e baixo custo geral. | Custo das enzimas é relativamente alto, falha em hidrolisar por completo a parede celular, difícil emprego em larga escala, tempo longo de extração. | Gong et al., 2020; Nadar et al., 2018; Grassino et al., 2020. |
| <i>Extração por fluido supercrítico (EFS)</i> | | | |
| Solvente: densidade, difusividade mássica, viscosidade, polaridade, compressibilidade, razão da mistura, taxa de vazão e pressão de vapor. Processo: temperatura, pressão e tempo. | CO ₂ é quimicamente inerte, não tóxico, barato e bem aceito, baixa polaridade, alta difusividade do solvente, baixo custo, inativação de microrganismos, e reduz a oxidação do composto. | Não aplicada para extratos polares, equipamento é complexo, difícil aplicação para com carbonila, alta pressão é requerida, requer alto investimento e possui muitos parâmetros para se otimizar. | Al-Otoom et al., 2014; Pinto et al., 2020. |

Tabela 8 (continuação) – Parâmetros de processo, vantagens e desvantagens de diferentes técnicas de extração.

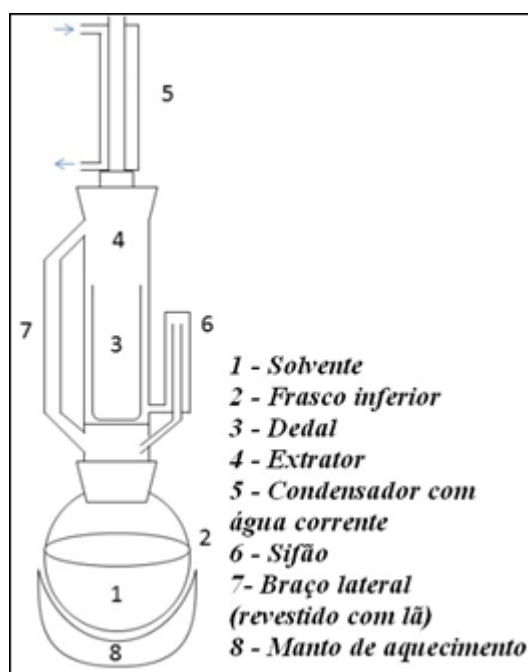
| Parâmetros | Vantagens | Desvantagens | Referência |
|--|--|--|---|
| <i>Extração assistida por micro-ondas (EAM)</i> | | | |
| Solvente: pH, volume, propriedades dielétricas, densidade e razão solvente:amostra; Processo (potência das micro-ondas, temperatura, pressão e tempo de extração). | Aquecimento homogêneo, mínimo uso de solvente, curto tempo de extração, melhora de rendimento, operação simples, sem risco de oxidação. | Alguns solventes podem desgastar o equipamento, pode ocorrer oxidação, não aplicável para compostos termossensíveis, para coletar compostos voláteis o recipiente precisa ser resfriado. | Al-Dhabi e Ponmurugan, 2020; Arrutia et al., 2020; Okolie et al., 2019 |
| <i>Extração assistida por ultrassom (EAU)</i> | | | |
| Solvente: tipo do solvente, razão da mistura e reação dos solventes com a matriz; Processo: frequência, vibração da sonda/banho, amplitude, gerador ultrassônico, forma e tamanho do reator, pressão, temperatura e vazão da bomba. | Melhor eficiência, reduz tempo de extração, quantidade de solvente e custos, aumenta o rendimento, versátil em termos de solvente, rápido e reprodutível, baixa temperatura de processo, diminui riscos de poluição ambiental, aplicável para compostos termolábeis. | Pode ocorrer não uniformidade do ultrassom com a solução, compostos alvo podem sofrer aquecimento indesejado e pode gerar espécies oxidativas. | Belwal et al., 2020; Carrillo-Hormaza et al., 2020; Chakraborty et al., 2020; Dzah et al., 2020 |
| <i>Extração assistida por campo elétrico pulsado (EACEP)</i> | | | |
| Solvente: tipo, razão solvente:amostra; Processo: vazão, frequência, tempo, diâmetro da câmara e duração dos pulsos elétricos. | Baixo consumo energético, temperatura moderada, melhora produtividade, maior seletividade, aumentam a taxa de extração, evita perda de qualidade. | Alto custo do equipamento, pulso de alta voltagem é necessário, o eletrodo pode causar corrosão. | Andreou et al., 2020; El Kantar et al., 2018; Plazzotta et al., 2021 |

Nas próximas seções, os métodos de extração por Soxhlet e por ultrassom serão abordados de forma detalhada pois são técnicas utilizadas no presente trabalho.

3.3.1 Extrações convencionais – Soxhlet e Bligh & Dyer

O extrator Soxhlet foi proposto pela primeira vez pelo químico alemão Franz Ritter Von Soxhlet (1879), tendo sido projetado principalmente para a extração de lipídeos; porém, ao longo dos anos, o seu uso foi sendo disseminado para outras aplicações, por exemplo, para extração de compostos bioativos de várias fontes naturais. Essa técnica é geralmente utilizada como padrão de comparação com métodos alternativos de extração. Uma representação do equipamento de Soxhlet é mostrada na Figura 6.

Figura 6 - Diagrama do equipamento de extração Soxhlet.



Fonte: adaptado de Redfern et al., (2014).

Diversos autores utilizaram esse equipamento para extração de compostos bioativos de fontes vegetais. Cruz et al., (2017) estudaram a atividade antioxidante e antibacteriana de extratos da semente de butiá e utilizaram a extração Soxhlet com os solventes hexano, etanol e

mistura etanol-água. Os autores relataram rendimentos globais de $17,5 \pm 2,2\%$, $18,4 \pm 0,4\%$ e $11 \pm 1,0\%$, respectivamente. Teshome et al., (2022) estudaram as propriedades físico-químicas, degradação lipídica, β -carotenoides, tocoferóis e vitaminas, bem como perfis de aminoácidos e ácidos graxos do óleo extraído por Soxhlet de cinco genótipos de sementes de agrião (*Lepidium sativum* L.). Foi reportado rendimentos de $18,5 \pm 1,1\%$ a $23,4 \pm 0,8\%$, sendo valores promissores para o estudo.

Zhang et al., (2022) estudaram a aplicação de diversos métodos de extração (extração por prensa, extração Soxhlet, extração orgânica e extração aquosa) para avaliar propriedades físico-químicas, composição de ácidos graxos, compostos voláteis e propriedades antioxidantes do óleo da semente de melão do campo (*Cucumis melo* L. var. *agrestis* Naud). O óleo de mais alto rendimento (34,47%) foi aquele obtido pela extração Soxhlet sendo também o mais forte em termos de capacidade de eliminação de radicais livres (DPPH e ABTS⁺) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP). Além disso, este foi também o que apresentou os maiores valores de α -, β -, e γ -tocoferol ($2,14 \pm 0,12$; $2,17 \pm 0,17$ e $20,63 \pm 0,14$), que são antioxidantes naturais com ação estabilizante de óleos, conferindo baixo valor de peróxido. Por sua vez, Liu et al., (2022) avaliaram os efeitos de métodos convencionais de extração (Soxhlet; extração por agitação) e emergente (extração assistida por microondas; extração assistida por ultrassom; extração subcrítica) no rendimento de óleo, propriedades físico-químicas e lipídios composição do óleo de sementes de romã. O rendimento de óleo variou de $11,32 \pm 0,08\%$ a $15,66 \pm 0,24\%$, sendo que o maior rendimento foi obtido pelo Soxhlet.

O método de extração lipídica de Bligh & Dyer é um dos procedimentos padrão para isolar frações lipídicas totais de matrizes biológicas. O método foi introduzido em 1959 em busca de um procedimento eficiente e suave para estudar a decomposição lipídica em peixes congelados (Bligh e Dyer, 1959). O princípio básico para a extração é baseado no método de Folch (Folch et al., 1957) utilizando menos quantidades de clorofórmio e metanol para a etapa de extração primária. O método consiste na homogeneização de uma amostra biológica em uma mistura monofásica de clorofórmio/metanol/água. Posteriormente, uma separação de fases é induzida pela adição de clorofórmio e água. A extração segue os mesmos princípios físico-químicos para a distribuição de componentes químicos entre dois solventes não miscíveis em que se aplicam à lei de partição e difusão de Nernst, como no método de Folch. Embora o método tenha sido introduzido para extração lipídica de músculo de peixe, encontrou muitas aplicações em pesquisas biológicas e biomédicas. Em 1999, Smedes e Askland revisitaram a composição da mistura ternária de solventes clorofórmio/metanol/água do método original e,

com uso de HPLC e GC, constataram que o rendimento do método está fortemente associado ao teor de metanol e poderia ser melhorado com uma maior proporção do mesmo (Smedes e Askland, 1999). Na sequência, Iverson et al., (2001) observou limitações no método original instigando o emprego de novas adaptações a depender da amostra. A solubilidade dos lipídeos em questão foi considerada, implicando em diferentes proporções de solvente/amostra. Atualmente diversos estudos modificam o método visando o melhor resultado para o que procuram, muitas vezes sendo pela busca de lipídeos específicos (Huang et al., 2020; Zainuddin et al., 2021).

O uso do método já foi amplamente utilizado para obtenção de lipídeos oriundos a partir de microalgas (Zhou et al., 2022), sementes e frutos (Prado et al., 2021). Mohanty et al., (2020) avaliaram 8 espécies diferentes de microalgas alcançando teor lipídico variando de 5,3 a 21,3 %. Suzuki et al., (2023) realizaram a extração do óleo de sementes de maracujá com aplicação em lipossomos tendo obtido teor variando de 10 a 17%.

3.3.2 Extração assistida por ultrassom

O ultrassom (US) é compreendido como ondas de alta frequência (> 20 kHz) acima do limiar da audição humana (Manzoor et al., 2019; Zia et al., 2019). O uso dessas ondas na extração, conhecida como extração assistida por ultrassom (EAU), surgiu como uma técnica promissora que atende aos critérios exigidos de um processo de baixo custo e de mínimo impacto ambiental. As características notáveis da EAU incluem versatilidade, simplicidade, segurança, rapidez e adequado custo-benefício (Azmir et al., 2013; Wang e Weller, 2006). A EAU, permite a obtenção de taxas de extração mais altas com menor uso de solvente, como confirmado por diversos estudos, quando comparado aos métodos tradicionais de extração (Chemat et al., 2017; Jalili et al., 2018; Zhong et al., 2018). Uma variedade de ácidos orgânicos, antioxidantes e pigmentos foram extraídos efetivamente de uma ampla gama de matrizes alimentares através da EAU (Altemimi et al., 2016; Carrera et al., 2012; Martínez-Ramos et al., 2020; Montero-Calderon et al., 2019; Grassino et al., 2020; Rashid et al., 2022; Rombaut et al., 2014; Tutunchi et al., 2019).

A melhoria nos processos de extração quando o US é utilizado deve-se ao efeito mecânico de agitação e cavitação. Quando ondas de ultrassom de alta potência se propagam

através de uma matriz, uma sequência de compressões e rarefações é induzida, causando alteração de pressão na matriz. Essa variação de pressão causa a formação de bolhas de cavitação, que crescem até se tornarem instáveis e entrarem em colapso. Essa criação, expansão e colapso de bolhas na matriz é conhecido como o fenômeno de cavitação acústica. A implosão da bolha gera altas pressões e temperaturas que, por sua vez, resultam em turbulência e fortes efeitos de *micro-streaming*. Esses efeitos coletivamente causam a ruptura da membrana celular e ocorre a penetração do solvente na matriz. Esses efeitos mecânicos causam redução do tamanho de partícula, permitindo maior penetração de solvente, o que leva a um aumento da área de superfície de contato entre as fases líquida e sólida (Xie et al., 2015). Como resultado, os compostos extrativos alvo se difundem rapidamente da matriz para o solvente com aumento da transferência de massa através da membrana (Toma et al., 2001).

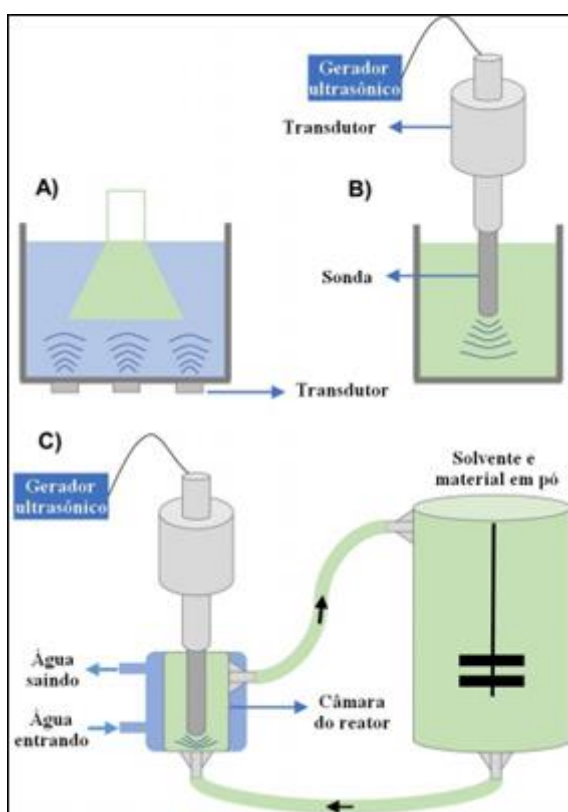
A extração de compostos por EAU depende de alguns parâmetros de processo, como intensidade (amplitude da onda), frequência, tipo de solvente, temperatura e agitação (Nipornram et al., 2018). O ultrassom tem como desvantagem a possibilidade de causar a inativação do composto bioativo liberado devido à formação de radicais livres ($H\cdot$ e $OH\cdot$) na matriz e devido às altas temperaturas e pressões alcançadas em determinados pontos do meio). Esses radicais estimulam reações em cadeia, levando à degradação dos compostos extraídos.

Os equipamentos de US podem ser do tipo banho ou sonda, conforme ilustrado na Figura 7. No equipamento tipo banho, os transdutores estão localizados ao redor do tanque, e a energia total aplicada é dividida entre o número de transdutores empregados (Fig. 7A). Em geral, baixas amplitudes e, portanto, menores intensidades energéticas são as principais desvantagens deste tipo de dispositivo quando se pretende atingir escalas piloto ou industriais (Peshkovsky et al., 2013). Por outro lado, o equipamento tipo sonda concentra toda a energia em uma única sonda adaptada ao transdutor, que é imersa no reator, resultando na entrega direta de vibrações no meio de extração com perda mínima de energia (Fig. 7B). Altas amplitudes e intensidades são alcançadas especialmente quando a sonda é usada com um reator de pequeno volume no modo batelada ou em fluxo contínuo (Fig. 7C) (Carrillo-Hormaza et al., 2020).

Vários estudos têm relatado as aplicações industriais do ultrassom para a extração de compostos bioativos de ervas (Kadam et al., 2015; Tzima et al., 2021), especiarias (Žlabur et al., 2021), resíduos agroindustriais (Santos et al., 2021) e microalgas (Khawli et al., 2021; Hildebrand et al., 2020). Montero-Calderon et al., (2019) estudaram o emprego da EAU na valorização de subprodutos como a casca de laranja procurando avaliar os compostos bioativos

presentes. Foi possível obter valores promissores como concentração de carotenoides totais de 0,63 mg β -caroteno/100 g, concentração de vitamina C de 53,78 mg AA/100 g, concentração fenólica de 105,96 mg EAG/100 g e capacidade antioxidante de 27,08 mM ET para ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) e 3,97 mM ET para TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*).

Figura 7 - Equipamentos de ultrassom: A) banho de ultrassom; B) sonda em sistema em batelada e C) sonda em sistema de fluxo contínuo.



Fonte: adaptado de Carrillo-hormaza et al., (2020).

Com relação ao uso da EAU para extração de óleos, alguns trabalhos na literatura investigaram essa aplicação. Tan et al., (2018) relataram que a aplicação da EAU não resultou em maior rendimento na extração de óleo de abacate comparado ao método Soxhlet, porém resultou em maior aplicabilidade devido ao tempo curto de extração. Em outro estudo, a EAU aumentou a eficiência de extração do óleo de canola em comparação com o método Soxhlet sem comprometer o perfil de ácidos graxos, obtendo melhor estabilidade oxidativa e também destacando possível emprego em escala industrial (Jalili et al., 2018).

Toda et al., (2022) avaliaram o emprego extração assistida por ultrassom (EAU), em diferentes condições, para obtenção do óleo residual da borra de café. Nesse estudo, a EAU

permitiu a obtenção de sólidos desengordurados com maiores valores de densidade aparente, corroborando o aumento na quantidade de partículas de menor diâmetro devido à sonicação. Não foi possível identificar ganhos significativos em termos de rendimento pela EAU em relação à extração convencional, porém seu uso com outras configurações de extração (uso de extratores contracorrente e associação de técnicas de intensificação) mostrou-se como alternativa interessante em termos de aplicação industrial, maior viabilidade econômica e caracterização profunda de compostos menores.

Couto et al., (2022) avaliaram a eficiência de extração de lipídios pela EAU, com uso de etanol, de *Chlorella vulgaris* cultivada em condições autotróficas e heterotróficas. A extração de etanol assistida por sonda de ultrassom forneceu rendimentos lipídicos promissores e extratos com maior pureza lipídica, reprodutibilidade da composição lipídica polar e riqueza em lipídios polares com ômega 3 saudáveis para futuras aplicações em indústrias nutraceuticas e alimentícias.

Zaniol et al., (2020) utilizaram a EAU, assim como a extração por Soxhlet e fluido supercrítico, para a obtenção de um extrato da sucupira com potencial larvicida. Esse estudo analisou ainda o uso de solvente polar (etanol) e apolar (hexano e CO₂). Em termos de rendimento, a extração por Soxhlet utilizando etanol demonstrou o melhor resultado, alcançando 41,5 %, comparado com os valores de 36,6% e 32,7% pela EAU e EFS, respectivamente. Entretanto, como apontado anteriormente, a EAU se sobressai quando se avalia a viabilidade do processo. Além disso, esse estudo também mostrou que o emprego do etanol (polar) foi superior ao hexano (apolar) no rendimento e, conseqüentemente, na maior extração dos compostos de interesse da sucupira, como o geraniol e o cariofileno. Na EAU, estes compostos passaram de 2,54% e 11,53%, utilizando hexano, para 14,09% e 14,54%, utilizando etanol, respectivamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse capítulo apresenta a metodologia empregada para realização do presente trabalho. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), localizado no Departamento de Engenharia Química da UFRGS, no Laboratório de Química e Processamento de Alimentos, no Laboratório de Compostos Bioativos, e nos Laboratórios de Microbiologia e Higiene de Alimentos, localizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

4.1 Preparo da amostra e armazenamento

A sucupira (5 kg) foi adquirida em mercado local em São Paulo, SP. A amostra foi moída em triturador forrageiro (modelo TRF 400 Super, Trapp, Brasil), peneirada (Mesh Tyler 14), para melhor homogeneização das partes, embaladas a vácuo em sacos plásticos contendo 200 g cada e armazenadas em freezer a -18 °C. A Figura 8 ilustra o equipamento utilizado para trituração e a sucupira ao longo das etapas descritas.

Figura 8 - Etapas de pré-processamento da sucupira: A) triturador forrageiro; B) sucupira triturada; C) sucupira peneirada; D) sucupira embalada a vácuo.



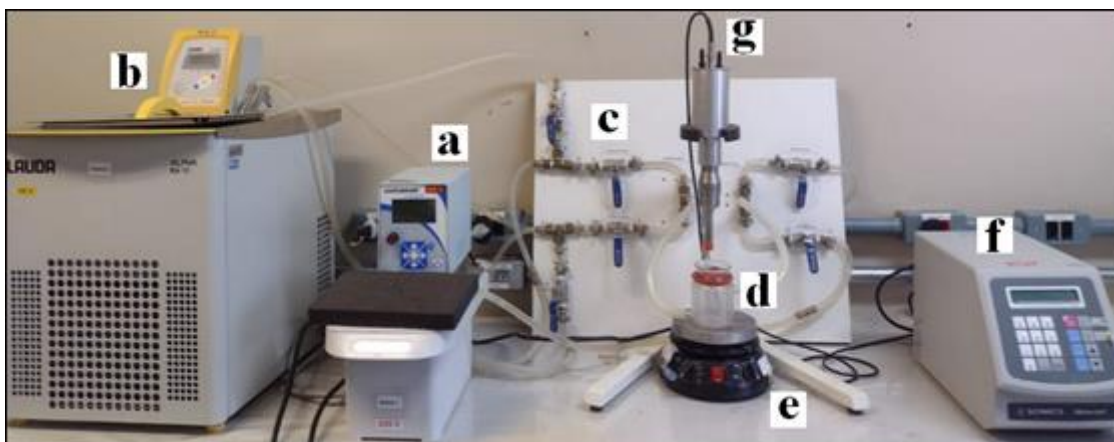
4.2 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química da sucupira foi realizada de acordo com a metodologia oficial da *Association of Official Analytical Chemists - AOAC* (2005). O teor de umidade e substâncias voláteis presentes na matéria-prima foi determinado pela metodologia 925.09 da AOAC (2005) fundamentada na perda de umidade e substâncias voláteis da amostra submetida a 105 °C. O teor de proteínas foi determinado pelo método de *Kjeldahl* (destilador de nitrogênio modelo TE-0364, neutralizador de gases Scrubber modelo TE-152 e controlador de temperatura modelo TE-007MP, TECNAL, Brasil) com fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25. O teor de cinzas foi determinado em forno mufla digital (modelo 312.6SO ML1729, Elektro ThermLinn, Alemanha), operando a 550 °C. O teor de lipídeos foi determinado por extração Soxhlet de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando o solvente éter etílico. O teor de carboidratos foi obtido por diferença.

4.3 Extração assistida por ultrassom

O processo de extração assistida por ultrassom foi realizado através de um aparato experimental construído no Laboratório de Processamento e Tecnologia de Alimentos (LATEPA) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS. O sistema consiste de um ultrassom (US) tipo sonda (modelo VCX 750, Sonics, EUA, frequência de 20 kHz e sonda de 12 cm de diâmetro) e uma célula de vidro encamisada acoplada a um sistema de válvulas, que permite a circulação de água proveniente de um banho mantido a 10 °C. A temperatura do meio de extração foi controlada por um termômetro durante o processo. A Figura 9 apresenta uma fotografia do sistema de US.

Figura 9 - Sistema de sonicação: a) banho de aquecimento, b) banho de manutenção, c) painel de válvulas de aquecimento, d) célula encamisada, e) agitador magnético, f) e g) equipamento de US.



Inicialmente, o banho b foi ligado para atingir e manter a temperatura de 10 °C. A amostra (7,5 g) foi pesada diretamente na célula que foi conectada ao sistema e foi adicionado o solvente de extração que consiste de uma solução com diferentes concentrações de água e etanol (de acordo com um planejamento experimental) totalizando 75 mL. A altura da sonda foi padronizada de modo a ficar imersa na metade da altura da mistura. A extração foi realizada em diferentes intensidades de US (de acordo com um planejamento experimental), por um período de 10 min no modo pulsado (20 on/20 off). A amostra foi agitada através de um agitador magnético (Fisatom, 752^a, Brasil).

Após a extração, a amostra foi filtrada à vácuo. O extrato foi transferido para tubos Falcon. Quando não utilizados imediatamente, os tubos foram fechados com aplicação de nitrogênio gasoso e levados a freezer à -18 °C.

4.4 Planejamento experimental

Para avaliar o efeito da intensidade do US (%) e da concentração de solução de etanol (%) nas propriedades dos extratos, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta. As variáveis de resposta avaliadas foram capacidade antioxidante, capacidade redutora, teor de lipídeos e cor dos extratos. Foi utilizado um planejamento fatorial 2² com 4 pontos axiais e 4 centrais, totalizando 12 experimentos.

As variáveis dependentes estão relacionadas com as variáveis independentes através do modelo de segunda ordem, apresentado na Equação 1:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (1)$$

em que Y_i representa as variáveis dependentes, β_n os coeficientes da regressão, e X_1 e X_2 os níveis codificados das variáveis independentes.

O delineamento experimental com as variáveis independentes, reais e codificadas, está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Delineamento experimental para realização da extração assistida por ultrassom.

| Ensaio | Variáveis codificadas | | Variáveis reais | |
|--------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Intensidade do US</i> | <i>Concentração de etanol</i> | <i>Intensidade do US (%)</i> | <i>Concentração de etanol (%)</i> |
| 1 | - 1 | - 1 | 39 | 56 |
| 2 | 1 | - 1 | 81 | 56 |
| 3 | - 1 | 1 | 39 | 84 |
| 4 | 1 | 1 | 81 | 84 |
| 5 | 0 | 0 | 60 | 70 |
| 6 | 0 | 0 | 60 | 70 |
| 7 | 0 | 0 | 60 | 70 |
| 8 | - 1,414 | 0 | 30 | 70 |
| 9 | 1,414 | 0 | 30 | 70 |
| 10 | 0 | - 1,414 | 60 | 50 |
| 11 | 0 | 1,414 | 60 | 50 |
| 12 | 0 | 0 | 60 | 70 |

Após a realização do planejamento fatorial, foi realizada uma otimização multialvo com o objetivo de maximizar o teor de lipídeos, a capacidade antioxidante e a cor simultaneamente. Para tanto, foi utilizada a função “*desirability*” no software Statistica 13.5 (TIBCO Software Inc.).

O erro médio entre os valores experimentais e preditos pelo modelo (%) foi calculado através da Equação 2:

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{exp} - y_{calc}|}{y_{exp}} \quad (2)$$

em que E é o erro médio, n é o número de dados experimentais, y_{exp} são os dados experimentais e y_{calc} são os valores preditos pelo modelo.

O extrato obtido no ponto ótimo foi avaliado com relação a sua composição química por HPLC-MS e CG-MS, atividade antimicrobiana, índice de peróxido e dienos e trienos. O resíduo sólido resultante da extração foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.5 Caracterização dos extratos

4.5.1 Teor de lipídeos

A quantificação do teor de lipídeos foi realizada de acordo com a metodologia Bligh e Dyer, (1959) com adaptações, seguida da quantificação por evaporação do solvente. Após o processo ultrassônico, uma alíquota de 5 gramas do extrato foi pesada em frasco âmbar ao qual foi adicionado 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água destilada. Os frascos foram levados para agitador magnético onde ficaram por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução 10% Na_2SO_4 , previamente preparada. Por fim, os frascos foram agitados novamente por mais 2 minutos. As soluções dos frascos foram vertidas em funil de separação, e o filtrado foi coletado em Erlenmeyer utilizando

funil, papel filtro e 1 g de sulfato de sódio anidro. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi transferido para frascos âmbar previamente pesados e específicos para encaixe no sistema rotaevaporador.

Após evaporação, os frascos não tampados foram levados para dessecador. Após 1 h, os frascos foram pesados, e o teor de lipídeos foi calculado através da Equação 3:

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{(P_f - P_i) \times 4 \times 100}{P_a} \quad (3)$$

em que P_i , P_f e P_a representam o peso inicial e final dos frascos, o e o peso da amostra, respectivamente.

4.5.2 Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS^{•+} foi realizada conforme metodologia descrita por Re et al. (1999) com modificações. O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS (MM = 548,68) 14 nM (0,0768 g do ABTS foi dissolvido em balão volumétrico de 10 mL com água destilada) e 5 mL da solução de persulfato de potássio (MM = 270,33) 4,9 nM (0,0332 g do persulfato de potássio foi dissolvido em balão volumétrico de 25 mL com água destilada). A solução foi mantida em temperatura ambiente e protegida da luz por 16 h antes do uso. A solução-trabalho de ABTS^{•+} foi diluída com etanol até atingir a absorvância de $0,700 \pm 0,020$ a 750 nm no espectrofotômetro.

As amostras foram analisadas com dois fatores de diluição, 10% e 50%, utilizando o etanol. No espectrofotômetro, foi lido o branco nos modos espectrofotométrico e cinética. Foi adicionado 1800 µL da solução-trabalho de ABTS^{•+} em todas as cubetas utilizadas e a leitura da absorvância inicial no modo espectrofotométrico foi feita. Em seguida, 200 µL do extrato foi depositado nas cubetas e homogeneizado. A leitura no modo cinética foi realizada por 15 minutos.

Foi construída uma curva analítica com Trolox cuja metodologia e detalhes de preparo estão apresentados no Apêndice A.

Para determinação da capacidade antioxidante, foram realizados os cálculos descritos a seguir. Primeiramente, foi necessário calcular a porcentagem de desativação frente ao branco, determinada pela Equação 4:

$$\%D_B = \left(\frac{Abs_{Bi} - Abs_{Bf}}{Abs_{Bi}} \right) \times 100 \quad (4)$$

em que $\%D_B$ representa a porcentagem de desativação do $ABTS^{*+}$ pelo branco, Abs_{Bi} é a absorvância inicial do branco, e Abs_{Bf} a absorvância final do branco. Na sequência, foi calculado a porcentagem de desativação do $ABTS^{*+}$ corrigida pela amostra:

$$\%D_{Ac} = \left(\left(\frac{Abs_{Ai} - Abs_{Af}}{Abs_{Ai}} \right) \times 100 \right) - \%D_B \quad (5)$$

em que $\%D_{Ac}$ representa a porcentagem de desativação do $ABTS^{*+}$ corrigida pela amostra, Abs_{Ai} é a absorvância inicial da amostra e Abs_{Af} a absorvância final da amostra. De forma a obter o valor da capacidade de desativar o $ABTS^{*+}$ em equivalente Trolox, $CDABTS^{*+}_{ET}$ ($\mu\text{mol} / \text{L}$ de extrato), utilizou-se a Equação 6:

$$CDABTS^{*+}_{ET} \frac{\mu\text{mol}}{\text{L de extrato}} = \left(\frac{\%D_A - b}{a} \right) \times FD \quad (6)$$

em que b representa o coeficiente linear da curva analítica Trolox, a é o coeficiente angular da curva analítica Trolox, e FD é o fator de diluição.

A capacidade de desativar o radical $ABTS^{*+}$ em equivalente Trolox por g de sucupira, $CDABTS^{*+}_{ET}$ ($\mu\text{mol} / \text{g}$ de sucupira), foi calculada utilizando a Equação 7:

$$CDABTS_{ET}^{*\bullet+} \left(\frac{\mu mol}{g \text{ de sucupira}} \right) = \left(\frac{CDABTS_{ET}^{*\bullet+} \left(\frac{\mu mol}{L \text{ de extrato}} \right) \times V_{Sol}}{1000 \times P_{Suc}} \right) \quad (7)$$

em que V_{Sol} representa o volume total da solução solvente de etanol e água utilizada no processo de extração, e P_{Suc} representa a quantidade de sucupira pesada e utilizada no processo de extração.

4.5.3 Capacidade redutora

A capacidade redutora foi determinada pelo método Folin-Ciocalteu com adaptações. Para realização dessa análise, foi utilizado ácido gálico, reagente Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio e água ultrapura.

Em tubos Falcon foi adicionado 850 μ L de água destilada, 200 μ L do extrato analisado na diluição adequada e 100 μ L de Folin-Ciocalteu. Em seguida, foi feita a agitação e adição de 850 μ L da solução de carbonato de sódio (7%) em um período de 30 s a 8 min. Nova agitação foi feita e a solução seguiu para repouso por 1 h a 25 °C sob proteção de luz. Enfim, foi medida a absorbância de cada solução a 765 nm. O fator de diluição variou entre os extratos para que fosse obtido valores na faixa de 0,200 a 0,800 de absorbância.

4.5.4 Cor

A análise de cor foi feita utilizando o colorímetro ColorQuest XE (modelo A60-1011-610, HunterLab, EUA). A leitura foi realizada no modo RSIN (*Reflectance Specular Included*), tendo sido a escala CIELAB (L^* , a^* , b^*).

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS para avaliar o efeito do processamento ultrassônico quanto a microestrutura da sucupira pré e pós processamento no ponto otimizado. As amostras foram previamente submetidas à liofilização (modelo LS 6000, Terroni, Brasil) e embaladas a vácuo. As amostras foram depositadas sob fita de carbono anexadas em *stubs* e fixadas. Para aprimorar a condutividade, o conjunto seco foi submetido a metalização realizada no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS, utilizando o revestidor modelo Q 150R ES Plus, Quorum, UK. Foi aplicado 0,1 nm de ouro em 1 minuto e 30 segundos resultando em uma espessura final de 0,29 nm.

4.7 Caracterização do óleo extraído na condição otimizada

4.7.1 Atividade antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana foram executadas no Laboratório de Microbiologia e Higiene de Alimentos (ICTA, UFRGS, Porto Alegre, Brasil).

Devido à presença de etanol nos extratos (que interferem na análise microbiológica por exercer atividade antimicrobiana), foi necessário aplicar procedimentos para reduzir a sua concentração nas amostras. Essa redução foi realizada considerando os dados apresentados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos. A faixa de concentração alcóolica de 60 a 90% inibe a grande maioria das bactérias, vírus e fungos (para fins de desinfecção). Para *E. coli* e *Salmonella*, os melhores valores de concentração são de 40 a 100%. Para *S. aureus*, o melhor valor de concentração é de 60 a 95% (CDC, 2008). Uma concentração de 20% é compreendida como não impedindo crescimento bacteriano, enquanto 10% causa quase nenhum efeito de inibição (Sissons et al., 1996).

Dessa forma, estudou-se a aplicação de dois tratamentos para reduzir a concentração de álcool a níveis insignificantes para a análise. O primeiro tratamento consistiu na remoção

parcial do álcool por rotaevaporação (37 °C) por 8 minutos, seguida de decantação à temperatura ambiente pelo período de 5 dias em capela, atingindo volume final de 10 mL. O tratamento 2 consistiu na remoção quase total do etanol somente por rotaevaporador (37 °C) por 16 minutos, atingindo volume final de 6,5 mL. A Tabela 10 resume os tratamentos aplicados em cada amostra e a concentração de cada um dos extratos testados na análise da atividade antimicrobiana.

Tabela 10 - Codificação das amostras para análise da atividade antimicrobiana após os tratamentos de remoção de álcool.

| Tratamento 1 | | Tratamento 2 | |
|---|--|--|---|
| Remoção parcial do álcool por rotaevaporação por 8 min + decantação | | Remoção a nível insignificante do álcool por rotaevaporação por 16 min | |
| BT1 | Branco (solução água + etanol) | BT2 | Branco (solução água + álcool) |
| ET1-05 | Extrato com concentração de 0,05 g/mL da sucupira (concentração padrão inicial sem evaporação) | ET2-10 | Extrato com concentração de 0,1 g/mL da sucupira (concentração padrão inicial sem evaporação) |
| ET1-10 | Extrato com concentração de 0,1 g/mL da sucupira (dobrada em relação ao padrão) | ET2-20 | Extrato com concentração de 0,2 g/mL da sucupira (dobrada em relação ao padrão) |
| ET1-15 | Extrato com concentração de 0,15 g/mL da sucupira (tripla em relação a padrão) | - | - |

Culturas bacterianas

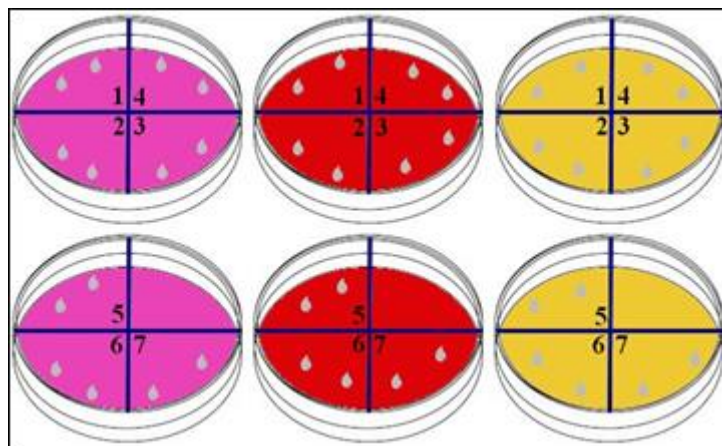
Foram utilizados três *pools* bacterianos, cada um contendo três cepas. O *pool Salmonella* foi formado por *S. Enteritidis* SE86 (isolado de surto de origem alimentar), *S. Minnesota* 7301007 e *S. Heidelberg* 22295 (ambos isolados de abatedouros de frango). O *pool Escherichia coli* foi formado por *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 8739 e *E. coli* DH5- α (todas isoladas de surtos de origem alimentar), e o *pool Staphylococcus aureus* foi formado por *S. aureus* ATCC 19095, *S. aureus* S6 e *S. aureus* S8. Todas as cepas foram obtidas da coleção de cultura bacteriana do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA, UFRGS, Porto Alegre, Brasil). As cepas foram cultivadas separadamente em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37 °C por 18 h em condições aeróbias.

Para o teste *in vitro*, cada suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração de 8 log UFC/mL por meio de diluições em caldo BHI a uma densidade óptica (OD_{630nm}) de aproximadamente 0,5 em um espectrofotômetro UV-Vis (BEL Engineering®, modelo M51, Monza, IT) de acordo com metodologia preconizada pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Em seguida, as cepas de *Salmonella* foram misturadas (3 mL de cada) formando um *pool* (9 mL no total). A mesma técnica foi repetida para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*. Os *pools* bacterianos (8 log UFC/mL) foram diluídos até uma concentração de 5 log UFC/mL, imediatamente antes de cada ensaio.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos, foram utilizadas 6 placas com os meios de cultura pré-preparadas (ágar *xilose lisina desoxicolato* (XLD) para *Salmonella*, *violet red libe* (VRB) para *E. coli* e *Baird-Parker* (BP) para *S. aureus*). Os *pools* bacterianos ajustados a 5 log UFC/mL foram inoculados nas placas através da técnica de semeadura em espalhamento, e cada placa foi visualmente dividida em quatro para aplicação das amostras (extratos), sendo aplicado duas gotas de amostra (0,20 μ L cada uma) em cada quadrante distante uma das outras (Heller e Spence, 2019). A Figura 10 ilustra esse procedimento. Após a aplicação dos extratos, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 16 a 18h.

Figura 10 - Representação da aplicação das amostras nas placas de Petri para o teste de sensibilidade a antimicrobianos (1 a 7 representando, respectivamente, BT1, ET1-05, ET1-10, ET1-15, BT2, ET2-10 e ET2-20).



Concentração inibitória mínima

Os testes da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados para as amostras BT1, ET1-05, ET1-10, ET1-15, BT2, ET2-10 e ET2-20. A análise foi realizada para cada um dos três *pools* de inoculação bacteriana (*Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus*) ajustados para 5 UFC/mL, utilizando o método de microdiluição colorimétrica em microplaca de 96 poços, conforme proposto por Veiga et al., (2019), com modificações. A concentração do extrato (ponto ótimo do planejamento) foi determinada como sendo 0,1 g/mL de sucupira. Ao todo, foram testadas as concentrações de 0,05, 0,1, 0,15 e 0,2 e g/mL de sucupira (como elencado na Tabela 10). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18h. O esquema de preparo das microplacas está presente no Apêndice D.

A verificação do crescimento microbiano foi realizada com o corante resazurina (sódio;10-oxido-7-oxofenoxazin-10-io-3-olato), de fórmula $C_{12}H_6NNaO_4$ e massa molecular 251,17. A solução com o corante (0,015%) foi preparada dissolvendo 0,015 g em água, utilizando filtro estéril (0,22 μ m) e armazenada a 4 °C.

Após a incubação das microplacas de 96 poços, 20 μ L de solução de resazurina foi adicionado a todos os poços. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 2 h. Na sequência, foi observado se a coloração da solução no poço ficou vermelha, o que indica crescimento microbiano. A CIM é determinada como a menor concentração das soluções que inibem o crescimento microbiano, ou seja, que não apresentam alterações de cor nas soluções dos poços (Veiga et al., 2019).

4.7.2 Caracterização química

A caracterização química do extrato hidroalcolico no ponto ótimo de extração e da sucupira foi feita através de análises de cromatografias líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massas. Além disso, foram realizadas análise as de índice de peróxidos e dienos e trienos conjugados.

Índice de peróxidos

A análise do índice de peróxido foi executada para o extrato obtido no ponto ótimo, seguindo a metodologia da AOAC. Para realização dessa análise, foi necessário padronizar a solução de tiosulfato de sódio 0,1N conforme protocolo descrito no Apêndice A.

Para realização da técnica, 5,0 g da amostra foi pesada em Erlenmeyer de 250 mL e foi adicionado 30 mL da mistura de ácido acético:clorofórmio (3:2) até a dissolução. Na sequência, acrescentou-se 0,5 mL da solução saturada de iodeto de potássio e, após agitação ocasional por 1 min, o sistema foi mantido sob proteção de luz por 5 mins. Posteriormente, foi adicionado 30 mL de água destilada e 1,0 mL da solução aquosa de amido 1%. Por fim, a titulação foi feita utilizando o tiosulfato de sódio 0,1 N até o desaparecimento da coloração azul. O índice de peróxidos foi calculado através da Equação 8:

$$\text{Índice de peróxido} \left(\frac{\text{meq}}{1000\text{g de amostra}} \right) = \frac{(V_{SA} - V_{SB}) \times N \times f \times 1000}{P} \quad (8)$$

em que V_{SA} é o volume em mL da solução de $\text{Na}_2\text{SO}_2\text{O}_3$ gasta para a amostra, V_{SB} é o volume em mL da solução de $\text{Na}_2\text{SO}_2\text{O}_3$ gasta para o branco, N é a normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{SO}_2\text{O}_3$, P é o peso em gramas da amostra, e f é o fator de correção da solução de tiosulfato de sódio 0,1N.

Dienos e trienos conjugados

A determinação de dienos e trienos conjugados foi realizada seguindo o método espectrofotométrico IUPAC número II.D.23. Para tanto, foi pesado 0,25 g da amostra em balão volumétrico de 25 mL, seguido da adição de 5 mL de isoocatano para diluição. O volume do balão foi completado, uma alíquota foi transferida para cubeta de quartzo, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 270 nm para os trienos. No caso dos dienos, foi preciso diluição adicional. Dessa forma, o processo foi feito utilizando balão de 10 mL, e a leitura foi realizada a 232 nm. A determinação de dienos e trienos é expressa como extinção específica $E_1^{1\%}$ (extinção da solução de 1% do óleo em um solvente específico com uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm) convencionalmente indicado por K :

$$E_1^{1\%} = K_\lambda = \frac{E_\lambda}{c \times s} \quad (9)$$

em que K_λ é a extinção específica no comprimento de onda, E_λ é absorvância medida no comprimento de onda, c é concentração da solução, e s é o caminho óptico da cubeta.

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A amostra da sucupira e o extrato hidroalcolólico obtido no ponto ótimo foram analisadas quanto à composição química utilizando cromatografia gasosa multidimensional acoplada à espectrometria de massas (MDGC/GCMS-2010).

O preparo das amostras consistiu na realização de extração pelo método de Bligh & Dyer e posterior derivatização. Para tanto, foi pesado 5 g da amostra/extrato em frasco, adicionado 20 mL de MeOH, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água destilada. Na sequência, as amostras foram agitadas por 30 min em agitador magnético. Após, 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de Na_2SO_4 (10%) foram adicionados, e a mistura foi agitada por mais 2 min. A mistura foi filtrada e rotaevaporada (como descrito no item 3.5.1). Após a secagem, as amostras foram armazenadas em freezer até a esterificação. A derivatização foi realizada com a ressuspensão em 1 mL de heptano e agitação em vortex por 3 min. Posteriormente, foi adicionado 100 μL de solução metanólica de hidróxido de potássio 2 N, seguido de agitação. Após a separação de fases, a fase superior foi transferida para um vial. Uma diluição de cinco vezes foi realizada apenas na amostra sólida (pó da sucupira).

A análise foi realizada pelo sistema cromatográfico gasoso multidimensional (MDGC/GCMS-2010, Shimadzu). Na primeira dimensão, foi utilizada uma coluna CP-Wax 57 CB (50 m, 0,25 mm, 0,20 μm), usando Hélio como gás de arraste com uma taxa de fluxo de 1,20 mL/min e temperatura do injetor de 210 °C. A coluna foi programada com uma temperatura inicial de 40 °C (por 4 min), seguido de um aumento de 10 °C/min até 150 °C (por 45 min) e após um aumento de 4 °C/min até 190 °C (por 50 min). Na segunda dimensão foi utilizada a coluna Stabilwax (60 m, 0,25 μm , 0,25 mm). A coluna foi programada com uma temperatura inicial de 40 °C (por 4 min), seguido de um aumento de 10 °C/min até 100 °C (por 45 min), e um aumento de 5 °C/min até 190 °C (por 47 min). As condições de MS foram: detector de íons quadrupolo, velocidade de varredura 1.000 e faixa m/z entre 28 a 300. A identificação dos compostos foi realizada comparando a fragmentação dos espectros de massa,

comparações com a base de dados do sistema de análise (sendo considerado apenas os espectros com índice de igual similaridade ou maior que 95%) e comparações com a literatura.

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

A amostra da sucupira e o extrato hidroalcoólico obtido no ponto ótimo da extração também foram analisados quanto à composição química utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos acoplada com espectrometria de massa de tempo de voo quadrupolo (HPLC-q-ToF-MS, do inglês *high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry*).

Para o extrato alcoólico, foi realizada apenas a remoção de proteínas e material particulado, sem purificação pela extração em fase sólida. Para tanto, foi transferido cerca de 1.500 µL do extrato para eppendorfs (2 alíquotas), que foram congelados em freezer -20 °C por 20 min e, posteriormente, centrifugados a 12.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana PVDF 0,22 µm diretamente para um vial.

A amostra da sucupira passou por uma extração exaustiva. Uma quantidade de 0,1 g amostra foi misturada com 1 mL de uma mistura de metanol e água (MeOH:H₂O 8:2, v/v) acidificada com ácido fórmico 0,35%. Essa mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos e centrifugada a 13,4 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi removido (Rodrigues et al., 2013). Esse procedimento foi repetido seis vezes. Para verificar quantas re-extrações seriam necessárias para extração exaustiva dos compostos, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu adaptado. **Brevemente, uma alíquota de 0,1 mL do extrato foi transferida para um balão volumétrico de 2,5 mL juntamente com 0,9 mL de água e 0,1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, agitado manualmente e deixado em repouso por 4 min. Um total de 1 mL da solução de água e Na₂CO₃ (7%) foi adicionado ao balão e o volume foi aferido com água.** Os extratos obtidos foram combinados, congelados (remoção de proteínas), centrifugados e filtrados (PTFE hidrofílico, 0,22 µm).

A análise foi realizada usando um cromatógrafo líquido de alta performance (Shimadzu, Kyoto, Japão), conectado em série a um detector DAD (*diode array detector*) (SPD-M20A) e a um espectrômetro de massa (MS) com tempo de voo quadrupolo (Q-ToF) (do inglês, *quadrupole time of flight*). Foram utilizadas duas fontes de ionização: ionização por

eletrospray (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI) (Bruker Daltonics, modelo microOTof-Q III, Bremen, Alemanha).

As condições cromatográficas utilizadas para a separação dos compostos foram previamente descritas por Rodrigues et al., (2013), com modificações. Os compostos foram separados em uma coluna Synergi Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 4 μ m, Phenomenex, Torrance, CA) a 0,5 mL min⁻¹ a 35 °C, usando como fase móvel um gradiente linear de água:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v, solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v, solvente B). Os espectros UV-vis foram obtidos entre 200 e 900 nm, e os cromatogramas foram processados em 280, 320, 360 e 520 nm. O controle dos instrumentos e o processamento dos dados foram realizados com os softwares Esquire Control e Data Analysis 4.3, respectivamente (Bruker Daltonik).

Os seguintes parâmetros foram utilizados para a fonte ESI: faixa de varredura m/z 50 a 1.000, fonte nos modos negativo e positivo, tensão capilar de 4.000 V (positivo) ou -3.500 V (negativo), temperatura do gás de secagem (N₂) de 310 °C, vazão de 8 L/min e pressão do gás nebulizador de 4 bar. A fragmentação dos compostos foi realizada no modo automático com um limite de 1.500 contagens e a definição de três íons precursores. Para a fonte APCI, os parâmetros foram os seguintes: modo positivo, corona de corrente de 4.000 nA, temperatura da fonte de 450 °C, temperatura do gás seco (N₂) de 350 °C, vazão de 4 L/min e pressão do gás do nebulizador de 5 bar. Os espectros de massa foram adquiridos com faixa de varredura m/z de 100 a 2.200.

A identificação dos compostos foi realizada a partir dos espectros de MS e MS₂, analisados manualmente, considerando os seguintes parâmetros: massa precisa, padrão de fragmentação, ordem de eluição na coluna C18 e características de absorção UV-vis. Essas informações foram comparadas com os resultados de padrões dos compostos fenólicos e dados da literatura. Além disso, foi utilizada a biblioteca MassBank of North America (MoNA).

4.8 Análises estatísticas

Sempre que necessários, os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), teste *t-student* e teste de Tukey (95% de confiança) usando o software *Statistica* 13.5 (TIBCO Software Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente trabalho. Inicialmente, é apresentada a caracterização da sucupira. Na sequência, são apresentados os resultados das análises realizadas na execução do planejamento fatorial e, por fim, aqueles referentes ao extrato obtido nas condições otimizadas.

5.1 Composição da sucupira

Os resultados da análise centesimal da sucupira estão apresentados na Tabela 11. Observa-se que a sucupira apresenta um valor baixo de umidade e altos teores de carboidratos e lipídeos. Os valores encontrados são próximos aos relatados por Neto (2015): 0,64%, 22,85%, 2,96% e 64,34% para cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, respectivamente. A umidade, por outro lado, apresentou um valor menor, 6,08%. As diferenças encontradas estão associadas intrinsecamente à origem do fruto, abrangendo questões como sazonalidade, plantio e coleta.

Tabela 11 - Composição centesimal da sucupira.

| Parâmetros | Valor (g/100 g de sucupira) |
|-------------------|------------------------------------|
| Umidade | 9,39 ± 0,07 |
| Cinzas | 0,37 ± 0,03 |
| Lipídios | 23,38 ± 0,27 |
| Proteínas | 3,87 ± 0,25 |
| Carboidratos | 62,98 |

Como já relatado na literatura, observa-se que a sucupira é uma fonte rica em lipídeos, que, por sua vez, garantem o transporte de vitaminas ao organismo, contribuem na composição e formação de hormônios específicos e membranas de células nervosas, além de serem fonte de energia e atuarem como protetores térmicos ao organismo (Lemmens et al., 2014). No óleo da sucupira são encontrados diversos compostos da família dos terpenos que possuem uma grande

diversidade estrutural. Os mais comuns são os diterpenos e os sesquiterpenos que são responsáveis pela maior parte das atividades biológicas atribuídas à sucupira, como atividade anti-inflamatória, carcinogênica, entre outras (Duarte, 2008). Uma abordagem aprofundada dessa composição é encontrada no item 5.5.3 referente a caracterização química.

5.2 Extração assistida por ultrassom de compostos de interesse da sucupira

A Tabela 12 apresenta os valores de teor de lipídeos, cor, capacidade antioxidante e capacidade redutora para os experimentos do planejamento fatorial. Foi avaliada a influência da intensidade do ultrassom (%) e da concentração de etanol (%) no processo de extração de compostos de interesse da sucupira.

Como pode ser observado na Tabela 12, o teor máximo de lipídeos (27,23 g/100 g) foi obtido utilizando a concentração de etanol de 90% e amplitude do US de 60%. Por outro lado, o maior valor da capacidade antioxidante (47,35 $\mu\text{mol/g}$) foi encontrado utilizando a concentração de etanol de 70% e amplitude do US de 90%. A cor teve maior intensidade (90,71 h°) quando foi utilizada concentração de etanol de 84% e amplitude do US de 81%. Por sua vez, o maior índice de capacidade redutora (1,42 mg EAG/g) foi obtido utilizando concentração de etanol de 90% e amplitude do US de 60%.

Tabela 12 - Resultados do planejamento fatorial completo composto central de 2² para extração de compostos de interesse da sucupira utilizando US.

| | Variáveis independentes | | | | Variáveis dependentes | | | |
|------|-------------------------|----------------|--------|---------|-----------------------|----------------|-----------|-----------------|
| | Codificadas | | Reais | | | | | |
| Exp. | X ₁ | X ₂ | CE (%) | IUS (%) | TL (g/100g) | CA (μmol/g) | C (h°) | CR (mgEAG/g) |
| 1 | -1 | -1 | 56 | 39 | 6,47 | 20,45 | 83,27 | 0,47 |
| 2 | -1 | 1 | 56 | 81 | 9,17 | 40,94 | 77,51 | 0,75 |
| 3 | 1 | -1 | 84 | 39 | 22,45 | 22,70 | 90,66 | 0,66 |
| 4 | 1 | 1 | 84 | 81 | 26,67 | 27,10 | 90,71 | 0,76 |
| 5 | 0 | 0 | 70 | 60 | 17,34 | 31,15 | 85,76 | 0,98 |
| 6 | 0 | 0 | 70 | 60 | 15,79 | 24,92 | 85,13 | 1,19 |
| 7 | 0 | 0 | 70 | 60 | 12,81 | 24,49 | 85,03 | 1,08 |
| 8 | 0 | -1,41 | 70 | 30 | 10,49 | 12,03 | 87,91 | 0,62 |
| 9 | 0 | 1,41 | 70 | 90 | 23,22 | 47,35 | 82,77 | 1,29 |
| 10 | -1,41 | 0 | 50 | 60 | 5,43 | 38,25 | 82,43 | 0,65 |
| 11 | -1,41 | 0 | 90 | 60 | 27,23 | 14,37 | 90,37 | 1,42 |
| 12 | 0 | 0 | 70 | 60 | 15,20 | 29,51 | 87,38 | 1,32 |

CE: concentração de etanol (%); IUS: intensidade do ultrassom; TL: teor de lipídeos; CA: capacidade antioxidante, C: cor, ângulo hue; CR: capacidade redutora.

A Tabela 13 aponta os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações sobre as variáveis de resposta, além da significância estatística (p) e os coeficientes do modelo reduzido. Observa-se que os fatores lineares das variáveis CE (L) e IUS (L) foram significativos para o teor de lipídeos, a capacidade antioxidante e a cor. A capacidade redutora, por sua vez, não sofreu influência significativa quanto à intensidade do US e à concentração de etanol. Além disso, não foram observados efeitos quadráticos e de interação significativos.

Tabela 13 - Magnitude dos efeitos dos fatores sobre teor de lipídeos, capacidade antioxidante, cor e capacidade redutora e os coeficientes do modelo reduzido.

| Teor de lipídeos | | | | |
|--------------------------------|---------|--------|---------------|-------------------------|
| Fatores | Efeito* | p | Coeficiente** | Desvio-padrão (coefic.) |
| Média | 15,29 | < 0,01 | 16,00 | 0,54 |
| CE (L) | 16,10 | < 0,01 | 8,05 | 0,66 |
| CE (Q) | 0,84 | 0,64 | - | - |
| IUS (L) | 6,24 | 0,01 | 3,12 | 0,66 |
| IUS (Q) | 1,37 | 0,45 | - | - |
| IUS x CE | 0,76 | 0,73 | | |
| Cor | | | | |
| Média | 85,83 | < 0,01 | 85,74 | 0,48 |
| CE (L) | 7,97 | < 0,01 | 3,98 | 0,58 |
| CE (Q) | 0,41 | 0,75 | - | - |
| IUS (L) | -3,25 | 0,03 | -1,62 | 0,58 |
| IUS (Q) | -0,66 | 0,62 | - | - |
| IUS x CE | 2,90 | 0,12 | | |
| Capacidade antioxidante | | | | |
| Média | 27,52 | < 0,01 | 27,77 | 2,69 |
| CE (L) | -11,35 | 0,02 | -5,67 | 1,91 |
| CE (Q) | -1,32 | 0,77 | - | - |
| IUS (L) | 18,73 | < 0,01 | 9,37 | 1,91 |
| IUS (Q) | 2,08 | 0,64 | - | - |
| IUS x CE | -8,04 | 0,19 | -4,02 | 2,69 |
| Capacidade redutora | | | | |
| Média | 1,15 | < 0,01 | - | 0,13 |
| CE (L) | 0,32 | 0,14 | - | 0,09 |
| CE (Q) | -0,27 | 0,25 | - | 0,11 |
| IUS (L) | 0,33 | 0,13 | - | 0,09 |
| IUS (Q) | -0,35 | 0,15 | - | 0,11 |
| IUS x CE | -0,09 | 0,75 | - | 0,13 |

*Efeitos significativos ($p < 0,05$); **os coeficientes do modelo foram obtidos para o modelo reduzido.

Na Tabela 13 também são apresentados os coeficientes do modelo proposto para representar os dados obtidos através da extração via US, dentro dos limites de intensidade e concentração de etanol avaliados. Como a capacidade redutora não apresentou efeitos significativos, nenhum modelo pôde ser ajustado para essa variável. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo reduzido, a um nível de confiança de 95%. A análise demonstrou que o modelo apresentou regressão significativa em relação ao teor de lipídeos, cor e capacidade antioxidante, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,80 (Tabela 14). O coeficiente de determinação retrata o quanto o modelo explica a variação dos dados observados. Por exemplo, para o teor de lipídeos, o modelo explica 94,99% dos dados observados. Para a cor e a capacidade antioxidante, o modelo explica 85,77% e 84,59%, respectivamente.

Tabela 14 - Valores de $F_{\text{calculado}}$, F_{tabelado} e coeficiente de determinação (R^2) para as variáveis de resposta estudadas.

| Parâmetro | $F_{\text{calculado}}$ | F_{tabelado} | Coefficiente de determinação (R^2) |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|--|
| Teor de lipídeos | 85,37 | 4,26 | 0,9499 |
| Cor | 26,53 | 4,26 | 0,8577 |
| Capacidade antioxidante | 15,08 | 4,07 | 0,8459 |

Os erros médios (calculados pela Equação 2) obtidos na estimativa do teor de lipídeos, cor e capacidade antioxidante foram de 10,96%, 16,88% e 1,29%, respectivamente. De acordo com Neto, Scarminio e Bruns (1995), valores de erro médio abaixo de 10% indicam um ajuste adequado para propósitos práticos.

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam as superfícies de resposta mostrando a variação do teor de lipídeos, da capacidade antioxidante e da cor, respectivamente, em função da intensidade do US (%) e da concentração de etanol (%).

Com relação ao teor de lipídeos (Figura 11), observa-se que os efeitos de ambas as variáveis são positivos, demonstrando que este aumenta à medida que a CE e a IUS aumentam. Um maior valor de IUS pode promover uma ruptura celular mais intensa devido ao fenômeno de cavitação; isso provoca uma maior liberação das substâncias intracelulares, como os lipídeos, uma vez que essas substâncias são acessadas mais facilmente pelo solvente. Esse resultado corrobora os encontrados por Quesada-Salas et al., (2021), que otimizaram a extração de

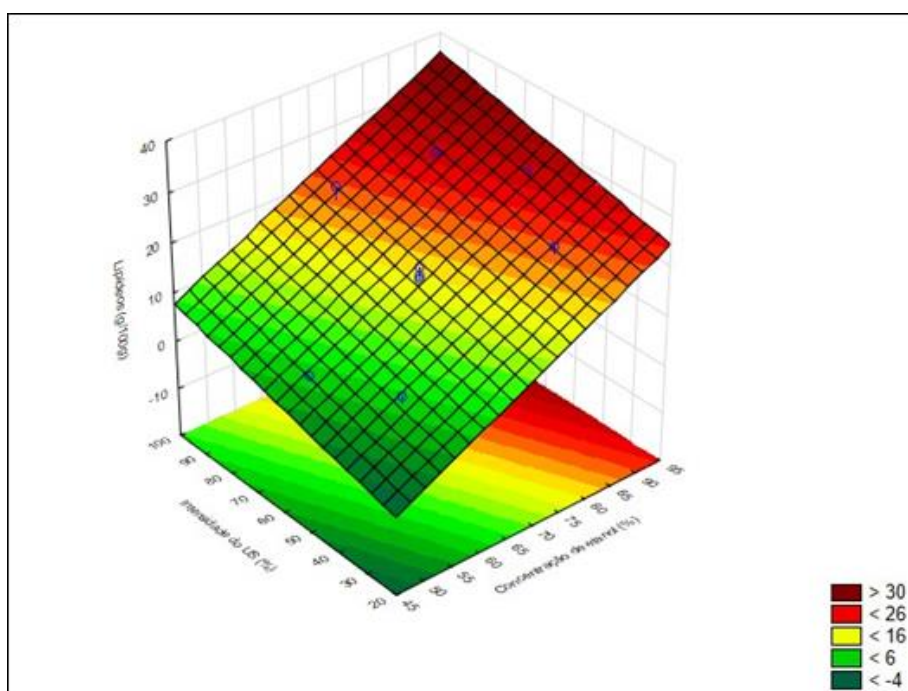
lipídeos de microalgas e reportaram que maior amplitude (IUS) propiciou uma maior extração desses compostos. Um resultado contrário foi obtido por Ido et al., (2018), o qual também avaliou o teor de lipídeos obtidos de microalgas (*Scenedesmus obliquus*); entretanto, esse comportamento distinto foi atribuído à elevada temperatura, que ocasionou a evaporação do solvente. Nesse sentido, salienta-se a importância de se trabalhar com temperaturas moderadas para, inclusive, evitar a oxidação lipídica. Nesse mesmo estudo, os autores observaram que o solvente em maior concentração também promoveu uma maior extração de lipídeos. Zhang et al., (2009), que avaliaram a EAU do óleo de almondega em pó autoclavada, e Samaram et al., (2015), que otimizaram a EAU do óleo de semente de mamão, também observaram o mesmo comportamento que pode ser explicado pelo aumento do gradiente de concentração, força motriz para a extração dos compostos.

Os estudos mencionados acima utilizaram (n)-hexano, misturas de hexano com isopropanol e misturas de clorofórmio com metanol. O hexano é muito utilizado devido ao seu baixo custo e alta solubilidade; no entanto, recentemente, outros solventes, como acetona, etanol e isopropanol, têm sido utilizados em processos de extração por serem menos agressivos ao meio ambiente (Oliveira et al., 2013; Navarro et al., 2016; Saini et al., 2021). Nenhum estudo similar utilizando a EAU específico para a sucupira foi evidenciado por não ter sido encontrado na literatura. Apenas um estudo fez uso da metodologia de superfície resposta estudando a sucupira o qual buscou a otimização não da extração, mas da incorporação do óleo em carregadores lipídicos nanoestruturados no intuito de avaliar o efeito contra o câncer colorretal (Outuki et al., 2018).

Para a capacidade antioxidante (CA) (Figura 12), os efeitos lineares das variáveis IUS e CE são positivo e negativo, respectivamente, o que mostra que a CA aumenta com o aumento da IUS e diminui com o aumento de CE. A cavitação provocada pelo ultrassom contribui para a liberação de compostos antioxidantes pois promove a ruptura celular. Em relação à CE, o seu efeito negativo está associado à polaridade dos compostos e sua afinidade com o solvente. A fração de água presente no solvente causa um inchaço da matéria-prima, o que facilita a entrada do etanol na célula, melhorando os rendimentos da extração (Both et al., 2014), principalmente no que diz respeito aos compostos polares (Galvan D'Alessandro et al., 2012), entre os quais destacam-se o geraniolgeraniol e os compostos vouacapânicos na sucupira (Spindola et al., 2010). Misturas etanol-água possibilitam uma maior de extração de compostos uma vez que a polaridade do solvente desempenha um papel fundamental para solubilização dos compostos. Trabalhos anteriores relataram que esse tipo de mistura permite a solubilização de compostos

hidrofílicos e hidrofóbicos, permitindo assim uma maior concentração de fenóis de ambas as naturezas nos extratos (Luo et al., 2018; Odabaş e Koca, 2016).

Figura 11 - Teor de lipídeos em função da concentração de etanol (%) e da intensidade do US (%).

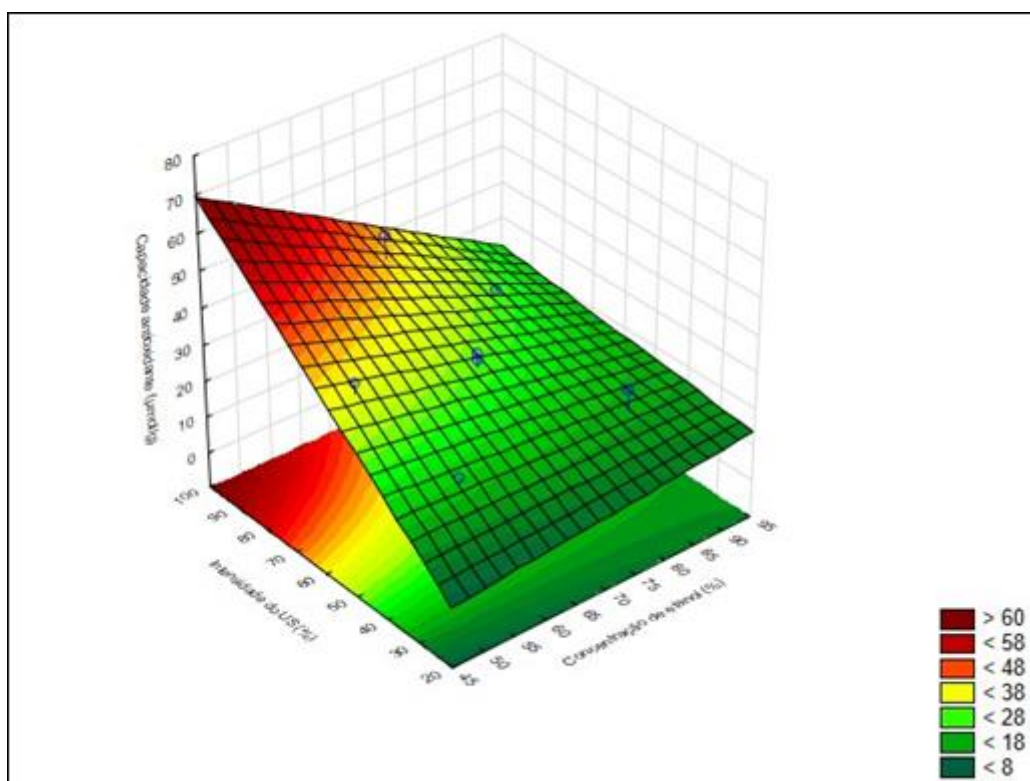


Um ponto importante a ser ressaltado é que o ensaio ABTS foi utilizado no presente trabalho com o intuito de mensurar os compostos que reagem o radical $ABTS^{+\cdot}$ [ácido 2,2-azino-bis (ácido etilbenzeno-tiazolina-6-sulfônico)] nos extratos obtidos sob diferentes condições de extração. Não se objetivou avaliar a capacidade antioxidante biológica conferida por esses extratos e sim avaliar como as diferentes condições empregadas afetam a extração de compostos com capacidade antioxidante. O princípio básico desse ensaio envolve a capacidade do antioxidante em neutralizar o radical $ABTS^{+\cdot}$. É um método que utiliza o mecanismo SET (do inglês, *single electron transfer*), ou seja, envolve uma reação redox (redução-oxidação) com um oxidante (também conhecido como sonda ou radical) como um indicador do ponto final da reação (Pellegrini et al., 2003).

Ensaio como o ORAC (do inglês *oxygen radical absorbance capacity*) apresentam o mecanismo HAT (do inglês, *hydrogen atom transfer*), ou seja, há a geração de radicais através do composto/sonda oxidável e um antioxidante. Por utilizarem um radical biologicamente mais

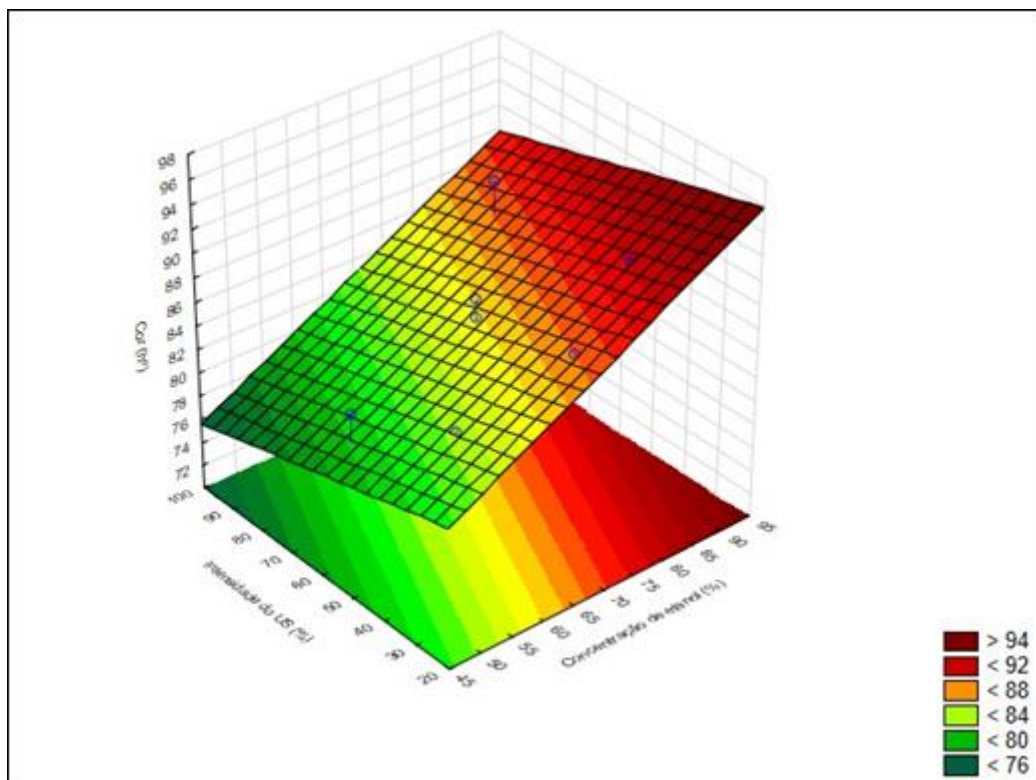
importante no corpo humano, como o peróxido, são considerados mais pertinentes para a melhor compreensão do efeito no organismo. Desta maneira, segue como sugestão para trabalho futuro de modo a melhor entender o efeito no organismo.

Figura 12 - Capacidade antioxidante em função da concentração de etanol (%) e da intensidade do ultrassom (%).



Em relação à cor (Figura 13), o efeito linear da variável CE é positivo, traduzindo em uma cor amarela mais viva e intensa com o aumento da CE. Por outro lado, o efeito linear da variável IUS é negativo, havendo, portanto, uma diminuição da cor com o aumento da IUS. Uma cor mais escura em amostras de óleo pode indicar maior teor de ácidos graxos livres e polares (parâmetro de qualidade), enquanto que uma coloração amarela avermelhada pode indicar alto teor de carotenoides (Shao et al., 2015). Na literatura há poucos estudos que avaliaram o teor de carotenoides da sucupira. Por exemplo, Costa-Singh e Jorge, (2019) encontraram valores de $9,84 \pm 0,16$ a $12,97 \pm 0,16$ $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno, entretanto nesse estudo não foi utilizado a EAU e sim as extrações por Soxhlet e Bligh & Dyer.

Figura 13 - Cor em função da concentração de etanol (%) e da intensidade do ultrassom (%).

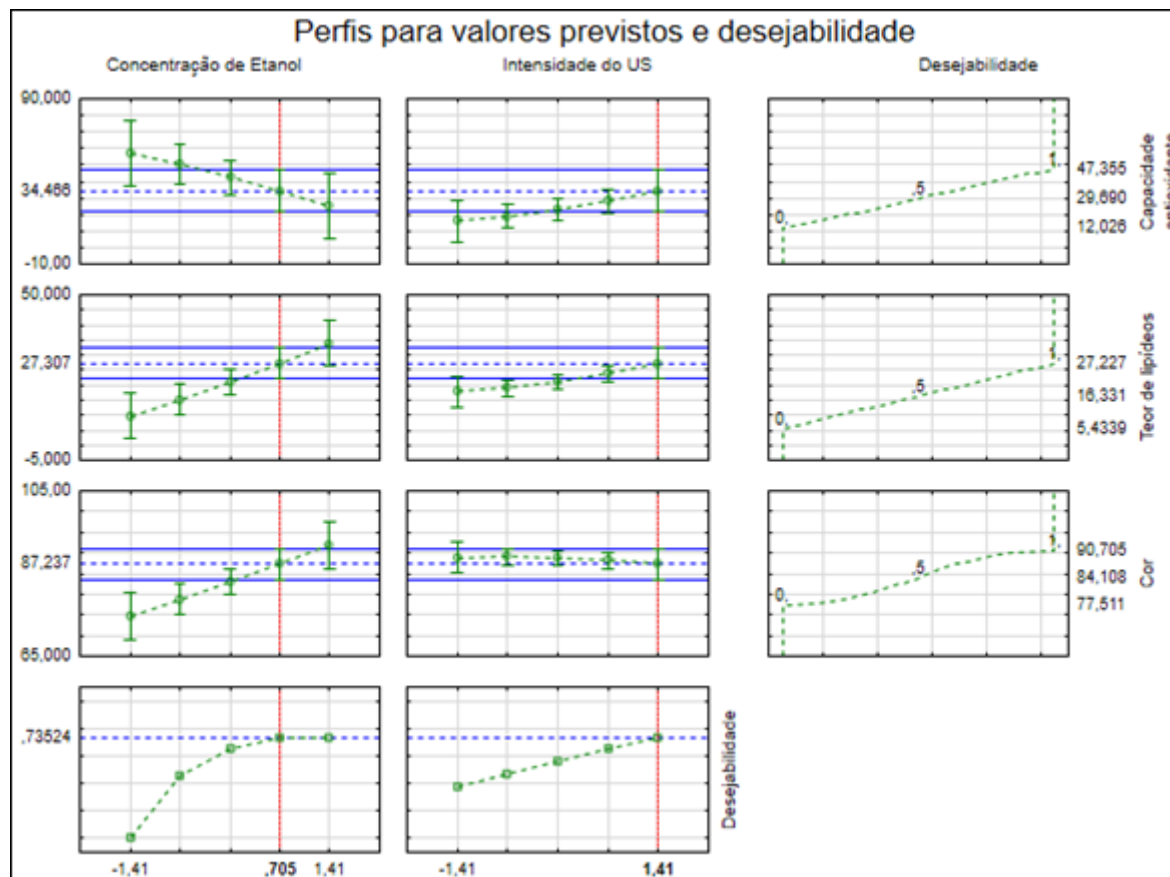


5.3 Otimização das variáveis de extração

Após a realização do planejamento fatorial, foi realizada uma otimização multialvo com o objetivo de maximizar o teor de lipídeos, a capacidade antioxidante e a cor simultaneamente. Para tanto, foi utilizada a função “*desirability*”, que combina o valor desejável de cada resposta para dar desejabilidade geral usando média geométrica (Derringer e Suich, 1980). A Figura 14 apresenta os valores de teor de lipídeos, capacidade antioxidante e cor máximos otimizados: 27,227 g/100g, 47,355 $\mu\text{mol/g}$ e 90,705 h°, respectivamente. A condição para obtenção do extrato no ponto otimizado se deu utilizando CE de 80% e IUS de 90%.

Essas condições foram validadas experimentalmente onde foi obtido o valor de 26,91 g/100g, 21,12 $\mu\text{mol/g}$ e 84,77 h° para o teor de lipídeos, capacidade antioxidante e cor, respectivamente. Analisando os valores obtidos pela função de otimização com os valores observados experimentalmente, verifica-se uma diferença de 1,51%, 63,22% e 2,9%.

Figura 14 - Otimização da intensidade de ultrassom e da concentração de etanol a fim de maximizar o teor de lipídeos, a capacidade antioxidante e a cor.



Esse valor de teor de lipídeos encontrado no ponto otimizado foi comparado com a extração realizada por dois métodos convencionais: método de Soxhlet e método de Bligh & Dyer. A Tabela 15 apresenta os valores do teor de lipídeos encontrados por esses três métodos de extração. Observa-se que o método de EAU proporcionou uma maior extração de lipídeos quando comparado com a metodologia de Soxhlet e uma quantidade igual estatisticamente ao método de Bligh & Dyer. É possível que os solventes utilizados estejam relacionados ao resultado observado. Na EAU e no método de Bligh & Dyer foi utilizado uma mistura de solventes incluindo etanol, metanol, água e clorofórmio. Enquanto isso, no método de Soxhlet foi utilizado apenas etanol, o qual é um solvente mais polar. Dessa forma, os lipídeos presentes na sucupira podem ter característica mais polar e, por isso, uma fração pode não haver sido extraída pelo método de Soxhlet.

Zaniol et al., (2020) utilizaram a EAU e a extração por fluido supercrítico, como tecnologias emergentes, e a extração por Soxhlet, como tecnologia convencional, para obtenção

de compostos diversos da sucupira. Os autores relataram que a extração convencional por Soxhlet demonstrou ser melhor em termos de rendimento global. Esse resultado é explicado devido ao uso de temperaturas elevadas que reduzem a tensão superficial e a viscosidade do solvente, permitindo o acesso de sítios ativos dentro da matriz sólida e promovendo a solubilização do soluto. Entretanto, como previamente discutido, temperaturas altas podem causar a degradação de compostos de interesse.

Tabela 15 - Teor de lipídeos obtido pelos métodos convencionais de Soxhlet e de Bligh & Dyer e pela extração assistida por ultrassom (EAU).

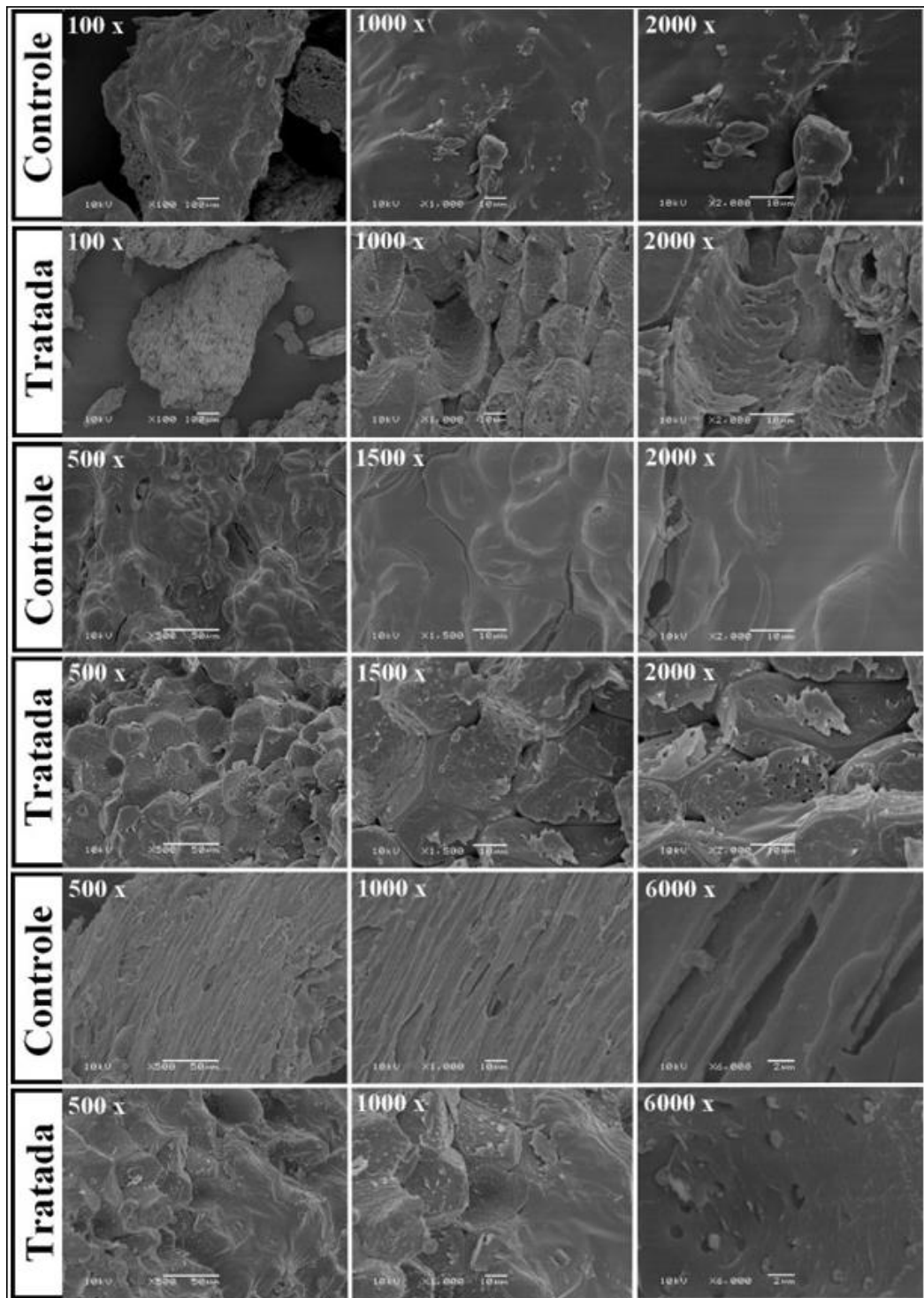
| Método | Soxhlet | Bligh & Dyer | EAU |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Teor de lipídeos (g/100g) | 23,38 ± 0,27 ^b | 25,93 ± 0,53 ^a | 26,90 ± 0,65 ^a |

No presente estudo a EAU se mostrou eficiente para extração dos lipídeos devido provavelmente aos efeitos de sonicação (cavitação) que modificam a estrutura da matriz vegetal, rompem células, liberando os compostos de interesse. A EAU possui a vantagem de ser de rápida execução e de utilizar menor quantidade de solvente, sendo esses parâmetros muito importantes para aplicação em larga escala.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias da microscopia eletrônica de varredura (MEV) referentes à amostra controle e a amostra tratada com o US estão ilustradas na Figura 15 em três ângulos diferentes para cada uma em diferentes magnitudes. Como pode ser observado, todas as amostras tratadas com US apresentaram danos físicos estruturais intensos e característicos do fenômeno de cavitação, enquanto as amostras não tratadas demonstraram superfícies sem danos. Esses resultados corroboram que a cavitação promoveu modificações estruturais que facilitaram a extração dos compostos de interesse.

Figura 15 - Micrografias de MEV da sucupira *in natura* (controle) e submetida ao tratamento ultrassônico sob três ângulos diferentes para cada amostra.



5.5 Caracterização do extrato obtido no ponto otimizado

5.5.1 Atividade antimicrobiana

O extrato de sucupira no ponto ótimo apresenta uma concentração de etanol próxima de 72% a qual está dentro dos valores que inibem o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella*. Portanto, como descrito na seção de materiais e métodos, o extrato foi submetido a dois tratamentos para remoção do etanol. O primeiro consistiu na remoção parcial do etanol por rotaevaporação (8 min), seguida de decantação. Esse extrato foi analisado nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,15 g/mL. O segundo consistiu na remoção a nível insignificante do etanol direto por rotaevaporação (16 min), com extratos sendo analisados nas concentrações de 0,1 e 0,2 g/mL. Os resultados do teste de sensibilidade e do teste da CIM referentes às 7 amostras do tratamento 1 (BT1, ET1-05, ET1-10 e ET1-15) e do tratamento 2 (BT2, ET2-10 e ET2-20) estão ilustrados na Figura 16 e na Figura 17, respectivamente.

Com relação ao teste de sensibilidade, é possível observar que o *pool* de *S. aureus* foi o mais resistente ao extrato da sucupira, não apresentando nenhum halo inibitório. Por outro lado, o extrato da sucupira causou um efeito inibitório nos *pools* bacterianos referentes à *Salmonella* e à *E. coli*. Assim, o extrato da sucupira teve maior efeito sob as bactérias gram-negativas do que sob as gram-positivas. Esse resultado é interessante, pois bactérias gram-negativas costumam apresentar maior resistência a antimicrobianos do que as bactérias gram-positivas. Esse fato está relacionado à membrana externa das bactérias gram-negativas que tornam as superfícies altamente hidrofílicas, enquanto a parede das gram-positivas apresenta uma carga negativa na superfície que pode reduzir sua resistência a compostos antibacterianos (Ultee et al., 1999). No presente estudo, portanto, é possível que o resultado observado esteja relacionado com uma maior afinidade do extrato da sucupira com a membrana celular das bactérias gram-negativas. A literatura indica que as bactérias gram-negativas são intrinsecamente resistentes a muitos compostos antimicrobianos que inibem eficazmente o crescimento de bactérias gram-positivas. Essa resistência é atribuída à baixa permeabilidade através da membrana externa, à suscetibilidade às bombas de efluxo, ou a uma combinação desses fatores (Klobucar et al., 2022). Por outro lado, as bactérias gram-positivas desenvolveram mecanismos para obterem maior resistência aos antimicrobianos, como a produção de beta-lactamases, que podem

degradar os compostos (Kang, 2022; Song, 2022). Além disso, em bactérias gram-positivas, o principal componente lipídico bacteriano, o fosfatidilglicerol, pode ser modificado quimicamente por enzimas bacterianas para converter o lipídeo da forma aniônica para a forma catiônica ou zwitteriônica. Este processo leva a níveis aumentados de resistência das bactérias contra agentes antimicrobianos policatiônicos (Epanand et al., 2016). Outro fator que pode ter contribuído para a ruptura da membrana das bactérias gram-negativas é a presença de alguns ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido láurico e o ácido palmitoléico, presentes na sucupira por difusão através da membrana bacteriana e redução do pH intracelular (Kadry et al., 2023; Lamas et al., 2019).

Figura 16 - Resultado do teste de sensibilidade aos três *pools* de bactérias referentes as 7 amostras sob o tratamento 1 (BT1, ET1-05, ET1-10 e ET1-15) e o tratamento 2 (BT2, ET2-10 e ET2-20).

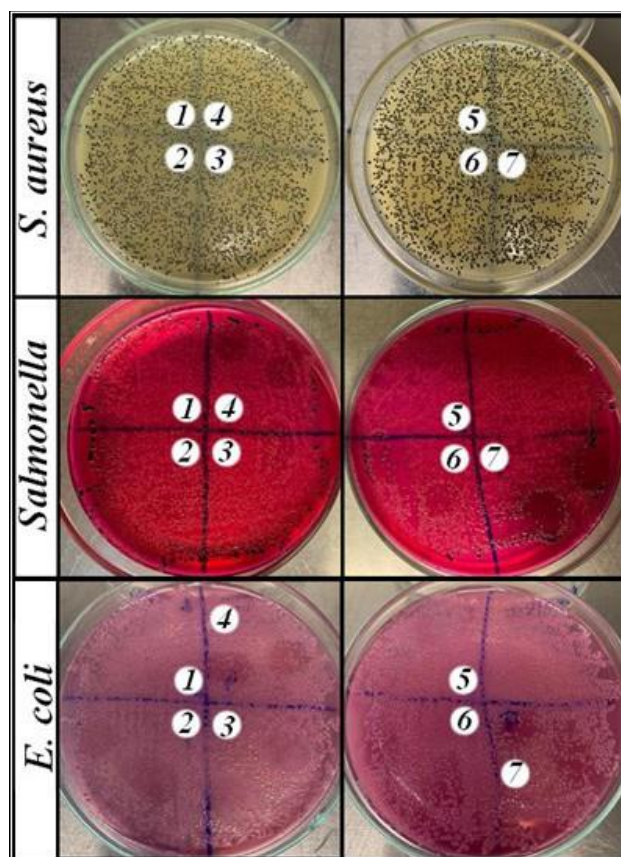
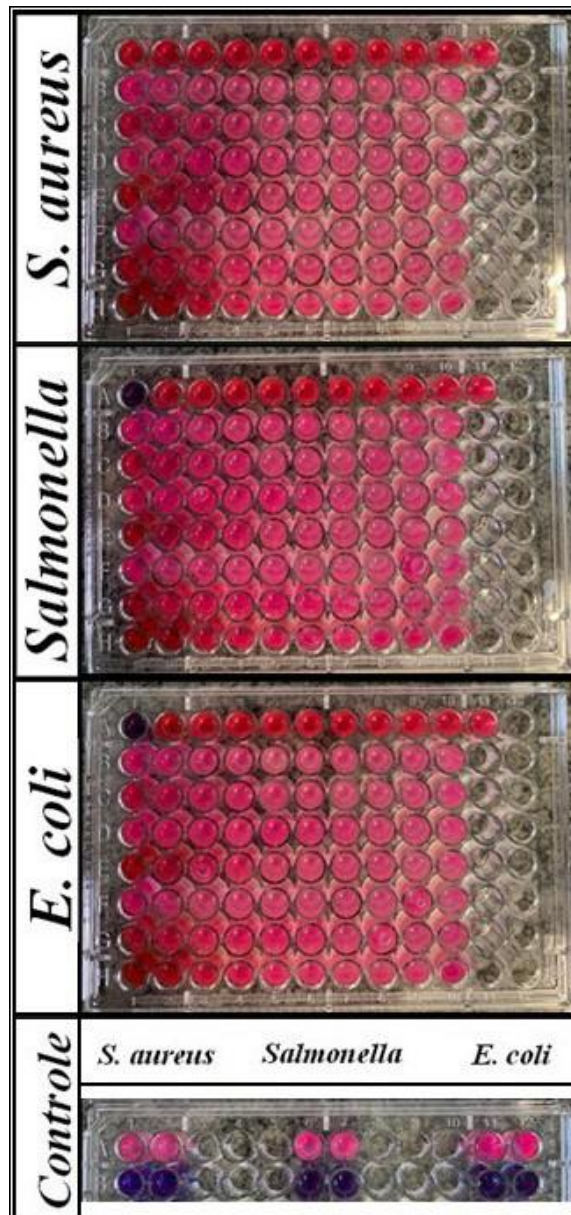


Figura 17 - Resultado do teste da CIM aos três *pools* de bactérias referentes as 7 amostras sob o tratamento 1 (BT1, ET1-05, ET1-10 e ET115) e o tratamento 2 (BT2, ET2-10 e ET2-20).



É possível que haja uma relação do resultado encontrado com a região da bactéria a qual o óleo da sucupira age. A grande maioria dos antimicrobianos inibem as bactérias alvo pela formação de poros na membrana citoplasmática e conseguinte quebra da parede celular. A diferença entre as bactérias nesse sentido é que a parede celular das gram-positivas possui maior espessura enquanto a parede celular das gram-negativas é mais fina e, conseqüentemente mais fácil de serem rompidas. Todavia, as gram-negativas possuem uma membrana externa que normalmente é responsável por conferir maior resistência frente aos antimicrobianos. Diante

disso, existem compostos capazes de desestabilizar essa membrana externa e tornar determinado antimicrobiano viável contra bactérias gram-negativas, como é o caso da nisina utilizada junto com o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (Prudêncio et al., 2016). Desta forma, é possível que a sucupira possua propriedades que promovam a desestabilidade da membrana externa presente nas bactérias gram-negativas ao mesmo tempo que não apresenta capacidade intensa de formar poros na parede celular. Uma forma de confirmar essa hipótese é a realização de microscopia eletrônica de transmissão, que permite analisar em qual região da bactéria o óleo de sucupira age. Infelizmente, não foi possível realizar essa análise e a mesma fica como sugestão para trabalhos futuros.

Dutra et al., (2009) encontraram um resultado distinto em um estudo que avaliou o potencial antimicrobiano do óleo essencial da sucupira, obtido em aparelho *Clevenger* pelo método de hidrodestilação durante 4 h, e não obtiveram zona de inibição no teste de sensibilidade frente à *E. coli* ATCC 10530. Por outro lado, o óleo apresentou zona de inibição frente ao *S. aureus* ATCC 25923 e uma CIM de 2,5 mg/mL. Essa diferença de resultados pode estar associada à composição das amostras que é dependente do método de extração. Pichette et al., (2006) e Sonboli et al., (2006) relataram que a atividade observada frente ao *S. aureus* pode estar associada a presença de compostos como o trans-cariofileno e α -humuleno (também conhecido como α -cariofileno). Esses compostos representam o primeiro e o quarto compostos de maior concentração no óleo de sucupira (35,9% e 6,8%), de acordo com um estudo conduzido por Dutra et al., (2012).

Com relação ao teste da CIM, não foi possível obter uma CIM frente a nenhum dos três *pools* de cepas nas condições avaliadas. Donati et al., (2015) realizaram o teste de sensibilidade, avaliando a atividade antimicrobiana do óleo de sucupira extraído por hidrodestilação com o aparelho *Clevenger*, frente ao *S. aureus* ATCC 29213 e à *E. coli* ATCC 25922, e obtiveram resultados que corroboram o encontrado por Dutra et al., (2009). Entretanto, nesse estudo a sucupira não apresentou trans-cariofileno como composto majoritário, mas sim o β -cariofileno (43,22%); o α -humuleno, por sua vez, foi o terceiro composto mais abundante (7,31%). Ressalta-se que os autores isolaram o composto para analisá-lo separadamente, e nenhuma zona de inibição foi observada no teste de sensibilidade. Esse resultado indica que o composto puro não deve ter efeito antimicrobiano, havendo, portanto, um provável efeito sinérgico entre os compostos. Por outro lado, Pichette et al., (2006) estudaram o óleo essencial de *Abies balsamea* (abeto bálsamo) e avaliaram a atividade antimicrobiana de compostos isolados frente ao *S. aureus* ATCC 25923 e à *E. coli* ATCC 25922, determinando a CIM. Entre eles estava o β -

cariofileno, assim como o α -humuleno e o mirceno, que também são compostos frequentemente encontrados no óleo de sucupira.

Michielin et al., (2009) e Queiroz et al., (2016) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos da erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e identificaram CIM frente ao *S. aureus* e à *E. coli*; os autores relataram os compostos β -cariofileno, α -humuleno, além de espatulenol, allo-aromadrendeno, β -sitoesterol, artemetina e α -pineno, como principais responsáveis pelo efeito antimicrobiano. Os quatro primeiros são compostos bastante comuns na sucupira, como será visto no item 5.4.3 (referente à caracterização química). É válido salientar que esses estudos avaliaram diferentes métodos de extração, e nem todos os extratos apresentaram efeito antimicrobiano frente à *E. coli*.

No presente trabalho, o efeito inibitório do extrato da sucupira foi mais acentuado frente à *Salmonella* do que à *E. coli*, sendo importante, em trabalhos futuros, avaliar formas de obter o extrato com maior concentração.

5.5.2 Caracterização química

5.5.2.1 *Índice de peróxidos e dienos e trienos conjugados*

A qualidade de óleos comestíveis está diretamente relacionada a sua estabilidade oxidativa. Essa estabilidade é avaliada através do índice de peróxidos, relacionado ao estágio inicial de degradação do óleo, e da concentração de dienos e trienos conjugados, que indicam a presença de compostos de degradação secundários, referentes ao estágio intermediário de oxidação do óleo.

Essa estabilidade foi avaliada no momento de obtenção do óleo em que foi alcançado um índice de peróxidos de $1,63 \pm 0,13$ meq/1 kg amostra, extinção específica no ultravioleta a 270 nm (trienos) de $0,237 \pm 0,01$ e extinção específica no ultravioleta a 232 nm (dienos) de $0,812 \pm 0,02$.

Os resultados demonstram que o extrato foi obtido com ótima qualidade uma vez que apresentou índice de peróxidos abaixo de 20 meq/1 kg (Brasil, 2021) e baixos valores de dienos e trienos conjugados. De acordo com a Hanna Instruments (2020) e Ottaway et al., (2021),

valores de índice de peróxidos a partir de 30 meq/kg de amostra indicam que o sabor de ranço já é percebido sensorialmente, e valores acima de 100 meq/kg de amostra estão associados à intoxicação alimentar (Gotoh e Wada, 2006). Entretanto, reações que desencadeiam destruição de ácidos graxos essenciais e produção de compostos tóxicos podem ocorrer em valores inferiores. Além disso, há estudos na literatura que relacionam a rancidez ao tipo de óleo em questão. Okparanta (2018), estudando os óleos de milho e de mostarda, observou que o primeiro apresentou sabor de ranço em um índice de peróxidos de 213,5 meq/kg, enquanto o segundo apresentou o mesmo sabor em valor de 12,8 meq/kg. Todavia, com base nas regras internacionais (*International Olive Council*), os azeites extra virgens devem apresentar um valor de índice de peróxidos inferior a 20 meq/kg.

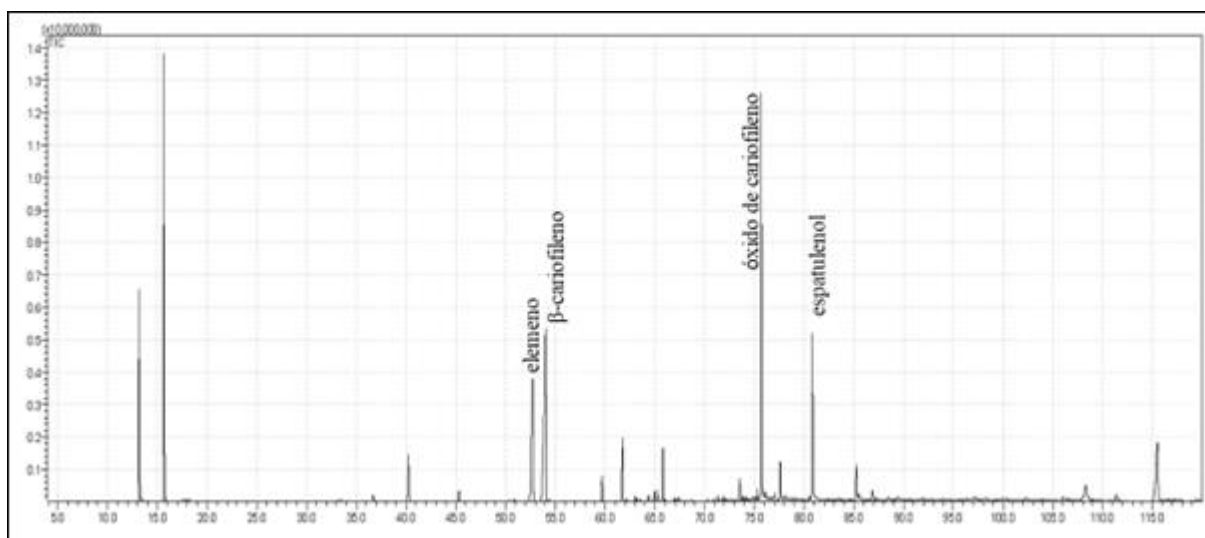
A Instrução Normativa (IN) nº 87, de 15 de março de 2021, estabelece o valor máximo de índice de peróxidos para óleos vegetais sendo o limite de 10 meq/kg para óleos e gorduras refinados e 15 meq/kg para óleos prensados a frio e não refinados. Como observado, o extrato da sucupira não atingiu esse teor demonstrando ser estável em sua obtenção. Essa IN levou em consideração o que é determinado pelo Codex Alimentarius (2003) e a RDC 270 da ANVISA (2005), que ditam os mesmos valores, e ainda os valores da extinção específica no ultravioleta a 232 e 270 nm (dienos e trienos). O limite para trienos é de 0,90, valor não alcançado nesse estudo. Para dienos, não existe um valor estipulado para óleos comestíveis não refinados. Entretanto, para efeito comparativo, quando se trata de azeite de oliva extravirgem e virgem, esses limites são de 2,50 e 2,60, respectivamente. O extrato da sucupira manteve valores abaixo desse limite em todo o tempo analisado.

5.5.2.2 *Identificação de compostos bioativos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas*

O extrato obtido por EAU no ponto otimizado e um extrato oriundo da extração exaustiva da sucupira foram avaliados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). A Figura 18 apresenta o cromatograma obtido para o extrato da sucupira obtido por extração exaustiva. Os perfis de compostos de ambos os extratos foram bem semelhantes, com maior intensidade na sucupira sólida, conforme esperado. No Apêndice E são apresentados os cromatogramas para ambas as amostras. Para ambos, os principais compostos foram: elemeno, β -cariofileno, óxido de cariofileno e espatulenol. Esses quatro compostos são

frequentemente encontrados na sucupira e relatados em diversos estudos (Alves et al., 2013; Dutra et al., 2008; Evangelista et al., 2007; Nucci et al., 2012). Destaca-se o composto β -cariofileno foi encontrado em 10 de 11 diferentes amostras de sucupira no estudo de Alves et al., (2013).

Figura 18 - Cromatograma obtido via CG-MS para o extrato da sucupira obtido por extração exaustiva.



A identificação dos compostos foi realizada considerando a fragmentação dos espectros de massa através de comparação com a base de dados NIST (*National Institute of Standards and Technology*) e com dados da literatura de compostos encontrados na matriz ou em matrizes similares. Inicialmente, apenas os espectros com índice de similaridade igual ou superior a 95% foram considerados. Entretanto, alguns compostos com menor similaridade ($\geq 88\%$) também foram considerados, uma vez que são compostos já encontrados na literatura e discutidos em óleos essenciais e na sucupira. A Tabela 16 elenca os compostos identificados na sucupira e no extrato obtido por EAU.

O β -cariofileno e o óxido de cariofileno são sesquiterpenos bicíclicos naturais. Ambos possuem atividades anticancerígenas significativas, afetando o crescimento e a proliferação de numerosas células cancerígenas. O β -cariofileno é considerado um fitocanabinóide com forte afinidade com o receptor canabinóide tipo 2 (CB₂), o qual representa uma estratégia terapêutica para o tratamento de inflamação, dor, aterosclerose e osteoporose (Gertsch et al., 2008; Ofek et

al., 2006; Steffens et al., 2005). Também encontrou-se evidências de que o β -cariofileno auxilia no tratamento de lesões na coluna e cérebro, acidente vascular cerebral, isquemia, transtorno de ansiedade, depressão, colite, fibrose e isquemia hepática, osteoartrite, diabetes, obesidade e alguns tipos de câncer (Ceramella et al., 2019; Fidyt et al., 2016; Hartsel et al., 2016; Iacopetta et al., 2017; Machado et al., 2018; Nettore et al., 2019; Saturnino et al., 2014). O óxido de cariofileno não apresenta essa afinidade, demonstrando que suas propriedades biológicas funcionam de modo ao menos parcialmente diferente. Ainda assim, o óxido de cariofileno é utilizado na alteração de várias vias importantes para o desenvolvimento de câncer, como a proteína quinase ativada por mitógeno (Segat et al., 2017). Além disso, tratamentos com esse composto reduz a expressão de genes/proteínas procancerígenas, enquanto aumenta os níveis daqueles com propriedades pró-apoptóticas. Por fim, no geral, ambos possuem atividades antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antioxidantes, analgésicas e antimicrobianas (Hammami et al., 2015; Singh et al., 2014; Tung et al., 2008).

O elemeno, encontrado em ambos os extratos com nível de similaridade de 95% (Tabela 16), é um sesquiterpeno e β -elemeno é sua forma mais ativa entre seus monômeros α , β e δ . O β -elemeno é conhecido por sua atividade anticancerígena contra uma variedade de linhas celulares, sendo menos citotóxico que diversos agentes quimioterápicos amplamente aceitos (Bai et al., 2021). Além disso, apresenta efeitos antitumorais diretos e também reverte a resistência a múltiplas drogas, reduzindo o potencial de membrana mitocondrial, ativando o sistema redox intracelular e induzindo a apoptose de células tumorais (Yao et al., 2014; Zhou et al., 2017). Atualmente, o β -elemeno e seus derivados têm sido utilizados para tratar vários tumores, incluindo câncer de pulmão (Zhou et al., 2017), câncer de fígado (Mao et al., 2013), câncer de cérebro (Zhu et al., 2015), câncer de mama (Zhang et al., 2014), câncer de ovário (Li et al., 2013), câncer de estômago (Liu et al., 2015), câncer de próstata e outros tecidos por mais de 20 anos (Zou et al., 2013).

O espatulenol é um sesquiterpeno tricíclico com esqueleto 5,10-cicloaromadendrano, produzido pela ciclização C5-C10 do esqueleto de adenina aromática (Chieng et al., 2008). Estudos revelam que o espatulenol tem importante bioatividade como anticolinesterásico (Karakaya et al., 2020), antinociceptivo, anti-hiperalgésico (Santos et al., 2022), antimicobacteriano (Dzul-Beh et al., 2019), antioxidante, antiproliferativo, antiedematogênico (Nascimento et al., 2018), citotóxico (Mirzaei et al., 2017) e como adjuvante quimioterápico anticâncer contra a multirresistência (Martins et al., 2010).

Tabela 16 - Compostos identificados na sucupira e no extrato obtido por EAU por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS).

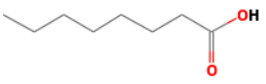




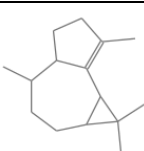


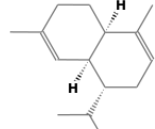
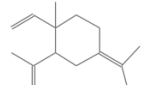
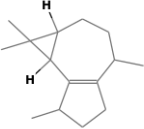
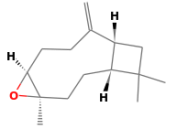


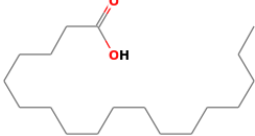
| Composto | Estrutura | Tempo de retenção (min) | Nível de similaridade (%) | Extrato hidroalcoólico otimizado | Sucupira sólida |
|---|---|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|
| ácido octanóico, ester metílico (ácido caprílico) |  | 31,200 | 94 % | ✓ | ✗ |
| α -cubebeno |  | 36,680 | 96 % | ✓ | ✓ |
| α -copaeno |  | 40,250 | 96 % | ✓ | ✓ |
| elemeno |  | 52,725 | 95 % | ✓ | ✓ |
| β -cariofileno |  | 53,880 | 96 % | ✓ | ✓ |
| 1H-cicloprop[e]azuleno (esteroisômero do gurjuneno) |  | 59,700 | 95 % | ✓ | ✓ |
| α -humuleno ou α -cariofileno |  | 61,730 | 95 % | ✓ | ✓ |
| naftaleno |  | 63,045 | 94 % | ✓ | ✓ |
| α -muroleno |  | 65,265 | 93 % | ✓ | ✓ |
| γ -elemeno |  | 65,795 | 91 % | ✓ | ✓ |
| isoledeno |  | 73,880 | 90 % | ✓ | ✓ |
| óxido de cariofileno |  | 75,685 | 88 % | ✓ | ✓ |

Tabela 16 (continuação) - Compostos identificados na sucupira e no extrato obtido por EAU por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS).

| Composto | Estrutura | Tempo de retenção (min) | Nível de similaridade (%) | Extrato hidroalcoólico otimizado | Sucupira sólida |
|---|--|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|
| espatulenol |  | 80,820 | 91 % | ✓ | ✓ |
| ácido hexadecanóico, éster metílico (ácido palmítico) |  | 85,250 | 97 % | ✓ | ✓ |
| ácido octadecanóico, éster metílico (ácido esteárico) |  | 111,375 | 96 % | × | ✓ |

Dentre esses compostos, o β -cariofileno e o óxido de cariofileno são encontrados em diversas fontes de origem vegetal, como pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum* spp.), orégano (*Origanum vulgare* L.), manjeriço (*Ocimum* spp.), tomilho (*Thymus vulgaris*), hortelã (*Mentha piperita*), gengibre (*Zingiber officinale*), citronela, (*Cymbopogon*), entre outros (Gertsch et al., 2008; Machado et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Por sua vez, o espatulenol não só é encontrado em diversas fontes vegetais, como é relatado como sendo o principal componente volátil dos óleos essenciais de várias espécies aromáticas da *Myrtaceae*, incluindo *Eugenia calycina* (cereja do cerrado), *E. uniflora* (pitanga), *Psidium guajava* (araçá) e *P. cattleianum* (goiaba morango) (Costa et al., 2009; Khadhri et al., 2014; Marques et al., 2008; Sousa et al., 2015).

O β -elemeno pode ser considerado um pouco mais raro entre as fontes vegetais. A fonte vegetal mais conhecida do composto é a *Curcuma wenyujin*, chegando a 27,83% em seu óleo essencial quando obtido por extração de fluido supercrítico, e ainda representa a única fonte vegetal utilizada na indústria de processamento do elemeno (Wang, 2012). Apesar disso, há outras fontes vegetais ricas no composto, de origem asiática e do sul da Europa, com destaque a *Nigella damascena* (dama-entre-verdes), que apresentou valor de 47% de β -elemeno em seu

óleo essencial (Sieniawska et al., 2018). De acordo com Alves et al., (2013) e (Dutra et al., 2012) o óleo essencial da sucupira pode alcançar valor de 16,7% e 15,3% para o β -elemeno, respectivamente. O óleo essencial da sucupira é uma ótima fonte desse composto, e também de outros compostos, tais como β -cariofileno (20,3%), óxido de cariofileno (8,33%) e espatulenol (13,8%).

O α -copaeno, identificado em ambos os extratos com um nível de similaridade de 96% (Tabela 16), é um sesquiterpeno tricíclico que já foi isolado de outros óleos e cuja atividade biológica também foi comprovada, possuindo efeitos antioxidantes, citotóxicos, antígeno-tóxicos e antimicrobiano (Turkez et al., 2014). Apesar de ser encontrado em diversos óleos vegetais, o α -copaeno não apresenta uma escalabilidade comercial por dificilmente ser encontrado em altas proporções (Lull et al., 2023). Entre alguns óleos que possuem o α -copaeno como composto majoritário estão o óleo de *Kielmeyera coriacea* (pau santo) com 14,9% (Martins et al., 2015) e *Eugenia klotzschiana* (pera do cerrado) com 10,9% (Carneiro et al., 2017). Além desses, há o óleo de *Acroptilon repens* (*knapweed* russa) que apresentou 36% de óxido de cariofileno e 15,6% de α -copaeno (Norouzi-Arasi et al., 2006). O óleo essencial da sucupira apresenta valores próximos, variando de 2,1 a 13,9% nas análises realizadas por Alves et al., (2013).

O α -humuleno, também identificado em ambas as amostras no presente estudo, apresenta atividades e efeitos similares aos compostos majoritários do óleo de sucupira. Esse composto é frequentemente encontrado no óleo essencial da sucupira com valores entre 0,88 a 16,9% de acordo com o estudo de (Alves et al., 2013). Leite et al., (2021) elaboraram uma revisão sobre o α -humuleno e observaram que o esse composto e seus isômeros apresentaram atividades antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana e outras atividades farmacológicas. Essa revisão foi o primeiro estudo de agrupamento desenvolvido sobre as atividades farmacológicas e toxicológicas desse grupo de compostos. Entre algumas das atividades observadas estão: atividade antiproliferativa da linha celular de câncer de ovário (A2780) e células de câncer linfoblástico (Ambrož et al., 2017), atividade citotóxica através da habilidade de inibir crescimento de células cancerígenas (El Hadri et al., 2010) e atividade antiproliferativa potencializada na combinação com drogas citostáticas (Ambrož et al., 2019).

O α -cubebeno, descrito na Tabela 16, é antimicrobiano, antifúngico, antiparasitário e antiinflamatório, podendo repelir mosquitos e matar insetos naturalmente. Além disso, é um ingrediente aromatizante de alimentos e bebidas, bem como utilizado como medicamento sendo considerado um composto com efeitos neuroprotetores (Akçura, 2023; Park et al., 2015).

Embora não tenha sido possível obter o perfil de ácidos graxos no presente trabalho, alguns ácidos graxos foram identificados. O ácido palmítico (C16:0) é o produto final da síntese de ácidos graxos em praticamente todos os organismos, é presente na dieta e sintetizado endogenamente. Embora muitas vezes considerado como tendo efeitos adversos em doenças crônicas em adultos, o ácido palmítico é um componente essencial das membranas celulares, dos lipídeos secretores e de transporte, com papéis cruciais na palmitoilação de proteínas e moléculas sinalizadoras palmitoiladas (German, 2011). O ácido esteárico (C18:0), por sua vez, ao contrário de outros ácidos graxos saturados de cadeia longa, não tem efeito nas concentrações de colesterol lipoproteico em homens ou mulheres (Kris-Etherton et al., 1995). Além disso, o ácido esteárico (19 g/dia) na dieta tem efeitos favoráveis sobre os fatores de risco trombogênicos e aterogênicos em homens, sendo um ácido não tóxico e biocompatível com o corpo humano (Zhen et al., 2015).

Os resultados revelam que o ácido esteárico foi identificado apenas no extrato obtido pela extração exaustiva da sucupira. Apesar da presença do grupo carboxila em sua estrutura, a cauda de hidrocarboneto saturado o torna um ácido apolar. Devido essa natureza apolar, é possível que esse composto não esteja presente na fração solúvel do extrato hidroalcólico obtido via EAU.

O ácido caprílico (C8:0), também descrito na Tabela 16 somente para o extrato obtido via EAU, pertence à classe dos ácidos graxos saturados de cadeia média, que também inclui o ácido capróico (C6:0) e o ácido cáprico (C10:0). Esses ácidos graxos são nutrientes característicos presentes em produtos lácteos e em óleos específicos como óleo de palmiste e coco (Takeuchi et al., 2008). Diferentemente dos ácidos graxos saturados de cadeia longa (superior a 12 carbonos), demonstram rápida hidrólise e absorção gastrointestinal, transporte específico da veia porta e rápida beta-oxidação no fígado. Diversos estudos mostram o potencial do ácido caprílico, sendo na qualidade do óleo, na ação antimicrobiana e no benefício geral à saúde. O ácido caprílico demonstrou atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias, incluindo *Cronobacter sakazakii*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* (Huang e Chen, 2011; Jang e Rhee, 2009). Kim e Kim, (2021) sintetizaram éster vanílico de ácido caprílico e observaram uma diminuição da taxa de produção de dienos e trienos conjugados de um sistema de emulsão óleo em água e também detectaram atividade antibacteriana contra bactérias deteriorantes de alimentos, incluindo *Bacillus coagulans*. O ácido caprílico também foi estudado por Ruiz-Rico et al., (2015) que avaliaram a atividade bactericida do ácido aprisionado em nanopartículas de sílica mesoporosa, como

também em sua forma livre. Os autores observaram que o ácido caprílico livre mostrou-se mais eficaz contra microrganismos gram-positivos, reduzindo significativamente o crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Como discutido previamente, estas diferenças na susceptibilidade microbiana podem ser atribuídas a diferenças na estrutura e permeabilidade da membrana celular bacteriana.

Embora só tenha sido possível identificar alguns ácidos graxos nos extratos obtidos no presente trabalho, a literatura revela outros ácidos graxos encontrados na sucupira. Costa-Singh e Jorge (2019) detectaram 10 ácidos graxos, com maior relevância para o ácido cáprico (C10:0), láurico (C12:0) e, entre os insaturados, o ácido linoleico (C18:2 *n-6*) e oleico (C18:1 *n-9*).

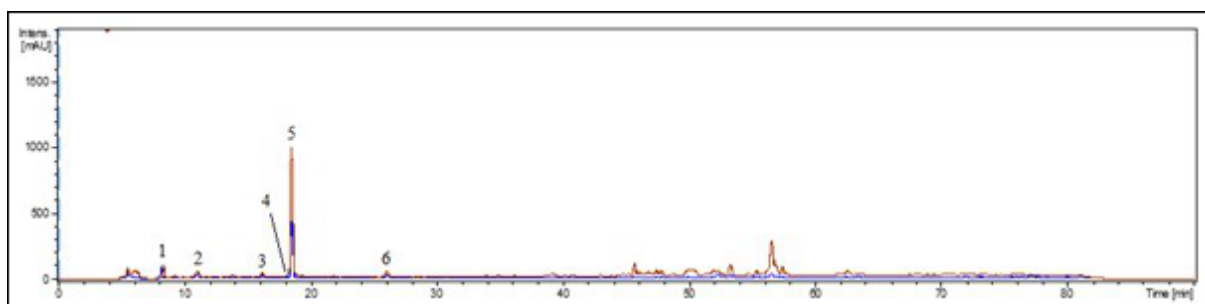
Um outro composto identificado nas amostras do presente trabalho foi o naftaleno. Nenhum dos estudos referenciados neste trabalho detectou naftaleno na sucupira. O naftaleno é um composto orgânico (C₁₀H₈) classificado como um benzenóide de hidrocarboneto aromático policíclico. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (NCI 2018), a exposição ao naftaleno está associada à anemia hemolítica, danos ao fígado e ao sistema neurológico, catarata e hemorragia retiniana. Prevê-se que a substância seja cancerígena para humanos e pode estar associada a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de laringe e colorretal. Caso o composto esteja realmente presente na sucupira desse estudo, é possível que ele tenha sido utilizado no momento do plantio da sucupira ou no armazenamento. O naftaleno já foi detectado em óleo de soja, óleo de mostarda e óleo de coco (Hossain e Salehuddin, 2012) e seu resíduo no azeite de oliva virgem (Rascón et al., 2018). Bempelou et al., (2019) investigou a contaminação do azeite de oliva por parte do naftaleno, considerando que o uso do composto era empregado para repelir inseto (*Bactrocera oleae*). Neste estudo o autor testou 75 amostras e nenhum resultado deu positivo para a detecção.

O isoledeno, identificado com um nível de similaridade de 90% em ambas as amostras, também é um composto que não foi detectado na sucupira em estudos anteriores. Asif et al., (2016) utilizaram isoledeno obtido da resina óleo-goma da *Mesua ferrea* (árvore-do-ovo-frito) para avaliar a indução da apoptose em células de carcinoma colorretal humano. Foi possível observar que o isoledeno é capaz de induzir efeitos citotóxicos seletivos para linhagens celulares de carcinoma colorretal humano, induzir alterações apoptóticas típicas na morfologia das células cancerígenas do cólon e elevar o nível de caspases. Essas são endoproteases que fornecem ligações críticas nas redes reguladoras celulares que controlam a inflamação e a morte celular.

5.4.3.3 Identificação de compostos bioativos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

O extrato obtido por EAU no ponto otimizado e um extrato oriundo da extração exaustiva do fruto da sucupira foram avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Os compostos fenólicos foram identificados ou tentativamente identificados considerando os seguintes parâmetros: massa acurada, padrão de fragmentação, ordem de eluição em coluna C18 e características de absorção no UV-visível. Essas informações foram comparadas com informações de padrões analíticos e com dados da literatura. Esses compostos estão apresentados na Tabela 17 de acordo com o cromatograma representado na Figura 19.

Figura 19 - Cromatogramas dos extratos do ponto otimizado (azul) e da extração exaustiva (marrom) do fruto da sucupira a 280 nm.



Os compostos 1 e 2 (Figura 19) foram identificados como ácido gálico e catequina, respectivamente. Esses compostos foram identificados usando as características dos padrões analíticos. O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) pertence à família de compostos fenólicos, sendo abundantemente encontrado em várias fontes naturais, incluindo nozes, sumagre, hamamélis, folhas de chá, casca de carvalho e outras espécies de plantas (Choubey et al., 2015); possui atividades farmacológicas pronunciadas que são vantajosas na terapia de doenças. Os efeitos biológicos e terapêuticos incluem antioxidante (Rakshit et al., 2020), anti-inflamatório (Singla et al., 2020), antidiabético (Pereira et al., 2018), anti-apoptótico (Mehraban et al., 2019), hepatoprotetor (Sousa et al., 2020), renoprotetor (Nouri et al., 2021), neuroprotetor (Diaz et al., 2021), anti-obesidade (Tanaka et al., 2020), antienvhecimento (Guo et al., 2020). A literatura revela a presença do ácido gálico e da catequina nas folhas da sucupira, de acordo

com Donati et al., (2015) e Porfiro et al., (2014), porém nenhum estudo até o momento encontrou esse composto especificamente nos frutos.

A catequina (cromatograma de absorção no UV-visível e espectro de massas apresentados na Figura 20) e epicatequina apresentam o mesmo íon precursor $[M-H]^-$ m/z 289, bem como mesmos espectros de fragmentação MS/MS (como m/z 123 $[M-H-166]^-$), mas tempos de retenção distintos. Dessa forma, os padrões de catequina e epicatequina foram avaliados e resultaram em tempos de retenção de 11,2 min e 12,0 min, respectivamente. Assim, o composto 2 pôde ser identificado como catequina.

A catequina é um composto fenólico comumente encontrada em plantas e tem demonstrado grande potencial na melhoria da saúde geral e no combate a diversas condições médicas (Baranwal et al., 2022). Estudos relatam efeitos anticâncer (Shirakami e Shimizu, 2018), antiobesidade, antidiabético, anticardiovascular, anti-infeccioso, hepatoprotetor e neuroprotetor (Baranwal et al., 2022; Isemura, 2019; Shirakami e Shimizu, 2018). Essa molécula apresenta atividades antioxidantes e antimicrobianas que são atribuídas aos grupos orto di-hidroxila e às porções hidroxila no anel β (Sabaghi et al., 2015, 2020).

Figura 20 - Cromatograma de absorção no UV-visível e espectro de massas da catequina no modo negativo.

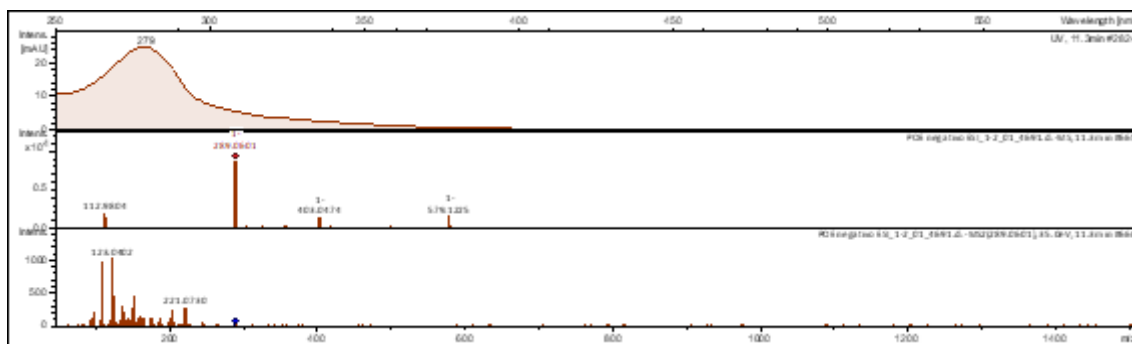


Tabela 17 - Compostos fenólicos identificados ou tentativamente identificados em extrato de sucupira por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC- MS).

| Pico ^a | Compostos | t _R (min) ^b | λ _{máx} (nm) ^c | Ionização | [M-H] ⁻ (m/z) | Fórmula molecular | MS/MS (m/z) | Referência |
|-------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------------------------|--|---|---------------------------|
| 1 | Ácido gálico | 8,4 | 274 | ESI(-) | 169,0138 | C ₇ H ₆ O ₅ | n.d. | Padrão |
| 2 | Catequina | 11,3 | 279 | ESI(-) | 289,0601 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 221.0730 (29), 203.0698 (24), 151.0327 (46), 137.0212 (31), 123.0402 (100), 109.0223 (96) | Padrão |
| 3 | Não identificado I | 16,3 | 278,3 | ESI(-) | 287,0458 | - | 151.0303 (17), 135.0042 (47), 123.0447 (24), 109.0258 (100) | - |
| 4 | Não identificado II | 18,2 | 281 | ESI(-) | 289,0643 | - | 167.0282 (100), 137.0212 (68), 123.0517 (24), 121.0235 (51), 109.0289 (64) | - |
| 4 | Não identificado III | 18,2 | 281 | ESI(-) | 403,0550 | - | 167.0294 (14), 112.9829 (100) | - |
| 5 | Taxifolina | 18,4 | 289 | ESI(-) | 303,0427 | C ₁₅ H ₁₂ O ₇ | 151.0122 (19), 125.0202 (100) | (Avello et al., 2019) |
| 5 | Não identificado IV | 18,5 | 289 | ESI(-) | 417,0291 | - | 285.0324 (10), 125.0257 (8), 112.9821 (100) | - |
| 5 | Luteolina | 18,6 | 289 | ESI(-) | 285,0105 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 199.0343 (87), 175.0409 (100) | (Vuković et al., 2018) |
| 5 | Derivado da taxifolina I | 18,7 | 289 | ESI(-) | 629,0281 | - | 325.0246 (100), 303.0475 (24), 285.0350 (31), 200.9740 (20), 178.9965 (18) | - |
| 5 | Derivado da taxifolina II | 18,8 | 289 | ESI(-) | 949,0201 | - | 645.0485 (60), 493.0115 (23), 303.0462 (100) | - |
| 6 | Quercetina | 26,0 | 367 | ESI(-) | 301,0340 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 245.0405 (6), 178.9967 (14), 151.0015 (100), 121.0306 (36), 107.0086 (30) | Padrão |
| 6 | Eriodictiol | | | ESI(-) | | | 150.9992 (17), 135.0422 (100), 107.0151 (12) | (Avello et al., 2019) |

^aPico relacionado ao cromatograma de massa (Fig. 19). ^bTempo de retenção na coluna C18 Synergi (4 μm). ^cReferente ao valor máximo de absorção. n.d. = abaixo do LDD (limite de detecção).

O pico 5 da Figura 20 corresponde a uma mistura de compostos. Um dos compostos presentes é a taxifolina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavanona ou diidroquercetina), que apresenta no espectro de massas a razão m/z 303,0427 da molécula desprotonada $[M-H]^-$; no espectro MS^2 mostrou a razão m/z 125,0202 $[M-H-178]^-$, correspondente à clivagem do anel C (Avello et al., 2019). A taxifolina no modo positivo apresentou $[M+H]^+$ m/z 305,0812 e os fragmentos $[M+H]^+$ m/z 287,0636, 259,0676, 231,0683, 195,0342, 153,0220, 149,0205 e 123,0457, mesma fragmentação relatada na literatura para essa molécula (Braune et al., 2001). Dois compostos derivados de taxifolina apresentaram $[M-H]^-$ m/z 629,0281 e 949,0201, sendo tentativamente identificados com base nos fragmentos $[M-H]^-$ m/z 303,0475 e 285,0350 (derivado de taxifolina I) e $[M-H]^-$ m/z 303,0462 (derivado de taxifolina II), característicos da taxifolina.

A taxifolina é um flavonoide comumente encontrado em cebolas, azeite de oliva, cascas de pinheiros, uvas e frutas cítricas (Min et al., 2019; Northwest, 1995; Rohdewald, 2002). A taxifolina é um composto com propriedades farmacológicas, prevenindo angiogênese e formação de espécies oxidativas reativas (Asmi et al., 2017; Sunil e Xu, 2019). Estudos revelam também atividade antioxidante (Chobot et al., 2016; Dok-Go et al., 2003; Xie et al., 2017), anti-Alzheimer (Gunesch et al., 2020; Park et al., 2016; Saito et al., 2017), antimicrobiana (Artem'Eva et al., 2015; Kozhikkadan Davis et al., 2018; Kuspradini et al., 2009) e genotóxica (Zhanataev et al., 2008). Possui atividade anticancerígena comprovada no que diz respeito a mama (Li et al., 2019), pulmões (Wang et al., 2020), fígado (Dostal et al., 2021), próstata (Ge et al., 2018; Zhang et al., 2013), pele (Oi et al., 2012), ossos (Chen et al., 2018) e colorretal (Razak et al., 2018). Arriaga et al., (2000), realizando estudos fitoquímicos sobre a sucupira, detectou diversos diterpenoides, compostos voláteis e a taxifolina como flavonoide. É o único estudo que relatou a detecção da taxifolina na sucupira, a qual foi obtida no estado de Minas Gerais.

O espectro de massa da luteolina (pico 5, $[M-H]^-$ m/z 285,0105) apresentou os seguintes fragmentos: 199,0343 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$ e 175,0409 $[M-H-C_3O_2-C_2H_2O]^-$, semelhante ao encontrado por Vuković et al., (2018). A luteolina é uma flavona presente em muitas plantas medicinais. As flavonas são uma classe de flavonoides, alguns dos metabólitos secundários mais abundantes nas plantas e são amplamente conhecidas por serem responsáveis por diversas atividades farmacológicas (Gendrisch et al., 2021). Entretanto, a luteolina é uma substância pleiotrópica, uma vez que seu impacto farmacológico não pode ser explicado por um único efeito bioquímico. A luteolina está presente em vegetais, frutas e ervas medicinais, incluindo brócolis, folhas de cebola, cenoura, pimentão, repolho e casca de maçã (Gendrisch et al., 2021).

Alto teor de luteolina também foi observado em salsa, tomilho, hortelã-pimenta, manjeriço, aipo e alcachofra (Jeong et al., 2014; Kim et al., 2014; Kim et al., 2014; Yang et al., 2017). Ressalta-se que não há estudos até o momento que tenham detectado a luteolina no fruto, porém Donati et al., (2015) a detectou nas folhas da sucupira.

Dados da literatura demonstram que a luteolina tem propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, quimiopreventivas, quimioterápicas, cardioprotetoras, antidiabéticas, neuroprotetoras e antialérgicas (Baek et al., 2016, 2017; Choi et al., 2017; López-lázaro, 2009; Yu et al., 2017). Dentre esses, o efeito mais importante da luteolina consiste no seu potente poder antioxidante com excelentes propriedades de eliminação de radicais e citoprotetoras (Havsteen, 2002; Heim et al., 2002). Portanto, os efeitos anti-inflamatórios da luteolina podem ser atribuídos em parte a sua capacidade antioxidante. Isso é especialmente importante porque o estresse oxidativo desempenha um papel muito importante em muitos processos inflamatórios da pele (Rodríguez et al., 2016; Sander et al., 2004) (por exemplo, eritema e câncer de pele induzidos por radiação, psoríase, cicatrização de feridas e dermatite de contato). Além disso, a luteolina interage com outros antioxidantes, como vitaminas e sistemas redox celulares e seu poder antioxidante poder aumentar sinergicamente (Gendrisch et al., 2021).

O pico 6 da Figura 20 também é uma mistura de compostos. A quercetina (3,5,7,30,40-pentahidroxi flavona), flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis, foi identificada com o seu padrão analítico. Esse composto possui uma ampla gama de atividades biológicas (Shakya, 2016), como antioxidante (Amorati et al., 2017; Houngue et al., 2017), antiviral (El-Toumy et al., 2018; Omar et al., 2020), anti-alzheimer (Qi et al., 2020; Szwajgier et al., 2019), antifúngico (Al-Huqail et al., 2019; Petrescu et al., 2019), antidiabético (Ali et al., 2020; Yao et al., 2019), antiobesidade (Carrasco-Pozo et al., 2019; Kim et al., 2015), anti-hipertensão (Elbarbry et al., 2020; Muhammad e Fatima, 2015) e cardioprotetora (Jing et al., 2016; Lodi et al., 2009), além de apresentar impactos sinérgicos com outros medicamentos ou compostos (Massaro et al., 2016; Saw et al., 2014). A quercetina é encontrada em diversas fontes vegetais, como cebola, alho, sabugueiro, centella, erva de São João, salsa, couve, agrião, coentro, alface, alcaparra e cereja (Bae et al., 2010; Lee et al., 2016; Shakya, 2016). Assim como para a luteolina, na literatura não foram encontrados estudos que detectaram a quercetina no fruto da sucupira. Entretanto, foi detectada sua presença nas folhas nos estudos conduzidos por Porfiro et al., (2014) e Donati et al., (2015).

O composto eriodictiol [(S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-2,3-dihidrocromen-4-ona], representado pelo pico 6 na Figura 21, apresentou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ m/z 287,0521 e o espectro MS^2 resultou em m/z 150,9992 $[M-H-136]^-$, 135,0422 $[M-H-152]^-$ e 107,0151 $[M-H-180]^-$, em concordância com os fragmentos relatados na literatura (Avello et al., 2019). No modo positivo, esse mesmo composto apresentou $[M+H]^+$ m/z 289,0792 e os fragmentos $[M+H]^+$ m/z 163,0433 $[M+H-126]^+$ e 153,0232 $[M+H-136]^+$, correspondente as características observadas no estudo de Vigbedor et al., (2023). O eriodictiol é um flavonoide na subclasse das flavanonas abundantemente encontrado em diversas plantas medicinais, frutas cítricas e vegetais (He et al., 2019; Marín et al., 2017). Não foram encontrados estudos que detectaram o eriodictiol na sucupira, sendo este estudo o primeiro a acusar sua presença.

As propriedades biológicas benéficas dos flavonoides são afetadas pelas variações estruturais, como as formas das hidroxilas nos anéis A e B e a presença de insaturação 2,3 infundida com um grupo 4-oxo no anel C (Manthey et al., 2001). O eriodictiol possui a capacidade de modular uma série de cascatas de sinalização celular. Vários estudos indicaram que esse composto exerce múltiplos efeitos terapêuticos, incluindo antioxidante (Chobot et al., 2016; Mokdad-Bzeouich et al., 2016), anti-inflamatório (Zhu et al., 2015), anticâncer (Y. Zhang et al., 2020), neuroproteção (Habtemariam, 2019), cardioproteção (Li et al., 2018), antidiabético (W. Y. Zhang et al., 2012), antiobesidade (Kwon e Choi, 2019) e hepatoproteção (Arakaki et al., 2019; Xie et al., 2017). Além disso, o eriodictiol é um componente importante dos suplementos dietéticos e é utilizado como alimento funcional com alto teor antioxidante (Fujimura et al., 2022).

Outros compostos que apresentaram propriedades de absorção no UV-visível, razão massa/carga e fragmentos característicos dos compostos fenólicos foram encontrados. Entretanto, a identificação ainda não foi possível, sendo essa uma das atividades a serem desenvolvidas em trabalhos futuros.

Como descrito na revisão desse trabalho, a sucupira é conhecida pela presença dos compostos vouacapanos (furanoditerpenos) e pelo geranilgeraniol (diterpenos acíclicos). Esses compostos foram identificados por HPLC e GC-MS em trabalhos anteriores (Hoscheid et al., 2017; Leal, 2015; Souza et al., 2020; Spindola et al., 2009), servindo de referência para o presente trabalho, no qual tal identificação não foi possível.

Os diterpenos podem não ser identificados em uma análise de HPLC devido a vários motivos. Dentre eles, pode-se citar as condições do método de HPLC utilizado, como a coluna

ou a composição da fase móvel, que podem não ter a seletividade para a separação e detecção de diterpenos (Wang et al., 2014). Contudo, ressalta-se que esse estudo utilizou a mesma coluna e fase móvel do estudo realizado por Giarola et al., (2022), que identificaram os compostos vouacapanos utilizando GC-MS e HPLC-DAD. Esses compostos consistem em uma mistura de isômeros com uma proporção de 1:1 de (i) éster metílico de 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato e (ii) éster metílico de 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato. Esses isômeros têm relação direta com a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da sucupira (Servat et al., 2012).

Outra razão para a não detecção poderia ser a presença de compostos interferentes na matriz da amostra, como outros compostos coeluentes ou componentes da matriz, que pode dificultar a identificação de diterpenos (Schwarz e Ternes, 1992). Também é possível que os diterpenos estejam presentes na amostra ligados a outras moléculas ou o numa forma química diferente, não sendo a sua detecção possível pelo método HPLC (Tsukui et al., 2014).

Como descrito anteriormente, neste trabalho foi utilizado tanto a técnica de ionização ESI (*electrospray ionization*) como APCI (*atmospheric-pressure chemical ionization*) com o intuito de obter um maior número de compostos identificados. A ESI envolve a formação de íons pela interação de uma amostra líquida com uma fonte de alta tensão, resultando na produção de gotículas carregadas que eventualmente formam íons na fase gasosa. A ionização APCI, por outro lado, envolve a ionização de analitos através de reações químicas com íons gerados em uma descarga corona. A ESI é geralmente usada para compostos polares e moderadamente polares, enquanto a APCI é mais adequada para compostos apolares e moderadamente apolares. A ESI é conhecida pela sua alta sensibilidade e capacidade de analisar uma ampla gama de compostos, enquanto a APCI é preferida pela sua robustez e capacidade de lidar com taxas de fluxo mais altas (Brecht et al., 2020). Nesse estudo, a ESI demonstrou melhores resultados.

Cabral et al., (2013) fizeram uso da técnica de fácil ionização por spray sônico ambiente (EASI) e obtiveram uma boa identificação dos compostos da sucupira. A EASI funciona como um método suave, de baixo ruído, reproduzível e sensível (alta relação sinal-ruído) inerentemente livre de interferências elétricas, de descargas ou redox. Não utiliza aquecimento, nem tensões, nem lasers, nem descargas corona e baseia-se unicamente na ionização por spray sônico. Esse spray produz, quando auxiliado por um cilindro de N₂ comprimido ou mesmo uma lata de ar comprimido (Schwab et al., 2012), um fluxo supersônico de minúsculas gotículas bipolares carregadas do solvente, que são usadas para bombardear a superfície da amostra. A

técnica EASI-MS também demonstrou funcionar eficientemente para a caracterização direta e controle de qualidade de óleos (Cardoso et al., 2012; Riccio et al., 2011; Simas et al., 2010, 2012).

Quando comparado com a ESI, a EASI tem resolução espacial semelhante, mas um limite de detecção (LOD) inferior em uma ordem de magnitude (Saliu, 2022). Além disso, a EASI tem maior sensibilidade, conforme demonstrado pela maior intensidade do sinal nos espectros de massa (Xiaoyun et al., 2017). Assim, o uso da EASI segue como sugestão para trabalhos futuros já que não foi possível a sua utilização nesse trabalho.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho avaliou a utilização da extração assistida por ultrassom para obtenção do óleo de sucupira. A extração assistida por ultrassom mostrou-se um método eficaz para a obtenção do óleo de sucupira, otimizado com sucesso para uma concentração de etanol de 80% e uma intensidade de ultrassom de 90%. Os resultados indicaram que este método supera a abordagem convencional, como Soxhlet, proporcionando uma extração mais eficiente de lipídeos, resultando em um extrato rico em compostos antioxidantes. A análise da atividade antimicrobiana destacou o potencial do extrato contra bactérias gram-negativas, sugerindo sua aplicabilidade como agente antimicrobiano. As identificações de compostos pela CG-MS e LC-MS, incluindo sesquiterpenos e compostos fenólicos associados a diversas atividades biológicas, fundamentam cientificamente as propriedades benéficas da sucupira além de evidenciarem compostos com pouca ou nenhuma referência prévia conferindo um resultado bastante único deste trabalho. Este estudo não apenas contribui para a otimização de processos de extração em larga escala, mas também ressalta a importância do aprofundamento nas pesquisas sobre a sucupira, uma vez que seus extratos podem desempenhar um papel significativo na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos, oferecendo benefícios terapêuticos e antioxidantes valiosos.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para a continuidade desse trabalho, sugere-se:

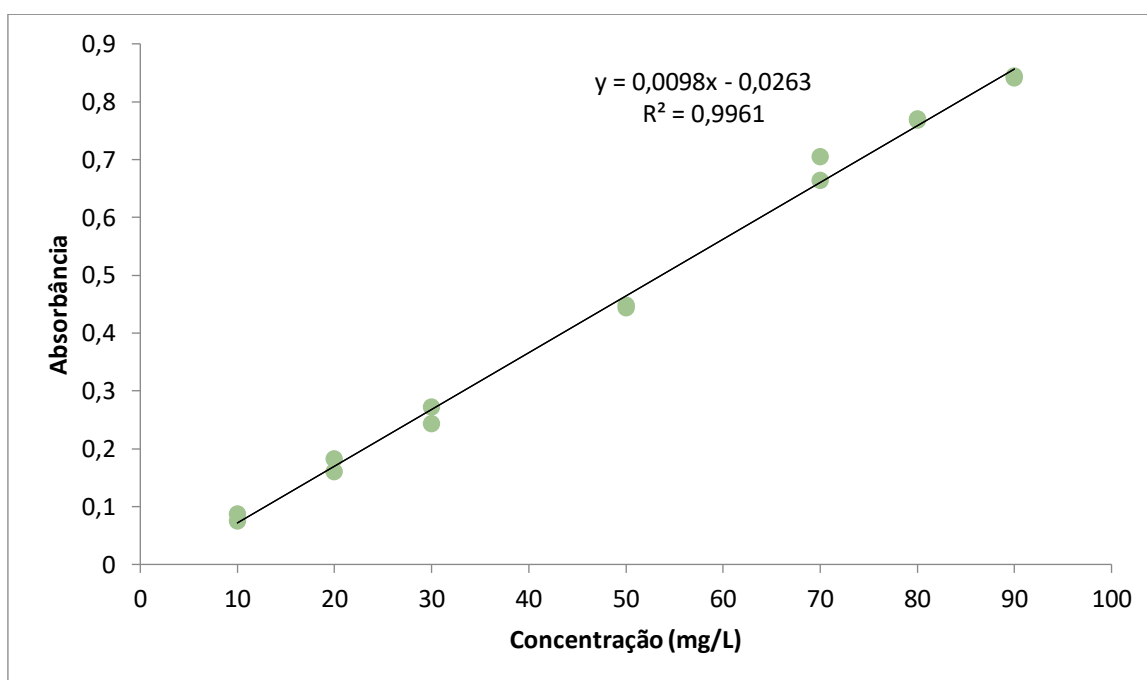
- obter o fruto da sucupira de diferentes origens uma vez que sua composição pode variar dependendo das condições de clima e composição do solo e avaliar a composição química e rendimento de extração de óleo;
- avaliar a capacidade antioxidante por diferentes métodos *in vitro* e *in vivo* para simular de forma mais adequada o mecanismo de ação desses compostos no organismo.
- estudar métodos de remoção de álcool e concentração do extrato com o intuito de obter uma CIM e avaliar sua viabilidade como antimicrobiano, em especial frente a *Salmonella*, a qual demonstrou ser a mais afetada nesse trabalho;
- realizar a microencapsulação do óleo de sucupira e/ou/com compostos de interesse e avaliar sua estabilidade para aplicação prática;
- utilizar outras técnicas de alta performance para identificar e quantificar os compostos presentes na sucupira, incluindo os compostos vouacapanos e o geranilgeraniol;
- realizar a microscopia eletrônica de transmissão para compreender como o óleo de sucupira age nas bactérias gram-negativas de modo a explicar como é alcançado a inibição.

APÊNDICE A – CAPACIDADE REDUTORA: CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A solução-estoque de ácido gálico (5000 mg/L) foi preparada pesando 0,125 g de ácido gálico dissolvido em balão de 25 mL com água ultrapura. Foi feita a pipetagem da solução de 20 a 180 μL (10 a 90 mg/L), obtendo 7 pontos, em balão volumétrico de 10 mL e completado com água ultrapura. Os ensaios de recuperação foram feitos pipetando 30, 120 e 150 μL da solução. O controle foi feito pipetando 100 μL .

O sistema reacional constituiu de 2000 μL . Em tubos de centrífuga foi transferido 850 μL de água ultrapura, seguido de 200 μL de cada concentração e 100 μL de Folin-Ciocalteu. No período de 30 segundos a 8 minutos foi adicionado 850 μL da solução carbonato de sódio (7%). Foi feita a homogeneização dos tubos que foram levados a repouso por 1 h protegidos da luz. Por fim, a absorbância foi medida a 765 nm, e o gráfico pode ser elaborado com concentração de ácido gálico em mg/L (eixo X) e absorbância (eixo Y). Com a regressão linear foi obtida a equação da reta.

Figura 21: Curva analítica do ácido gálico para análise da capacidade redutora.



APÊNDICE B – MÉTODO TROLOX: CURVA PADRÃO

Para a construção da curva analítica Trolox ($MM = 250,29$), foi preparado uma solução-estoque de trolox $10.000 \mu\text{M}$, pesando $0,025 \text{ g}$ de trolox em balão volumétrico de 10 mL e dissolvendo com etanol. Em seguida, foi preparada a solução-trabalho de trolox $1.000 \mu\text{M}$, transferindo $100 \mu\text{L}$ da solução-estoque para eppendorf com $900 \mu\text{L}$ de etanol e homogeneizado. Para construir a curva foi utilizado 7 pontos de acordo com a Tabela 10:

Tabela 18 - Pontos da curva analítica Trolox para avaliação da atividade antioxidante

| Ponto | Concentração (μM) | Solução-trabalho (μL) | Etanol (μL) |
|-------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| P1 | 20 | 20 | 980 |
| P2 | 25 | 25 | 975 |
| P3 | 50 | 50 | 950 |
| P4 | 100 | 100 | 900 |
| P5 | 120 | 120 | 880 |
| P6 | 150 | 150 | 850 |
| P7 | 170 | 170 | 830 |

APÊNDICE C – ÍNDICE DE PERÓXIDO: FATOR DE CORREÇÃO DA SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO

Para obter o fator de correção da solução de tiossulfato de sódio 0,1N, foi pesado 0,5 g de dicromato de potássio em cadinho de Gooch que foi aquecido por 1h a 150 °C e resfriado. Em Erlenmeyer foi adicionado 0,3 g de iodeto de potássio, 0,12 g do dicromato de potássio em alumínio, 10 mL de água destilada e 60 mL de ácido clorídrico. O frasco foi tampado, agitado e deixado para repouso por 5 minutos. Foi feita a titulação do iodo liberado pela solução do tiossulfato de sódio até a coloração amarelo claro ser revelada. Foi adicionado 2,0 mL da solução de amido alterando a coloração para azul. Novamente a titulação foi feita, desta vez até a coloração azul desaparecer. O cálculo foi feito pela seguinte Equação 12:

$$\text{Fator de correção (FC)} = \frac{P}{(0,049 \times V \times N)} \quad (10)$$

em que P é peso do dicromato de potássio utilizado, V é o volume de tiossulfato de sódio, em mL, gasto na titulação, e N é normalidade da solução.

APÊNDICE D – ESQUEMA DE PREPARO DA MICROPLACA PARA ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Tabela 19 - Representação da microplaca de 96 poços na execução da análise da concentração inibitória mínima

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| A | 0 µL MH 100 µL PB | 10 µL MH 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL PB |
| B | 10 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | |
| C | 10 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | |
| D | 10 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | |
| E | 10 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | |
| F | 10 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | |
| G | 10 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | |
| H | 10 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 20 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 30 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 40 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 50 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 60 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 70 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 80 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 90 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | 100 µL MH 100 µL AM 100 µL PB | |

MH: Muller-Hilton; AM: antimicrobiano; PB: *pool* bacteriano. Após o período da placa na estufa, foi adicionado ainda 20 µL do corante resazurina, em todos os poços, como parte final do procedimento. As linhas B, C, D, E, F, G e H representaram, respectivamente, BT1, ET1-05, ET1-10, ET1-15, BT2, ET2-10 e ET2-20.

APÊNDICE E - CROMATOGRAMAS GC-FID E GC-MS ORIUNDOS DA EXTRAÇÃO EXAUSTIVA E DO EXTRATO OTIMIZADO

O sistema Multi-Deans permite realizar a separação cromatográfica utilizando duas colunas de diferentes características. Compostos que não apresentam uma separação clara na primeira coluna podem ser direcionados para a segunda (*heart-cut*).

As Figuras 22 e 23 apresentam os cromatogramas obtidos para o extrato da sucupira oriundo da extração exaustiva. O primeiro sendo com o detector FID, e o segundo sendo de uma segunda corrida da mesma amostra que teve um intervalo levado para identificação dos compostos no massas (quadrupolo). O início da corrida foi descartado por tratar dos solventes.

As Figuras 24 e 25 apresentam os cromatogramas obtidos para o extrato da sucupira oriundo do ponto otimizado. O primeiro sendo com o detector FID, e o segundo sendo de uma segunda corrida da mesma amostra que teve um intervalo levado para identificação dos compostos no massas (quadrupolo). O início da corrida foi descartado por tratar dos solventes.

Figura 22: Cromatograma obtido via CG-FID para o extrato da sucupira obtido por extração exaustiva.

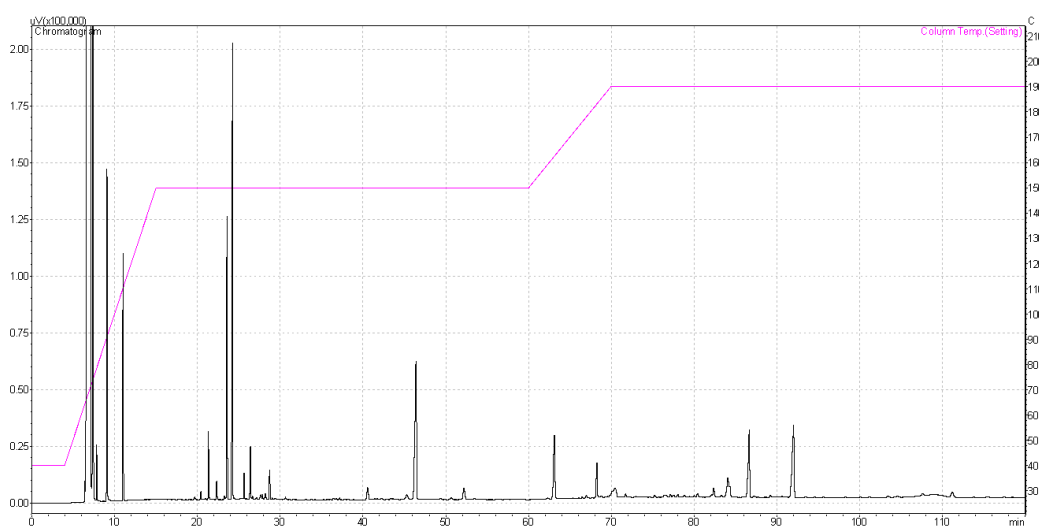


Figura 23: Cromatograma obtido via CG-MS para o extrato da sucupira obtido por extração exaustiva

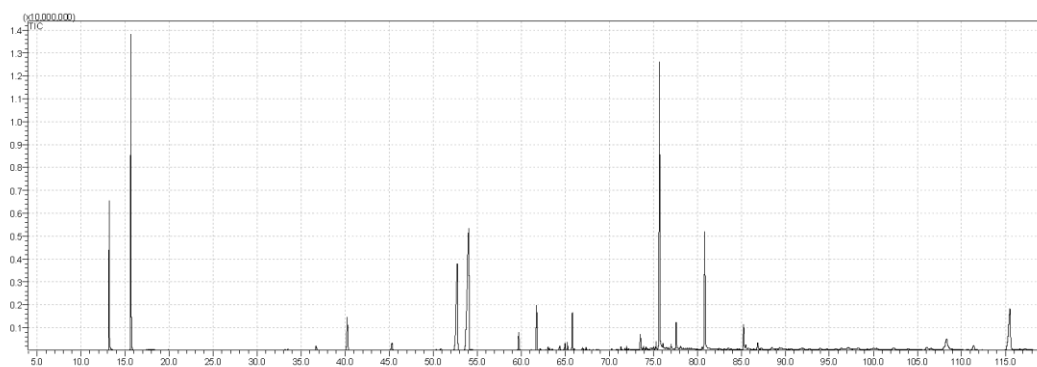


Figura 24: Cromatograma obtido via CG-FID para o extrato da sucupira no ponto otimizado.

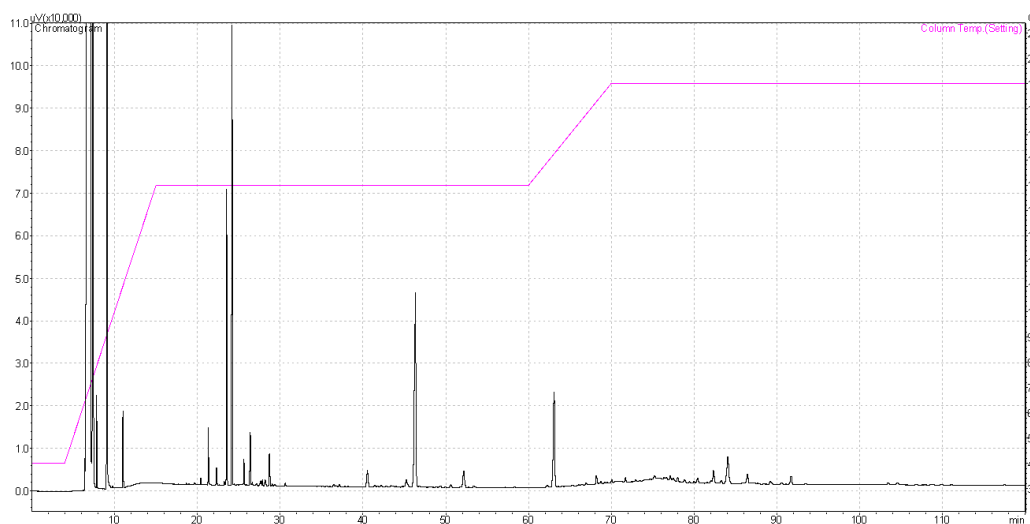
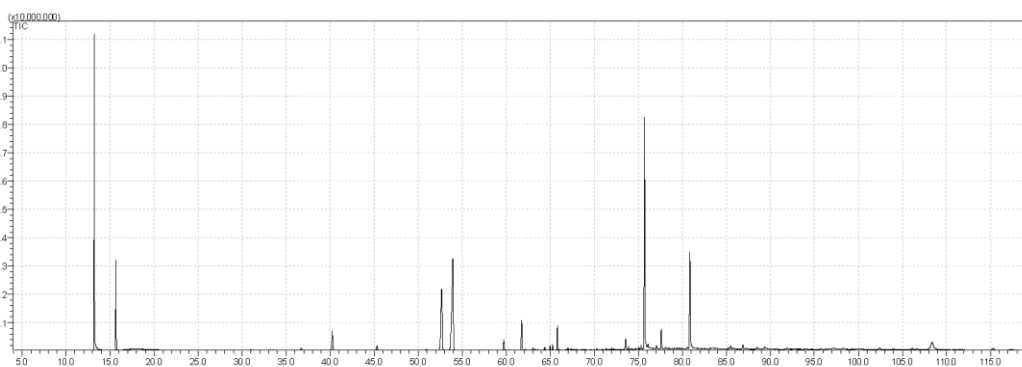


Figura 25: Cromatograma obtido via CG-MS para o extrato da sucupira no ponto otimizado.



8 REFERÊNCIAS

- Aguirre-Becerra, H., Vazquez-Hernandez, M. C., Saenz de la O, D., Alvarado-Mariana, A., Guevara-Gonzalez, R. G., Garcia-Trejo, J. F., & Feregrino-Perez, A. A. (2021). *Role of Stress and Defense in Plant Secondary Metabolites Production BT - Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications* (D. Pal & A. K. Nayak (eds.); pp. 151–195). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54027-2_5
- Akçura, S. (2023). Biplot analysis of monthly variations in essential oil concentration and chemical composition of *Pittosporum tobira* leaves in Mediterranean conditions. *Biochemical Systematics and Ecology*, *110*(August), 104712. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104712>
- Al-Dhabi, N. A., & Ponmurugan, K. (2020). Microwave assisted extraction and characterization of polysaccharide from waste jamun fruit seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 1157–1163. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.204>
- Al-Huqail, A. A., Behiry, S. I., Salem, M. Z. M., Ali, H. M., Siddiqui, M. H., & Salem, A. Z. M. (2019). Antifungal, antibacterial, and antioxidant activities of *Acacia saligna* (Labill.) H. L. Wendl. Flower extract: HPLC analysis of phenolic and flavonoid compounds. *Molecules*, *24*(4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040700>
- Al-Otoom, A., Al-Asheh, S., Allawzi, M., Mahshi, K., Alzenati, N., Banat, B., & Alnimr, B. (2014). Extraction of oil from uncrushed olives using supercritical fluid extraction method. *Journal of Supercritical Fluids*, *95*, 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.023>
- Al Khawli, F., Martí-Quijal, F. J., Pallarés, N., Barba, F. J., & Ferrer, E. (2021). Ultrasound extraction mediated recovery of nutrients and antioxidant bioactive compounds from *phaeodactylum tricornutum* microalgae. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/app11041701>
- Alcantara, J. De, Eliza, A., Oliveira, M. F. M., Silva, R., Townsend, D. M., Antonio, L., Ferreira, M., Luis, A., & Barros, B. De. (2021). Biomedicine & Pharmacotherapy Recent progress in micro and nano-encapsulation of bioactive derivatives of the Brazilian genus *Pterodon*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *143*(August), 112137.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112137>

- Ali, A. M., Gabbar, M. A., Abdel-Twab, S. M., Fahmy, E. M., Ebaid, H., Alhazza, I. M., & Ahmed, O. M. (2020). Antidiabetic Potency, Antioxidant Effects, and Mode of Actions of Citrus reticulata Fruit Peel Hydroethanolic Extract, Hesperidin, and Quercetin in Nicotinamide/Streptozotocin-Induced Wistar Diabetic Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1730492>
- Altemimi, A., Watson, D. G., Choudhary, R., Dasari, M. R., & Lightfoot, D. A. (2016). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins. *PLoS ONE*, 11(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148758>
- Alves, S. F., Borges, L. L., de Paula, J. A. M., Vieira, R. F., Ferri, P. H., Couto, R. O. do, Paula, J. R. de, & Bara, M. T. F. (2013). Chemical variability of the essential oils from fruits of Pterodon emarginatus in the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 224–229.
- Ambrož, M., Matoušková, P., Skarka, A., Zajdlová, M., Žáková, K., & Skálová, L. (2017). The effects of selected sesquiterpenes from myrica rubra essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/molecules22061021>
- Ambrož, M., Šmatová, M., Šadibolová, M., Pospíšilová, E., Hadravská, P., Kašparová, M., Skarková, V. H., Králová, V., & Skálová, L. (2019). Sesquiterpenes α -humulene and β -caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. *Acta Pharmaceutica*, 69(1), 121–128. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0003>
- Amorati, R., Baschieri, A., Cowden, A., & Valgimigli, L. (2017). The antioxidant activity of quercetin in water solution. *Biomimetics*, 2(3), 6–9. <https://doi.org/10.3390/biomimetics2030009>
- Amzad Hossain, M., & Salehuddin, S. M. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible oils by gas chromatography coupled with mass spectroscopy. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(3), 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.012>
- Andreo, D., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(2), 319–336. <https://doi.org/10.5380/cep.v24i2.7489>

- Andreou, V., Dimopoulos, G., Dermesonlouoglou, E., & Taoukis, P. (2020). Application of pulsed electric fields to improve product yield and waste valorization in industrial tomato processing. *Journal of Food Engineering*, 270, 109778. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109778>
- Aquino, F. de G., Walter, B. M. T., & Ribeiro, J. F. (2007). Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de cerrado-Balsas, MA. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo Em Periódico Indexado (ALICE)*.
- Arakaki, R., Ushio, A., Kisoda, S., Sato, M., Nakamura, Y., Yuyama, K., Tateyama, R., Morishita, S., Monoi, N., Kudo, Y., & Ishimaru, N. (2019). Novel effects of rooibos extract on tear and saliva secretion mediated by the muscarinic acetylcholine receptor 3 in mice. *Journal of Oral Biosciences*, 61(3), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.job.2019.06.001>
- Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2018). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009>
- Arrais-Silva, W. W., Nunes, P. S. G., Carvalho, J. D., Brune, M. W., Arrais-Lima, C., & Batalini, C. (2014). Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of *Pterodon pudescens*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 16, 561–565.
- Arriaga, A. M. C., De Castro, M. A. B., Silveira, E. R., & Braz-Filho, R. (2000). Further Diterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11(2), 187–190. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532000000200015>
- Arrutia, F., Adam, M., Calvo-Carrascal, M. Á., Mao, Y., & Binner, E. (2020). Development of a continuous-flow system for microwave-assisted extraction of pectin-derived oligosaccharides from food waste. *Chemical Engineering Journal*, 395, 125056. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125056>
- Artem'Eva, O. A., Pereselkova, D. A., & Yu, P. F. (2015). Dihydroquercetin, the bioactive substance, to be used against pathogenic microorganisms as an alternative to antibiotics. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 50(4), 513–519. <https://doi.org/10.15389/agrobiolgy.2015.4.513rus>
- Asif, M., Shafaei, A., Jafari, S. F., Mohamed, S. K., Ezzat, M. O., Abdul Majid, A. S., Oon, C. E., Petersen, S. H., Kono, K., & Abdul Majid, A. M. S. (2016). Isoledene from *Mesua ferrea* oleo-gum resin induces apoptosis in HCT 116 cells through ROS-mediated

- modulation of multiple proteins in the apoptotic pathways: A mechanistic study. *Toxicology Letters*, 257, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.05.027>
- Asmi, K. S., Lakshmi, T., Balusamy, S. R., & Parameswari, R. (2017). Therapeutic aspects of taxifolin - An update. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 7(3), 187–189.
- Avello, D. E., Lozano-Castellón, J., Mardones, C., Pérez, A. J., Saéz, V., Riquelme, S., Baer, D. von, & Queralt, A. V. (2019). Phenolic profile of grape canes: Novel compounds identified by LC-ESI-LTQ-orbitrap-MS. *Molecules*, 24(20), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24203763>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bae, J. H., Kim, J. Y., Kim, M. J., Chang, S. H., Park, Y. S., Son, C. H., Park, S. J., Chung, J. S., Lee, E. Y., Kim, S. H., & Kang, C. D. (2010). Quercetin enhances susceptibility to NK cell-mediated lysis of tumor cells through induction of NKG2D ligands and suppression of HSP70. *Journal of Immunotherapy*, 33(4), 391–401. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181d32f22>
- Baek, K. S., Yi, Y. S., Son, Y. J., Jeong, D., Sung, N. Y., Aravinthan, A., Kim, J. H., & Cho, J. Y. (2017). Comparison of anticancer activities of Korean red ginseng-derived fractions. *Journal of Ginseng Research*, 41(3), 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.11.001>
- Baek, K. S., Yi, Y. S., Son, Y. J., Yoo, S., Sung, N. Y., Kim, Y., Hong, S., Aravinthan, A., Kim, J. H., & Cho, J. Y. (2016). In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of Korean red Ginseng-derived components. *Journal of Ginseng Research*, 40(4), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.08.003>
- Bai, Z., Yao, C., Zhu, J., Xie, Y., Ye, X. Y., Bai, R., & Xie, T. (2021). Anti-tumor drug discovery based on natural product β -elemene: Anti-tumor mechanisms and structural modification. *Molecules*, 26(6). <https://doi.org/10.3390/molecules26061499>
- Baranwal, A., Aggarwal, P., Rai, A., & Kumar, N. (2022). Pharmacological actions and underlying mechanisms of catechin: A review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 22(5), 821–833.

- Belinelo, V. J., Reis, G. T., Stefani, G. M., & Ferreira-alves, D. L. (2002). Derivatives and its Activities on the Electrically Stimulated Guinea-pig Ileum Preparation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *13*(6), 830–837.
- Belwal, T., Chemat, F., Venskutonis, P. R., Cravotto, G., Jaiswal, D. K., Bhatt, I. D., Devkota, H. P., & Luo, Z. (2020). Recent advances in scaling-up of non-conventional extraction techniques: Learning from successes and failures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *127*, 115895. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115895>
- Bempelou, E., Anagnostopoulos, C., & Liapis, K. (2019). Investigation of naphthalene contamination in olive oil from Greece. *Toxicological and Environmental Chemistry*, *101*(1–2), 45–58. <https://doi.org/10.1080/02772248.2019.1621313>
- Berndmeyer, C., Thiel, V., & Blumenberg, M. (2014). Test of microwave, ultrasound and Bligh & Dyer extraction for quantitative extraction of bacteriohopanepolyols (BHPs) from marine sediments. *Organic Geochemistry*, *68*, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2014.01.003>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917.
- Both, S., Chemat, F., & Strube, J. (2014). Extraction of polyphenols from black tea - Conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(3), 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.005>
- Botrel, P. P., Pinto, J. E. B. P., Araújo, A. C. C. de, Bertolucci, S. K. V., Figueiredo, F. C., Ferri, P. H., & Costa, D. P. da. (2010). Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* EPL: cultivada no campo e em casa de vegetação. *Química Nova*, *33*(1), 33–37. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000100007>
- Braune, A., Gütschow, M., Engst, W., & Blaut, M. (2001). Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(12), 5558–5567. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5558-5567.2001>
- Braz-Filho, R., Gottlieb, O. R., & Assunção, R. M. V. (1971). *LEGUMINOSAE THE ISOFLAVONES OF PTERODON is native to the savannahs of Central and Southern Brazil . The fruits contain geranylgeraniol , all-trans (-) -14 , 15epoxygeranyl- geraniol , 3 besides two additional diterpenes4 and alkaloids . 5 The wood is su. 10*(1959), 1969–1970.

- Brecht, D., Uteschil, F., & Schmitz, O. J. (2020). Development of a fast-switching dual (ESI/APCI) ionization source for liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *34*(17), 0–3. <https://doi.org/10.1002/rcm.8845>
- Bustamante, K. de G. L., Lima, A. D. F., Soares, M. L., Fiuza, T. de S., Tresvenzol, L. M. F., Bara, M. T. F., Pimenta, F. C., & Paula, J. R. (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel)-Fabaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *12*, 341–345.
- Cabral, E. C., Severt, L., Spindola, H. M., Coelho, M. B., Sousa, I. M. O., Queiroz, N. C. A., Foglio, M. A., Eberlin, M. N., & Riveros, J. M. (2013). *Pterodon pubescens* Oil: Characterisation, certification of origin and quality control via mass spectrometry fingerprinting analysis. *Phytochemical Analysis*, *24*(2), 184–192. <https://doi.org/10.1002/pca.2404>
- Calixto, N. O., E Silva, M. C. D. C., Gayer, C. R. M., Coelho, M. G. P., Paes, M. C., & Todeschini, A. R. (2007). Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. *Planta Medica*, *73*(5), 480–483. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967177>
- Campos, A. M., Silveira, E. R., Braz-Filho, R., & Teixeira, T. C. (1994). Diterpenoids from *Pterodon polygalaeiflorus*. *Phytochemistry*, *36*(2), 403–406.
- Cardoso, C. C., Pinto, A. C., Marques, P. R., Gayer, C. R. M., Afel, M. I. R., Coelho, M. G. P., & Sabino, K. C. C. (2008). Suppression of T and B cell responses by *Pterodon pubescens* seeds ethanolic extract. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *11*(19), 2308–2313.
- Cardoso, K. C., Da Silva, M. J., Grimaldi, R., Stahl, M., Simas, R. C., Cunha, I. B. S., Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2012). TAG profiles of *Jatropha curcas* L. seed oil by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *89*(1), 67–71. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1888-7>
- Carneiro, N. S., Alves, C. C. F., Alves, J. M., Egea, M. B., Martins, C. H. G., Silva, T. S., Bretanha, L. C., Balleste, M. P., Micke, G. A., Silveira, E. V., & Miranda, M. L. D. (2017). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, *89*(3), 1907–1915. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160652>
- Carrasco-Pozo, C., Cires, M. J., & Gotteland, M. (2019). Quercetin and epigallocatechin gallate

- in the prevention and treatment of obesity: From molecular to clinical studies. *Journal of Medicinal Food*, 22(8), 753–770.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- Carrillo-Hormaza, L., Duque, L., López-Parra, S., & Osorio, E. (2020). High-intensity ultrasound-assisted extraction of Garcinia madruno biflavonoids: Mechanism, kinetics, and productivity. *Biochemical Engineering Journal*, 161(52), 107676. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107676>
- Carvalho, C. S. (2020). Pterodon in Flora do Brasil 2020 em construção. *Jardim Botânico Do Rio de Janeiro*. Disponível Em:< [Http://Reflora. Jbrj. Gov. Br/Reflora/Floradobrasil/FB29842](Http://Reflora.Jbrj.Gov.Br/Reflora/Floradobrasil/FB29842)>. Acesso Em, 27.
- CDC. (2008). Chemical Disinfectants - Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (2008) Alcohol. *Annual Review of Microbiology*, 2 (1 vol.)(2008), 413–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.02.100148.002213>
- Ceramella, J., Caruso, A., Occhiuzzi, M. A., Iacopetta, D., Barbarossa, A., Rizzuti, B., Dallemagne, P., Rault, S., El-Kashef, H., Saturnino, C., Grande, F., & Sinicropi, M. S. (2019). Benzothienoquinazolinones as new multi-target scaffolds: Dual inhibition of human Topoisomerase I and tubulin polymerization. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 181). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111583>
- Chakraborty, S., Uppaluri, R., & Das, C. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter melon using response surface methodology (RSM). In *Food and Bioproducts Processing* (Vol. 120). Institution of Chemical Engineers. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.003>
- Chanoti, S., Liadakis, G., & Tzia, C. (2014). *Solid-Liquid Extraction*. <https://doi.org/10.1201/b17803-7>
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41(February), 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>

- Chen, X., Gu, N., Xue, C., & Li, B. R. (2018). Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Molecular Medicine Reports*, *17*(2), 3239–3245. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8271>
- Chieng, T. C., Assim, Z. B., & Fasihuddin, B. A. (2008). Toxicity and Antitermite Activities of The Essential Oils from Piper sarmentosum. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, *12*(1), 234–239.
- Chobot, V., Hadacek, F., Bachmann, G., Weckwerth, W., & Kubicova, L. (2016). Pro- and antioxidant activity of three selected flavan type flavonoids: Catechin, eriodictyol and taxifolin. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17121986>
- Choi, M. R., Kwak, S. M., Bang, S. H., Jeong, J. E., & Kim, D. J. (2017). Chronic saponin treatment attenuates damage to the pancreas in chronic alcohol-treated diabetic rats. *Journal of Ginseng Research*, *41*(4), 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.09.002>
- Choubey, S., Varughese, L. R. ache., Kumar, V., & Beniwal, V. (2015). Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharmaceutical Patent Analyst*, *4*(4), 305–315. <https://doi.org/10.4155/ppa.15.14>
- Choulis, N. H. (2011). Miscellaneous drugs, materials, medical devices, and techniques. In *Side Effects of Drugs Annual* (1st ed., Vol. 33, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53741-6.00049-0>
- Chuyen, H. V., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Golding, J. B., & Parks, S. E. (2018). Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Science and Nutrition*, *6*(1), 189–196. <https://doi.org/10.1002/fsn3.546>
- Coelho, L. P., Reis, P. A., de Castro, F. L., Gayer, C. R. M., da Silva Lopes, C., e Silva, M. C. da C., de Carvalho Sabino, K. C., Todeschini, A. R., & Coelho, M. G. P. (2005). Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, *98*(1–2), 109–116.
- Commission, C. A. (2008). *Codex-Stan 210: codex standard for named vegetable oils*.
- Costa-Singh, T., & Jorge, N. (2019). Characterization of seed oils of *Pterodon emarginatus* Vogel (Sucupira) obtained by different extraction methods. *Brazilian Archives of Biology*

- and Technology*, 62, 1–15. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019170758>
- Costa, D. P., Santos, S. C., Seraphin, J. C., & Ferri, P. H. (2009). Seasonal variability of essential oils of eugenia uniflora leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(7), 1287–1293. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000700013>
- Couto, D., Melo, T., Conde, T. A., Moreira, A. S. P., Ferreira, P., Costa, M., Silva, J., Domingues, R., & Domingues, P. (2022). Food grade extraction of Chlorella vulgaris polar lipids: A comparative lipidomic study. *Food Chemistry*, 375(July 2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131685>
- Crews, C., Hough, P., Brereton, P., Godward, J., Lees, M., Guiet, S., & Winkelmann, W. (2006). Quantitation of the main constituents of some authentic sesame seed oils of different origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6266–6270. <https://doi.org/10.1021/jf0603578>
- Cruz, P. N., Pereira, T. C. S., Guindani, C., Oliveira, D. A., Rossi, M. J., & Ferreira, S. R. S. (2017). Antioxidant and antibacterial potential of butia (Butia catarinensis) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.09.022>
- da Silva Santos, É., Garcia, F. P., Outuki, P. M., Hoscheid, J., Nunes de Goes, P. R., Cardozo-Filho, L., Nakamura, C. V., & Carvalho Cardoso, M. L. (2016). Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of Pterodon pubescens benth. fruit extracts. *Experimental Parasitology*, 170, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.004>
- De Fátima Reis, C., De Andrade, D. M. L., Neves, B. J., De Almeida Ribeiro Oliveira, L., Pinho, J. F., Da Silva, L. P., Cruz, J. D. S., Bara, M. T. F., Andrade, C. H., & Rocha, M. L. (2015). Blocking the L-type Ca²⁺ channel (Cav 1.2) is the key mechanism for the vascular relaxing effect of Pterodon spp. and its isolated diterpene methyl-6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapan-17 β -oate. *Pharmacological Research*, 100, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.007>
- de Moraes, W. F., Galdino, P. M., Nascimento, M. V. M., Vanderlinde, F. A., Bara, M. T. F., Costa, E. A., & de Paula, J. R. (2012). Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Pterodon emarginatus Vogel stem bark. *Journal of Natural Medicines*, 66(1), 202–207.

- De Oliveira, R. C., Davantel De Barros, S. T., & Gimenes, M. L. (2013). The extraction of passion fruit oil with green solvents. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.004>
- De Omena, M. C., Bento, E. S., De Paula, J. E., & Sant' Ana, A. E. G. (2006). Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *6*(2), 216–222. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.6.216>
- De Roos, N. M., Schouten, E. G., & Katan, M. B. (2001). Human nutrition and metabolism: Consumption of a solid fat rich in lauric acid results in a more favorable serum lipid profile in healthy men and women than consumption of a solid fat rich in trans-fatty acids. *Journal of Nutrition*, *131*(2), 242–245. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.242>
- Demuner, A. J., De Almeida Barbosa, L. C., Veloso, D. P., Alves, D. L. F., & Howarth, O. W. (1996). Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. *Journal of Natural Products*, *59*(8), 770–772. <https://doi.org/10.1021/np960140f>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, *12*(4), 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Díaz, A., Muñoz-Arenas, G., Caporal-Hernandez, K., Vázquez-Roque, R., Lopez-Lopez, G., Kozina, A., Espinosa, B., Flores, G., Treviño, S., & Guevara, J. (2021). Gallic acid improves recognition memory and decreases oxidative-inflammatory damage in the rat hippocampus with metabolic syndrome. *Synapse*, *75*(2), e22186.
- do Nascimento, K. F., Moreira, F. M. F., Alencar Santos, J., Kassuya, C. A. L., Croda, J. H. R., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. do C., Góis Ruiz, A. L. T., Ann Foglio, M., de Carvalho, J. E., & Formagio, A. S. N. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of Ethnopharmacology*, *210*(August 2017), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.030>
- do Prado, D. M. F., de Almeida, A. B., de Oliveira Filho, J. G., Alves, C. C. F., Egea, M. B., & Lemes, A. C. (2021). Extraction of bioactive proteins from seeds (corn, sorghum, and

- sunflower) and sunflower byproduct: Enzymatic hydrolysis and antioxidant properties. *Current Nutrition & Food Science*, 17(3), 310–320.
- Dok-Go, H., Lee, K. H., Kim, H. J., Lee, E. H., Lee, J., Song, Y. S., Lee, Y. H., Jin, C., Lee, Y. S., & Cho, J. (2003). Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Brain Research*, 965(1–2), 130–136. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04150-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04150-1)
- Donati, M., Mondin, A., Chen, Z., Miranda, F. M., Do Nascimento, B. B., Schirato, G., Pastore, P., & Frolidi, G. (2015). Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: Estragole, trans -anethole, β -caryophyllene and myrcene. *Natural Product Research*, 29(10), 939–946. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.964709>
- Dos Santos, E., Radai, J. A. S., do Nascimento, K. F., Formagio, A. S. N., de Matos Balsalobre, N., Ziff, E. B., Castelon Konkiewitz, E., & Kassuya, C. A. L. (2022). Contribution of spathulenol to the anti-nociceptive effects of *Psidium guineense*. *Nutritional Neuroscience*, 25(4), 812–822. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1815330>
- Dos Santos, S. S., Paraíso, C. M., Rodrigues, L. M., & Madrona, G. S. (2021). Agro-industrial waste as a source of bioactive compounds: Ultrasound-assisted extraction from blueberry (*vaccinium myrtillus*) and raspberry (*rubus idaeus*) pomace. *Acta Scientiarum - Technology*, 43, 1–8. <https://doi.org/10.4025/ACTASCITECHNOL.V43I1.55567>
- Dostal, Z., Sebera, M., Srovnal, J., Staffova, K., & Modriansky, M. (2021). Dual effect of taxifolin on ZEB2 cancer signaling in HepG2 Cells. *Molecules*, 26(5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051476>
- Duarte, A. (2008). *Composição e variabilidade química dos óleos essenciais das folhas e frutos de Eugenia dysenterica*. Universidade Federal de Goiás - Instituto de Química. 2008. *Dissertação de mestrado*.
- Dutra, R. C. (2008). *Avaliações fitoquímica e farmacológica das sementes de Pterodon emarginatus Vogel*. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora Juiz
- Dutra, R. C., Braga, F. G., Coimbra, E. S., Silva, A. D., & Barbosa, N. R. (2009). Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. *Revista*

Brasileira de Farmacognosia, 19, 429–435.

- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112, 4–29. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2016.01.021>
- Dutra, R. C., Leite, M. N., & Barbosa, N. R. (2008). Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(4), 606–614. <https://doi.org/10.3390/ijms9040606>
- Dutra, R. C., Pittella, F., Dittz, D., Marcon, R., Pimenta, D. S., Lopes, M. T. P., & Raposo, N. R. B. (2012). Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 971–978.
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Dzul-Beh, A. de J., García-Sosa, K., Uc-Cachón, A. H., Bórquez, J., Loyola, L. A., Barrios-García, H. B., Peña-Rodríguez, L. M., & Molina-Salinas, G. M. (2019). In vitro growth inhibition and bactericidal activity of spathulenol against drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(6), 798–800. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.06.001>
- El-Toumy, S. A., Salib, J. Y., El-Kashak, W. A., Marty, C., Bedoux, G., & Bourgougnon, N. (2018). Antiviral effect of polyphenol rich plant extracts on herpes simplex virus type 1. *Food Science and Human Wellness*, 7(1), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.01.001>
- El Hadri, A., Del Río, M. Á. G., Sanz, J., Coloma, A. G., Idaomar, M., Ozonas, B. R., González, J. B., & Reus, M. I. S. (2010). Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 76(3), 343–356.
- El Kantar, S., Boussetta, N., Lebovka, N., Foucart, F., Rajha, H. N., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2018). Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 46, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.024>

- Elbarbry, F., Abdelkawy, K., Moshirian, N., & Abdel-Megied, A. M. (2020). The antihypertensive effect of quercetin in young spontaneously hypertensive rats; role of arachidonic acid metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms21186554>
- Epanand, R. M., Walker, C., Epanand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1858*(5), 980–987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.018>
- Euzébio, F. P. G., dos Santos, F. J. L., Piló-Veloso, D., Ruiz, A. L. T. G., de Carvalho, J. E., Ferreira-Alves, D. L., & Fátima, Â. de. (2009). Effect of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, *37*(3), 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2009.03.004>
- Evangelista, G. L., Coelho-de-Souza, A. N., Santos, C. F., Leal-Cardoso, J. H., Lopes, E. A. B., dos Santos, M. V., Lahlou, S., & Magalhães, P. J. C. (2007). Essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. *Journal of Ethnopharmacology*, *109*(3), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.028>
- Fascio, M. et al. (1976). Diterpenoid Furans from *Pterodon* Species. *Phytochemistry*.
- Fascio, M., Gilbert, B., Mors, W. B., & Nishida, T. (1970). Two new diterpenes from *Pterodeon pubescens* Beth. *Acad Brasil Cienc An*.
- Fascio, M., Mors, W. B., Gilbert, B., Mahajan, J. R., Monteiro, M. B., Dos Santos Filho, D., & Vichnewski, W. (1975). *Diterpenoid furan from Pterodon species*.
- Fei, F., Bowdish, D. M. E., & McCarry, B. E. (2014). Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(15), 3723–3733. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7797-5>
- Ferreira, R. A., Vieira, M. G. G. C., Pinho, É. V. R. V., & Tonetti, O. A. O. (2001). Morfologia da semente e de plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. – Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, *23*(1), 108–115. <https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v23n1p108-115>
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., & Szumny, A. (2016). B-Caryophyllene and B-Caryophyllene Oxide—Natural Compounds of Anticancer and Analgesic Properties.

- Cancer Medicine*, 5(10), 3007–3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497–509.
- Food and Drug Administration. (2010). Food labeling; health claim; phytosterols and risk of coronary heart disease; proposed rule. *Federal Register*, 75(235), 76526–76571.
- Fujimura, Y., Kumazoe, M., & Tachibana, H. (2022). 67-kDa Laminin Receptor-Mediated Cellular Sensing System of Green Tea Polyphenol EGCG and Functional Food Pairing. *Molecules*, 27(16). <https://doi.org/10.3390/molecules27165130>
- Galceran, C. B., Sertie, J. A. A., Lima, C. S., & Carvalho, J. C. T. (2011). Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α ,7 β -dihydroxy- vouacapan-1 β 7-oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. *Inflammopharmacology*, 19(3), 139–143. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0081-9>
- Galvan D'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>
- Garavand, F., Rahae, S., Vahedikia, N., & Jafari, S. M. (2019). Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 89, 26–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.005>
- Ge, F., Tian, E., Wang, L., Li, X., Zhu, Q., Wang, Y., Zhong, Y., & Ge, R. S. (2018). Taxifolin suppresses rat and human testicular androgen biosynthetic enzymes. *Fitoterapia*, 125(January), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.01.017>
- Gendrisch, F., Esser, P. R., Schempp, C. M., & Wölflle, U. (2021). Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation. *BioFactors*, 47(2), 170–180. <https://doi.org/10.1002/biof.1699>
- German, J. B. (2011). Dietary lipids from an evolutionary perspective: Sources, structures and functions. *Maternal and Child Nutrition*, 7(SUPPL. 2), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2011.00300.x>
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J. Z., Xie, X. Q., Altmann, K. H., Karsak, M., & Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 9099–9104.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>

- Giarola, L. R., Coco, J. C., Sousa, I. M. de O., Cefali, L. C., Ataide, J. A., Tavares, G. D., Rodrigues, R. A. F., Foglio, M. A., & Mazzola, P. G. (2022). Pterodon pubescens Benth (sucupira) microencapsulation influence on formulation stability outcome compared to non-encapsulated extract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 67(September 2021), 102875. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102875>
- Goes, P. R. N. de, Hoscheid, J., Silva-Filho, S. E., Froehlich, D. L., Pelegri, B. L., Canoff, J. R. A., Lima, M. M. S., Cuman, R. K. N., & Cardoso, M. L. C. (2020). Rheological behavior and antiarthritic activity of Pterodon pubescens nanoemulsion. *Kaos GL Dergisi*, 8(75), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125798> <https://doi.org/10.1016/j.smr.2020.02.002> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/810049> <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.197505391> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090409500205> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090409500205>
- Gong, P., Wang, S., Liu, M., Chen, F., Yang, W., Chang, X., Liu, N., Zhao, Y., Wang, J., & Chen, X. (2020). Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research*, 494, 108037. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108037>
- Gotoh, N., & Wada, S. (2006). The importance of peroxide value in assessing food quality and food safety. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(5), 473.
- Gu, L. B., Zhang, G. J., Du, L., Du, J., Qi, K., Zhu, X. L., Zhang, X. Y., & Jiang, Z. H. (2019). Comparative study on the extraction of Xanthoceras sorbifolia Bunge (yellow horn) seed oil using subcritical n-butane, supercritical CO₂, and the Soxhlet method. *Lwt*, 111, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.078>
- Gunesch, S., Hoffmann, M., Kiermeier, C., Fischer, W., Pinto, A. F. M., Maurice, T., Maher, P., & Decker, M. (2020). 7-O-Esters of taxifolin with pronounced and overadditive effects in neuroprotection, anti-neuroinflammation, and amelioration of short-term memory impairment in vivo. *Redox Biology*, 29(November 2019), 101378. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101378>
- Guo, L., Cao, J. hui, Wei, T. ting, Li, J. han, Feng, Y. kang, Wang, L. ping, Sun, Y., & Chai, Y. rong. (2020). Gallic acid attenuates thymic involution in the D-galactose induced

- accelerated aging mice. *Immunobiology*, 225(1), 151870. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.11.005>
- Habtemariam, S. (2019). The Nrf2/HO-1 Axis as Targets for Flavanones: Neuroprotection by Pinocembrin, Naringenin, and Eriodictyol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4724920>
- Hammami, S., Jmii, H., Mokni, R. El, Khmiri, A., Faidi, K., Dhaouadi, H., Aouni, M. H. El, Aouni, M., & Joshi, R. K. (2015). Antiviral activities of teucrium pseudochamaepitys growing spontaneously in Tunisia. *Molecules*, 20(11), 20426–20433. <https://doi.org/10.3390/molecules201119707>
- Hanna Instruments. (2020). *Valor de Peróxido e a determinação de Rancidez de alimentos*. Boletins Indústria Alimentícia. <https://hannainst.com.br/valor-de-peroxido-e-a-determinacao-de-rancidez-de-alimentos/>
- Hansen, D., Nakahata, A. M., Haraguchi, M., Okamoto, O. K., González, E., & Alonso, A. (2012). 14, 15-epoxygeranylgeraniol and extracts isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits: antitumor activity on glioblastoma cells.
- Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). Cannabis sativa and Hemp. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 96, Issues 2–3). [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)
- He, P., Yan, S., Wen, X., Zhang, S., Liu, Z., Liu, X., & Xiao, C. (2019). Eriodictyol alleviates lipopolysaccharide-triggered oxidative stress and synaptic dysfunctions in BV-2 microglial cells and mouse brain. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 14756–14770. <https://doi.org/10.1002/jcb.28736>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Heldt, H.-W., & Piechulla, B. (2011). *Plant Biochemistry* (4th ed.). Elsevier.
- Heller, A. A., & Spence, D. M. (2019). A rapid method for post-antibiotic bacterial

- susceptibility testing. *PLoS ONE*, *14*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210534>
- Hildebrand, G., Poojary, M. M., O'Donnell, C., Lund, M. N., Garcia-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, *32*(3), 1709–1718. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>
- Hoscheid, J., Bersani-Amado, C. A., Da Rocha, B. A., Outuki, P. M., Da Silva, M. A. R. C. P., Froehlich, D. L., & Cardoso, M. L. C. (2013). Inhibitory effect of the hexane fraction of the ethanolic extract of the fruits of *Pterodon pubescens* Benth in acute and chronic inflammation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/272795>
- Hoscheid, J., Outuki, P. M., Kleinubing, S. A., De Goes, P. R. N., Lima, M. M. S., Cuman, R. K. N., & Cardoso, M. L. C. (2017). *Pterodon pubescens* oil nanoemulsions: Physicochemical and microbiological characterization and in vivo anti-inflammatory efficacy studies. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *27*(3), 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.012>
- Hoscheid, J., Reinas, A., Garcia Cortez, D. A., Da Costa, W. F., & Carvalho Cardoso, M. L. (2012). Determination by GC-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.: Development and validation. *Talanta*, *100*, 372–376. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.094>
- Houngue, M. T. A. K., Doco, R. C., Kpotin, G. A., Kuevi, U. A., Simplicite, K., Wilfried, K., Atohoun, Y. G. S., & Mensah, J.-B. (2017). *DFT study of chemical reactivity of free radicals ABTS^o + and DPPH^o by Myricetin, Quercetin and Kaempferol*. 90(November), 177–188. www.worldscientificnews.com
- Huang, C. B., Alimova, Y., Myers, T. M., & Ebersole, J. L. (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, *56*(7), 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011>
- Huang, Y., & Chen, H. (2011). Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. *Food Control*, *22*(8), 1178–1183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.012>
- Huang, Y., Sun, F., Chen, H., Chen, D., Tan, H., & Cozzolino, D. (2020). Lipidomic changes

- in banana (*Musa cavendish*) during ripening and comparison of extraction by Folch and Bligh-Dyer methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(40), 11309–11316. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04236>
- Iacopetta, D., Rosano, C., Puoci, F., Parisi, O. I., Saturnino, C., Caruso, A., Longo, P., Ceramella, J., Malzert-Fréon, A., Dallemagne, P., Rault, S., & Sinicropi, M. S. (2017). Multifaceted properties of 1,4-dimethylcarbazoles: Focus on trimethoxybenzamide and trimethoxyphenylurea derivatives as novel human topoisomerase II inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *96*, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.039>
- Ido, A. L., de Luna, M. D. G., Capareda, S. C., Maglinao, A. L., & Nam, H. (2018). Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasound-assisted solvent extraction. *Energy*, *157*, 949–956. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.171>
- Isemura, M. (2019). Catechin in human health and disease. *Molecules*, *24*(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030528>
- Iverson, S. J., Lang, S. L. C., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, *36*(11), 1283–1287.
- Jalili, F., Jafari, S. M., Emam-Djomeh, Z., Malekjani, N., & Farzaneh, V. (2018). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Canola Seeds with the Use of Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, *11*(2), 598–612. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1030-z>
- Jang, H. I., & Rhee, M. S. (2009). Inhibitory effect of caprylic acid and mild heat on *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in reconstituted infant formula and determination of injury by flow cytometry. *International Journal of Food Microbiology*, *133*(1–2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.009>
- Jeong, D., Yi, Y. S., Sung, G. H., Yang, W. S., Park, J. G., Yoon, K., Yoon, D. H., Song, C., Lee, Y., Rhee, M. H., Kim, T. W., Kim, J. H., & Cho, J. Y. (2014). Anti-inflammatory activities and mechanisms of *Artemisia asiatica* ethanol extract. *Journal of Ethnopharmacology*, *152*(3), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.030>
- Jing, Z., Wang, Z., Li, X., Li, X., Cao, T., Bi, Y., Zhou, J., Chen, X., Yu, D., Zhu, L., & Li, S.

- (2016). Protective Effect of Quercetin on Posttraumatic Cardiac Injury. *Scientific Reports*, 6(February), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep30812>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J., & O'Donnell, C. P. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.007>
- Kadry, A. A., El-Anrawy, M. A., & El-Ganiny, A. M. (2023). Impact of short chain fatty acids (SCFAs) on antimicrobial activity of new β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations and on virulence of *Escherichia coli* isolates. *Journal of Antibiotics*, 76(4), 225–235. <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00595-1>
- Kang, C.-I. (2022). Antibiotics for multidrug-resistant gram-negative bacteria. *J Korean Med Assoc*, 65(8), 490–497. <https://doi.org/10.5124/jkma.2022.65.8.490>
- Karakaya, S., Yilmaz, S. V., Özdemir, Ö., Koca, M., Pınar, N. M., Demirci, B., Yıldırım, K., Sytar, O., Turkez, H., & Baser, K. H. C. (2020). A caryophyllene oxide and other potential anticholinesterase and anticancer agent in *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 32(6), 512–525. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1813212>
- Kawakami, M. Y. M., Zamora, L. O., Araújo, R. S., Fernandes, C. P., Ricotta, T. Q. N., de Oliveira, L. G., Queiroz-Junior, C. M., Fernandes, A. P., da Conceição, E. C., Ferreira, L. A. M., Barros, A. L. B., Aguiar, M. G., & Oliveira, A. E. M. F. M. (2021). Efficacy of nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oleoresin for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 134(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111109>
- Khadhri, A., El Mokni, R., Almeida, C., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2014). Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 52, 29–31. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.018>
- Kim, C. S., Kwon, Y., Choe, S. Y., Hong, S. M., Yoo, H., Goto, T., Kawada, T., Choi, H. S., Joe, Y., Chung, H. T., & Yu, R. (2015). Quercetin reduces obesity-induced hepatosteatosis by enhancing mitochondrial oxidative metabolism via heme oxygenase-1. *Nutrition and Metabolism*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0030-5>
- Kim, E., Yoon, K. D., Lee, W. S., Yang, W. S., Kim, S. H., Sung, N. Y., Baek, K. S., Kim, Y.,

- Htwe, K. M., Kim, Y. D., Hong, S., Kim, J. H., & Cho, J. Y. (2014). Syk/Src-targeted anti-inflammatory activity of *Codariocalyx motorius* ethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, *155*(1), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.013>
- Kim, H. J., Lee, W., & Yun, J. M. (2014). Luteolin Inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production and its epigenetic mechanism in human monocytes. *Phytotherapy Research*, *28*(9), 1383–1391. <https://doi.org/10.1002/ptr.5141>
- Kim, J. J., & Kim, H. K. (2021). Antioxidant and antibacterial activity of caprylic acid vanillyl ester produced by lipase-mediated transesterification. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(2), 317–326. <https://doi.org/10.4014/JMB.2010.10018>
- Klobucar, K., Jardine, E., Farha, M. A., Mackinnon, M. R., Fragis, M., Nkonge, B., Bhandu, T., Borrillo, L., Tsai, C. N., Johnson, J. W., Coombes, B. K., Magolan, J., & Brown, E. D. (2022). Genetic and Chemical Screening Reveals Targets and Compounds to Potentiate Gram-Positive Antibiotics against Gram-Negative Bacteria. *ACS Infectious Diseases*, *8*(10), 2187–2197. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00357>
- Kozhikkadan Davis, C., Nasla, K., Anjana, A. K., & Rajanikant, G. K. (2018). Taxifolin as dual inhibitor of Mtb DNA gyrase and isoleucyl-tRNA synthetase: in silico molecular docking, dynamics simulation and in vitro assays. *In Silico Pharmacology*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s40203-018-0045-5>
- Kuspradini, H., Mitsunaga, T., & Ohashi, H. (2009). Antimicrobial activity against *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase inhibitory activity of taxifolin and some flavanonol rhamnosides from kempas (*Koompassia malaccensis*) extracts. *Journal of Wood Science*, *55*(4), 308–313. <https://doi.org/10.1007/s10086-009-1026-4>
- Kwon, E. Y., & Choi, M. S. (2019). Dietary eriodictyol alleviates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051227>
- Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2019). Short chain fatty acids commonly produced by gut microbiota influence *Salmonella enterica* motility, biofilm formation, and gene expression. *Antibiotics*, *8*(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040265>
- Leal, L. K. A. M., Ferreira, A. A. G., Bezerra, G. A., Matos, F. J. A., & Viana, G. S. B. (2000). Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal

- plants containing coumarin: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00165-8)
- Leal, N. R. F. (2015). *Estudo do potencial anti-inflamatório e antiartrítico de Pterodon polygalaeflorus e dos seus mecanismos de ação ; Study of anti-inflammatory and anti-arthritic potential of Pterodon polygalaeflorus and their mechanisms of action*. http://www.bdtd.uerj.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=9240
- Lee, H. H., Lee, S., Shin, Y. S., Cho, M., Kang, H., & Cho, H. (2016). Anti-cancer effect of quercetin in xenograft models with EBV-associated human gastric carcinoma. *Molecules*, 21(10), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules21101286>
- Leite, V. G., Mansano, V. F., & Teixeira, S. P. (2014). Floral ontogeny in Dipterygeae (Fabaceae) reveals new insights into one of the earliest branching tribes in papilionoid legumes. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 174(4), 529–550.
- Lemmens, L., Colle, I., Van Buggenhout, S., Palmero, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2014). Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro)structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 38(2), 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.005>
- Leonhardt, V., Leal-Cardoso, J. H., Lahlou, S., Albuquerque, A. A. C., Porto, R. S., Celedônio, N. R., Oliveira, A. C., Pereira, R. F., Silva, L. P., Garcia-Teófilo, T. M. N., Silva, A. P. F. S., Magalhães, P. J. C., Duarte, G. P., & Coelho-De-Souza, A. N. (2010). Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(6), 749–758. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00800.x>
- Li, D., Lu, N., Han, J., Chen, X., Hao, W., Xu, W., Liu, X., Ye, L., & Zheng, Q. (2018). Eriodictyol attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through the activation of JAK2. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00033>
- Li, J., Hu, L., Zhou, T., Gong, X., Jiang, R., Li, H., Kuang, G., Wan, J., & Li, H. (2019). Taxifolin inhibits breast cancer cells proliferation, migration and invasion by promoting mesenchymal to epithelial transition via β -catenin signaling. *Life Sciences*, 232. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116617>

- Li, Q. Q., Lee, R. X., Liang, H., Wang, G., Li, J. M., Zhong, Y., & Reed, E. (2013). β -Elemene enhances susceptibility to cisplatin in resistant ovarian carcinoma cells via downregulation of ERCC-1 and XIAP and inactivation of JNK. *International Journal of Oncology*, 43(3), 721–728. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1996>
- Lima, I. L. P., Scariot, A., de Medeiros, M. B., & Sevilha, A. C. (2012). Diversidade e uso de plantas do Cerrado em comunidade de Geraizeiros no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 26, 675–684.
- Liu, J.-S., Che, X.-M., Chang, S., Qiu, G.-L., He, S.-C., Fan, L., Zhao, W., Zhang, Z.-L., & Wang, S.-F. (2015). β -elemene enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells by inhibiting Pak1 activation. *World Journal of Gastroenterology*, 21(34), 9945–9956. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i34.9945>
- Liu, N., Ren, G., Faiza, M., Li, D., Cui, J., Zhang, K., Yao, X., & Zhao, M. (2022). Comparison of conventional and green extraction methods on oil yield, physicochemical properties, and lipid compositions of pomegranate seed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114(July), 104747. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104747>
- Lodi, F., Jimenez, R., Moreno, L., Kroon, P. A., Needs, P. W., Hughes, D. A., Santos-Buelga, C., Gonzalez-Paramas, A., Cogolludo, A., & Lopez-Sepulveda, R. (2009). Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis*, 204(1), 34–39.
- López-lázaro, M. (2009). *Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin*. 31–59.
- Lorenzi, H. (2002). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil* (368 p.). São Paulo: Instituto Plantarum.
- Lull, C., Gil-Ortiz, R., & Cantín, Á. (2023). A Chemical Approach to Obtaining α -copaene from Clove Oil and Its Application in the Control of the Medfly. *Applied Sciences (Switzerland)*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/app13095622>
- Luo, X., Cui, J., Zhang, H., Duan, Y., Zhang, D., Cai, M., & Chen, G. (2018). Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Industrial Crops and Products*, 112(301), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.019>

- Machado, K. da C., Islam, M. T., Ali, E. S., Rouf, R., Uddin, S. J., Dev, S., Shilpi, J. A., Shill, M. C., Reza, H. M., Das, A. K., Shaw, S., Mubarak, M. S., Mishra, S. K., & Melo-Cavalcante, A. A. de C. (2018). A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2376–2388. <https://doi.org/10.1002/ptr.6199>
- Machado, M. S. L., Bruno, K. A., Melo, M. de O., & Koike, M. K. (2018). Fitoterapia brasileira: análise dos efeitos biológicos da sucupira (*Bowdichia virgilioides* e *Pterodon emarginatus*). *Brazilian Journal of Natural Sciences*, 1(2), 7. <https://doi.org/10.31415/bjns.v1i2.10>
- Mahajan, J. R. ., & Monteiro, M. B. (1973). New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* vog. *Journal of the Chemical Society*, 0, 520–525.
- Mahajan, J. R., & Monteiro, M. B. (1970). New diterpenoids from *pterodon emarginatus* vog. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 520–525. <https://doi.org/10.1039/P19730000520>
- Mahjan, J. R., & Monteiro, M. B. (1973). New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. *J. Chem. Soc Perkin*, 1, 520–525.
- Manthey, J. A., Grohmann, K., & Guthrie, N. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8(2), 135–153. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172671>
- Manzoor, M. F., Ahmad, N., Ahmed, Z., Siddique, R., Zeng, X. A., Rahaman, A., Muhammad Aadil, R., & Wahab, A. (2019). Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives. *Journal of Food Biochemistry*, 43(9), 1–19. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12974>
- Mao, Y., Zhang, J., Hou, L., & Cui, X. (2013). The effect of beta-elemene on alpha-tubulin polymerization in human hepatoma HepG2 cells. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 25(6), 770–776. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2013.12.12>
- Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61(3), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.001>
- Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Yagüe, P., Manteca, Á., Villar, C. J., & Lombó, F. (2017). De

- novo biosynthesis of apigenin, luteolin, and eriodictyol in the actinomycete *Streptomyces albus* and production improvement by feeding and spore conditioning. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00921>
- Marques, D. D., Lacerda Machado, M. I., De Carvalho, M. G., Luiz, L. A., & Braz-Filho, R. (1998). Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(3), 295–301. <https://doi.org/10.1590/S0103-50531998000300014>
- Marques, F. A., Wendler, E. P., Sales Maia, B. H. L. N., Coffani-Nunes, J. V., Campana, J., & Guerrero, P. G. (2008). Volatile oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Essential Oil Research*, 20(6), 519–520. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9700077>
- Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J., Watson, N. J., Ruiz-López, I. I., Che-Galicia, G., & Corona-Jiménez, E. (2020). Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food and Bioprocess Processing*, 122, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.011>
- Martins Z; Vasas, A; Csupor-Löffler, B; Molnár, J; Hohmann, J, A. H. (2010). Spathulenol inhibit the human ABCB1 efflux pump. *Planta Med*, 76(12), P608. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1264906>
- Martins, C. D. M., Nascimento, E. A. D., De Moraes, S. A. L., De Oliveira, A., Chang, R., Cunha, L. C. S., Martins, M. M., Martins, C. H. G., Moraes, T. D. S., Rodrigues, P. V., Silva, C. V. D., & De Aquino, F. J. T. (2015). Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. and Zucc. essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/842047>
- Massaro, M., Riela, S., Guernelli, S., Parisi, F., Lazzara, G., Baschieri, A., Valgimigli, L., & Amorati, R. (2016). A synergic nanoantioxidant based on covalently modified halloysite-trolox nanotubes with intra-lumen loaded quercetin. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(13), 2229–2241. <https://doi.org/10.1039/c6tb00126b>
- Mehmood, A., Ishaq, M., Zhao, L., Yaqoob, S., Safdar, B., Nadeem, M., Munir, M., & Wang, C. (2019). Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on bioactive

- compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, *51*, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.013>
- Mehraban, Z., Ghaffari Novin, M., Golmohammadi, M. G., Sagha, M., Pouriran, K., & Nazarian, H. (2019). Protective effect of gallic acid on apoptosis of sperm and in vitro fertilization in adult male mice treated with cyclophosphamide. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(10), 17250–17257. <https://doi.org/10.1002/jcb.28987>
- Melo, P. Z. (2018). TAMANHO GENÔMICO E MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Pterodon pubescens* E *Pterodon emarginatus* (Leguminosae). *Programa De Pós-Graduação Em Genética E Biologia Molecular, Dissertação*, 1–61.
- Mendes de Lacerda Leite, G., de Oliveira Barbosa, M., Pereira Lopes, M. J., de Araújo Delmondes, G., Bezerra, D. S., Araújo, I. M., Carvalho de Alencar, C. D., Melo Coutinho, H. D., Peixoto, L. R., Barbosa-Filho, J. M., Bezerra Felipe, C. F., Barbosa, R., Alencar de Menezes, I. R., & Kerntof, M. R. (2021). Pharmacological and toxicological activities of α -humulene and its isomers: A systematic review. *Trends in Food Science and Technology*, *115*(May), 255–274. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.049>
- Menna-Barreto, R. F. S., Laranja, G. A. T., Silva, M. C. C., Coelho, M. G. P., Paes, M. C., Oliveira, M. M., & De Castro, S. L. (2008). Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: Geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitology Research*, *103*(1), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0937-0>
- Michielin, E. M. Z., Salvador, A. A., Riehl, C. A. S., Smânia, A., Smânia, E. F. A., & Ferreira, S. R. S. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresource Technology*, *100*(24), 6615–6623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.061>
- Min, H. Y., Jang, H. J., Park, K. H., Hyun, S. Y., Park, S. J., Kim, J. H., Son, J., Kang, S. S., & Lee, H. Y. (2019). The natural compound gracillin exerts potent antitumor activity by targeting mitochondrial complex II. *Cell Death and Disease*, *10*(11). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2041-z>
- Mirzaei, H. H., Firuzi, O., Baldwin, I. T., & Jassbi, A. R. (2017). Cytotoxic activities of different iranian solanaceae and lamiaceae plants and bioassay-guided study of an active extract from *salvia lachnocalyx*. *Natural Product Communications*, *12*(10), 1563–1566. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701201009>

- Mohanty, S., Pradhan, B., Patra, S., Behera, C., Nayak, R., & Jena, M. (2020). Screening for nutritive bioactive compounds in some algal strains isolated from coastal Odisha. *Journal of Advanced Plant Sciences*, 2020(2), 1–8.
- Mokdad-Bzeouich, I., Mustapha, N., Sassi, A., Bedoui, A., Ghoul, M., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2016). Investigation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects of eriodictyol through its cellular anti-oxidant activity. *Cell Stress and Chaperones*, 21(5), 773–781. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0702-8>
- Montero-Calderon, A., Cortes, C., Zulueta, A., Frigola, A., & Esteve, M. J. (2019). Green solvents and Ultrasound-Assisted Extraction of bioactive orange (*Citrus sinensis*) peel compounds. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52717-1>
- Mors, W. B. ., Filho, M. F. S. ., Monteiro, H. J. ., Gilbert, B. ., & Pellegrino, J. (1967). Chemoprophylactic Agent in Schistosomiasis: 14,15-Epoxygeranylgeraniol. *Science*, 157.
- Morsy, N. (2014). Phytochemical analysis of biologically active constituents of medicinal plants. *Main Group Chemistry*, 13(1), 7–21. <https://doi.org/10.3233/MGC-130117>
- Muhammad, S. A., & Fatima, N. (2015). In silico analysis and molecular docking studies of potential angiotensin-converting enzyme inhibitor using quercetin glycosides. *Pharmacognosy Magazine*, 11(Suppl 1), S123.
- Murzyn, A., Krasowska, A., Stefanowicz, P., Dziadkowiec, D., & Łukaszewicz, M. (2010). Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS ONE*, 5(8), 2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012050>
- Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108(2017), 309–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>
- Navarro, S. L. B., Capellini, M. C., Aracava, K. K., & Rodrigues, C. E. C. (2016). Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.009>
- Negri, G., Mattei, R., & Mendes, F. R. (2014). Antinociceptive activity of the HPLC- and MS-standardized hydroethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel leaves. *Phytomedicine*, 21(8–9), 1062–1069. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.04.009>

- Neto, J. J. (1973). *Contribuição ao Estudo Farmacognóstico dos Frutos de Pterodon pubescens Benth.*
- Neto, J. T. das N. (2015). *ÓLEO BRUTO DE Pterodon Emarginatus Vogel (SUCUPIRA) COMO.*
- Nettore, I. C., Rocca, C., Mancino, G., Albano, L., Amelio, D., Grande, F., Puoci, F., Pasqua, T., Desiderio, S., Mazza, R., Terracciano, D., Colao, A., Bèguinot, F., Russo, G. L., Dentice, M., Macchia, P. E., Sinicropi, M. S., Angelone, T., & Ungaro, P. (2019). Quercetin and its derivative Q2 modulate chromatin dynamics in adipogenesis and Q2 prevents obesity and metabolic disorders in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *69*, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.019>
- Ninčević Grassino, A., Ostojić, J., Miletić, V., Djaković, S., Bosiljkov, T., Zorić, Z., Ježek, D., Rimac Brnčić, S., & Brnčić, M. (2020). Application of high hydrostatic pressure and ultrasound-assisted extractions as a novel approach for pectin and polyphenols recovery from tomato peel waste. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *64*, 102424. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102424>
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel. *Food Chemistry*, *241*, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>
- Norouzi-Arasi, H., Yavari, I., Chalabian, F., Kiarostami, V., Ghaffarzadeh, F., & Nasirian, A. (2006). Chemical constituents and antimicrobial activities of the essential oil of *Acroptilon repens* (L.) DC. *Flavour and Fragrance Journal*, *21*(2), 247–249. <https://doi.org/10.1002/ffj.1568>
- Northwest, P. (1995). *Alphitonin 1*. *58*(3), 450–455.
- Nouri, A., Heibati, F., & Heidarian, E. (2021). Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *394*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01931-0>
- Nucci-Martins, C., Martins, D. F., Nascimento, L. F., Venzke, D., Oliveira, A. S., Frederico, M. J. S., Silva, F. R. M. B., Brighente, I. M. C., Pizzolatti, M. G., & Santos, A. R. S. (2015). Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth

- on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 273–286.
- Nucci, C., Mazzardo-Martins, L., Stramosk, J., Brethanha, L. C., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. S., & Martins, D. F. (2012). Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(1), 170–178.
- Odabaş, H. İ., & Koca, I. (2016). Application of response surface methodology for optimizing the recovery of phenolic compounds from hazelnut skin using different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 91, 114–124.
- Ofek, O., Karsak, M., Leclerc, N., Fogel, M., Frenkel, B., Wright, K., Tam, J., Attar-Namdar, M., Kram, V., Shohami, E., Mechoulam, R., Zimmer, A., & Bab, I. (2006). Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 696–701. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504187103>
- Oi, N., Chen, H., Kim, M. O., Lubet, R. A., Bode, A. M., & Dong, Z. (2012). Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3K. *Cancer Prevention Research*, 5(9), 1103–1114. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0397>
- Okolie, C. L., Akanbi, T. O., Mason, B., Udenigwe, C. C., & Aryee, A. N. A. (2019). Influence of conventional and recent extraction technologies on physicochemical properties of bioactive macromolecules from natural sources: A review. *Food Research International*, 116, 827–839. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.018>
- Okparanta, S. (2018). Assessment of Rancidity and Other Physicochemical Properties of Edible Oils (Mustard and Corn Oils) Stored at Room Temperature. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 6(3), 70. <https://doi.org/10.11648/j.jfns.20180603.11>
- Oliveira, A. E. M. F. M., Duarte, J. L., Amado, J. R. R., Cruz, R. A. S., Rocha, C. F., Souto, R. N. P., Ferreira, R. M. A., Santos, K., Da Conceição, E. C., De Oliveira, L. A. R., Kelecom, A., Fernandes, C. P., & Carvalho, J. C. T. (2016). Development of α larvicidal nanoemulsion with pterodon emarginatus Vogel oil. *PLoS ONE*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145835>
- Oliveira, A. E. M. F. M., Duarte, J. L., Cruz, R. A. S., Souto, R. N. P., Ferreira, R. M. A.,

- Peniche, T., Conceição, E. C., Oliveira, L. A. R., Faustino, S. M. M., Florentino, A. C., Carvalho, J. C. T., & Fernandes, C. P. (2017). Pterodon emarginatus oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. *Journal of Nanobiotechnology*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0234-5>
- Oliveira, D. M., & Paiva, E. A. (2005). Anatomy and ontogeny of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) seed. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, *65*(3), 483–494. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842005000300014>
- Oliveira, D. M. T., & Paiva, E. A. S. (2005). Anatomy and ontogeny of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) seed. *Brazilian Journal of Biology*, *65*, 483–494.
- Oliveira, G. L. da S., Machado, K. C., Machado, K. C., da Silva, A. P. dos S. C. L., Feitosa, C. M., & de Castro Almeida, F. R. (2018). Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *92*(August 2017), 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.013>
- Oliveira, L. de A. R., Silva, A. C. G. da, Thomaz, D. V., Brandão, F., Conceição, E. C. da, Valadares, M. C., Bara, M. T. F., & Silveira, D. (2021). The Potential of Vouacapanes from *Pterodon Emarginatus* Vogel against COVID-19 Cytokine Storm. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *13*(1), 150–159. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.016>
- Oliveira, P. C., Conceição, E. C., Oliveira, P. A., Nascimento, M. V., Costa, É. A., Paula, J. R. De, Bara, M. T. F., Teresa, M., & Bara, F. (2012). Obtaining a Dry Extract of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) Fruits by Spray-Drying. *Journal of Pharmacy Research*, *5*(1), 641–645.
- Omar, S., Bouziane, I., Bouslama, Z., & Djemel, A. (2020). *In-silico identification of potent inhibitors of COVID-19 main protease (Mpro) and angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) from natural products: Quercetin, hispidulin, and cirsimaritin exhibited better potential inhibition than hydroxy-chloroquine against.*
- Ottaway, J. M., Chance Carter, J., Adams, K. L., Camancho, J., Lavine, B. K., & Booksh, K. S. (2021). Comparison of Spectroscopic Techniques for Determining the Peroxide Value of 19 Classes of Naturally Aged, Plant-Based Edible Oils. *Applied Spectroscopy*, *75*(7), 781–794. <https://doi.org/10.1177/0003702821994500>
- Outuki, P. M., Kleinubing, S. A., Hoscheid, J., Montanha, M. C., da Silva, E. A., do Couto, R. O., Kimura, E., & Cardoso, M. L. C. (2018). The incorporation of *Pterodon pubescens*

- fruit oil into optimized nanostructured lipid carriers improves its effectiveness in colorectal cancer. *Industrial Crops and Products*, 123(July), 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.044>
- Pacheco, M. T., Silva, A. C. G., Nascimento, T. L., Diniz, D. G. A., Valadares, M. C., & Lima, E. M. (2019). Protective effect of sucupira oil nanoemulsion against oxidative stress in UVA-irradiated HaCaT cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(10), 1532–1543. <https://doi.org/10.1111/jphp.13148>
- Park, S. Y., Jung, W. J., Kang, J. S., Kim, C. M., Park, G., & Choi, Y. W. (2015). Neuroprotective effects of α -iso-cubebene against glutamate-induced damage in the HT22 hippocampal neuronal cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(2), 525–532. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.2031>
- Park, S. Y., Kim, H. Y., Park, H. J., Shin, H. K., Hong, K. W., & Kim, C. D. (2016). Concurrent Treatment with Taxifolin and Cilostazol on the Lowering of β -Amyloid Accumulation and Neurotoxicity via the Suppression of P-JAK2/P-STAT3/NF- κ B/BACE1 Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 11(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168286>
- Pascoa, H., Diniz, D. G. A., Florentino, I. F., Costa, E. A., & Bara, M. T. F. (2015). Microemulsion based on Pterodon emarginatus oil and its anti-inflammatory potential. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, 117–125.
- Patra, A., Abdullah, S., & Pradhan, R. C. (2022). Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00498-3>
- Pellegrini, N., Del Rio, D., Colombi, B., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 260–264. <https://doi.org/10.1021/jf020657z>
- Pereira, M. F., Thiago Martino, Sérgio Ranto Dalmau, Rodolpho Mattos Albano, Jean-Pierre Férézou, Sonia Soares Costa, Marsen Garcia Pinto Coelho, & Kátia Costa Carvalho Sabino. (2011). Terpenic subfraction of Pterodon pubescens induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. *Oncology Reports*, 25(1), 215–221. <https://doi.org/10.3892/or>

- Pereira, M. F., Martino, T., Dalmau, S. R., Paes, M. C., Barja-Fidalgo, C., Albano, R. M., Coelho, M. G. P., & Sabino, K. C. de C. (2012). Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits nuclear factor kappa B and extracellular signal-regulated protein Kinase 1/2 activation and deregulates gene expression in leukemia cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-231>
- Pereira, M. M., de Moraes, H., dos Santos Silva, E., Corso, C. R., Adami, E. R., Carlos, R. M., Acco, A., & Zanolini, J. M. (2018). The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-, but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. *Metabolic Brain Disease*, *33*(5), 1573–1584. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0264-9>
- Peshkovsky, A. S., Peshkovsky, S. L., & Bystryak, S. (2013). Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *69*, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2013.02.010>
- Petrescu, A. M., Paunescu, V., & Ilia, G. (2019). The antiviral activity and cytotoxicity of 15 natural phenolic compounds with previously demonstrated antifungal activity. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *54*(6), 498–504. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1574176>
- Pichette, A., Larouche, P. L., Lebrun, M., & Legault, J. (2006). Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research*, *20*(5), 371–373. <https://doi.org/10.1002/ptr.1863>
- Pimenta, A. T. A., Santiago, G. M. P., Arriaga, Â. M. C., Menezes, G. H. A., & Bezerra, S. B. (2006). Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *16*(4), 501–505. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2006000400011>
- Pinto, D., De La Luz Cádiz-Gurrea, M., Sut, S., Ferreira, A. S., Leyva-Jimenez, F. J., Dall'acqua, S., Segura-Carretero, A., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2020). Valorisation of underexploited *Castanea sativa* shells bioactive compounds recovered by supercritical fluid extraction with CO₂: A response surface methodology approach. *Journal of CO₂ Utilization*, *40*(March). <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101194>
- Pinto, F., Vigliano, M., Leal, N., Da Silva, G., Marques, P., Velozo, L., Sabino, K., & Coelho, M. (2013). Phytochemical and pharmacological analysis of *pterodon polygalaeflorus* extracts. *Pharmacol Online*, *3*, 56–70.

- Pinto, M. V. P. (2017). *Populações Naturais De Pterodon*.
- Pinto, R. B., Francisco, V. M. da C. R., & Mansano, V. de F. (2014). Morphological study of fruits, seeds and embryo in the tropical tribe Dipterygeae (Leguminosae-Papilionoideae). *Rodriguésia*, 65, 89–97.
- Plazzotta, S., Ibarz, R., Manzocco, L., & Martín-Belloso, O. (2021). Modelling the recovery of biocompounds from peach waste assisted by pulsed electric fields or thermal treatment. *Journal of Food Engineering*, 290(March 2020), 110196. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110196>
- Porfiro, C. A., Silva, L. S. da, Pereira, P. S., Rodrigues, A. R. dos S., Silva, F. G., & Nascimento, A. L. (2014). Inhibitory activity of acetylcholinesterase by *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (Leguminosae-Papilionoideae) leaf extracts. *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*, 2020, 1–20.
- Pourmortazavi, S. M., & Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163(1–2), 2–24. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.021>
- Prudêncio, C. V., Mantovani, H. C., Cecon, P. R., Prieto, M., & Vanetti, M. C. D. (2016). Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella Typhimurium* to nisin combined with EDTA. *Food Control*, 61, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.042>
- Qi, Y., Yi, P., He, T., Song, X., Liu, Y., Li, Q., Zheng, J., Song, R., Liu, C., Zhang, Z., Peng, W., & Zhang, Y. (2020). Quercetin-loaded selenium nanoparticles inhibit amyloid- β aggregation and exhibit antioxidant activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 602(March), 125058. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125058>
- Queiroz, T. B., Mendes, A. D. R., Silva, J. C. R. L., Fonseca, F. S. A., & Martins, E. R. (2016). Teor e composição química do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em função dos horários de coleta. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 356–362. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_116
- Quesada-Salas, M. C., Delfau--bonnet, G., Willig, G., Pr at, N., Allais, F., & Ioannou, I. (2021). Article optimization and comparison of three cell disruption processes on lipid extraction from microalgae. *Processes*, 9(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/pr9020369>

- Rakshit, S., Nirala, S. K., & Bhadauria, M. (2020). Gallic acid protects from acute multiorgan injury induced by lipopolysaccharide and D-galactosamine. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21(14), 1489–1504.
- Ramalho-Carvalho, P.-E. (2010). Sucupira-Branca Sucupira-Branca. *Embrapa Florestas, Circular Técnica*, 5.
- Rascón, A. J., Azzouz, A., & Ballesteros, E. (2018). Multiresidue determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by liquid-liquid extraction–solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Food Control*, 94, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.015>
- Rashid, R., Masoodi, F. A., Wani, S. M., Manzoor, S., & Gull, A. (2022). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate peel, their nanoencapsulation and application for improvement in shelf life extension of edible oils. *Food Chemistry*, 385(March), 132608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132608>
- Razak, S., Afsar, T., Ullah, A., Almajwal, A., Alkholief, M., Alshamsan, A., & Jahan, S. (2018). Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *BMC Cancer*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4959-4>
- Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D., & Verran, J. (2014). Tips & Tools Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 15(1), 45–46. <https://dx.doi.org/10.1128%2Fjmb.e.v15i1.656>
- Riccio, M. F., Sawaya, A. C. H. F., Abdelnur, P. V., Saraiva, S. A., Haddad, R., Eberlin, M. N., & Catharino, R. R. (2011). Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometric of olive oils: Quality control and certification of geographical origin. *Analytical Letters*, 44(8), 1489–1497. <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.512688>
- Rocha, D. M. S. (2006). Aspectos taxonômicos, genéticos e reprodutivos de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth e *Pterodon emarginatus* Vog. *Leguminosae, Dipteryxaceae*[Thesis].[Campinas]: Universidade Estadual de Campinas.
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2013). Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(12), 3022–3029. <https://doi.org/10.1021/jf3054214>

- Rodríguez, J., Martín, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*, 83, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>
- Rohdewald, P. (2002). A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 40(4), 158–168.
- Rombaut, N., Tixier, A.-S., Bily, A., & Chemat, F. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Roobab, U., Aadil, R. M., Madni, G. M., & Bekhit, A. E. D. (2018). The Impact of Nonthermal Technologies on the Microbiological Quality of Juices: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 437–457. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12336>
- Roopan, S. M., & Madhumitha, G. (2018). Bioorganic phase in natural food: An overview. *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview*, 1–331. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74210-6>
- Rubinger, M. M. M., Castelo-Branco, P. D. A., Guilardi, S., Souza, E. M. R., Gambardella, M. T. D. P., Borges, E. E. L., Ferreira-Alves, D. L., & Piló-Veloso, D. (2004). Preparation, X-ray structural studies and plant growth regulatory activity of methyl 6 α ,7 β -thiocarbonyldioxyvouacapan-17 β -oate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(2), 219–223. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000200010>
- Ruiz-Rico, M., Fuentes, C., Pérez-Esteve, É., Jiménez-Belenguer, A. I., Quiles, A., Marcos, M. D., Martínez-Mañez, R., & Barat, J. M. (2015). Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. *Food Control*, 56, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.016>
- Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Kashiri, M., & Shakeri, A. (2020). Evaluation of release mechanism of catechin from chitosan-polyvinyl alcohol film by exposure to gamma irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 230(November 2019), 115589. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115589>
- Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M., & Ziaifar, A. M. (2015). Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh

- walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.025>
- Saini, R. K., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. S. (2021). Advances in lipid extraction methods—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms222413643>
- Saito, S., Yamamoto, Y., Maki, T., Hattori, Y., Ito, H., Mizuno, K., Harada-Shiba, M., Kalaria, R. N., Fukushima, M., Takahashi, R., & Ihara, M. (2017). Taxifolin inhibits amyloid- β oligomer formation and fully restores vascular integrity and memory in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0429-5>
- Saliu, F. (2022). Soft Ionization mass spectrometry of lipid residues in archaeological findings: ESI vs APCI. *Journal of Physics: Conference Series*, 2204(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2204/1/012044>
- Salles, T. H. C. ., Volpe-Zanutto, F. ., Sousa, I. M. O. ., Machado, D. ., Zanatta, A. C. ., Vilegas, W. ., Lancellotti, M. ., Foglio, M. A. ., & Ávila, M. A. (2020). Electrospun PCL-based nanofibers *Arrabidaea chica* Verlot *Pterodon pubescens* Benth loaded: synergic effect in fibroblast formation. *Biomedical Materials*, 34.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., Ghazali, H. M., Bordbar, S., & Serjouie, A. (2015). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chemistry*, 172, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.068>
- Sander, C. S., Chang, H., Hamm, F., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2004). Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *International Journal of Dermatology*, 43(5), 326–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02222.x>
- Santos, A. P., Zatta, D. T., Moraes, W. F., Bara, M. T. F., Ferri, P. H., Silva, M. do R. R., & Paula, J. R. (2010). Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 891–896.
- Saturnino, C., Iacopetta, D., Sinicropi, M. S., Rosano, C., Caruso, A., Caporale, A., Marra, N., Marengo, B., Pronzato, M. A., Parisi, O. I., Longo, P., & Ricciarelli, R. (2014). N- Alkyl carbazole derivatives as new tools for alzheimer’s disease: Preliminary studies. *Molecules*,

19(7), 9307–9317. <https://doi.org/10.3390/molecules19079307>

- Saw, C. L. L., Guo, Y., Yang, A. Y., Paredes-Gonzalez, X., Ramirez, C., Pung, D., & Kong, A. N. T. (2014). The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 72(August), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.038>
- Schmidt, Š., & Pokorný, J. (2005). Potential Application of Oilseeds as Sources of Antioxidants for Food Lipids – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 23(3), 93–102. <https://doi.org/10.17221/3377-CJFS>
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2016). Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *Journal of Lipid Research*, 57(6), 943–954. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067629>
- Schwab, N. V., Porcari, A. M., Coelho, M. B., Schmidt, E. M., Jara, J. L., Visentainer, J. V., & Eberlin, M. N. (2012). Easy dual-mode ambient mass spectrometry with Venturi self-pumping, canned air, disposable parts and voltage-free sonic-spray ionization. *Analyst*, 137(11), 2537–2540. <https://doi.org/10.1039/c2an16312h>
- Schwarz, K., & Ternes, W. (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 195(2), 99–103.
- Segat, G. C., Manjavachi, M. N., Matias, D. O., Passos, G. F., Freitas, C. S., Costa, R., & Calixto, J. B. (2017). Antiallodynic effect of β -caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. *Neuropharmacology*, 125, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.015>
- Servat, L., Obtidos, V., & Sementes, D. A. S. (2010). *Leila servat*.
- Servat, L., Spindola, H. M., Rodrigues, R. A. F., Sousa, I. M. O., Ruiz, A. L. T. G., De Carvalho, J. E., & Foglio, M. A. (2012). *Pterodon pubescens* benth: stability study of microencapsulated extract and isolated compounds monitored by antinociceptive assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(7), 1244–1253. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000700008>
- Shadidi, F., & Nazck, M. (2005). Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.

Techn. Publish. Com, 1–4.

- Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(4), 59–64. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1395.6085>
- Shao, D., Venkitasamy, C., Li, X., Pan, Z., Shi, J., Wang, B., Teh, H. E., & McHugh, T. H. (2015). Thermal and storage characteristics of tomato seed oil. *Lwt*, 63(1), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.010>
- Shekhar, N., Tyagi, S., Rani, S., & Thakur, A. K. (2022). Potential of Capric Acid in Neurological Disorders: An Overview. *Neurochemical Research*, 48(3), 697–712. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03809-4>
- Shirakami, Y., & Shimizu, M. (2018). Possible mechanisms of green tea and its constituents against cancer. *Molecules*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092284>
- Sieniawska, E., Sawicki, R., Golus, J., Swatko-Ossor, M., Ginalska, G., & Skalicka-Wozniak, K. (2018). *Nigella damascena* L. essential oil—a valuable source of β -elemene for antimicrobial testing. *Molecules*, 23(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules23020256>
- Silva-Júnior, M. C. S. (2005). *100 Árvores do Cerrado*.
- Silva, M. C. C., Gayer, C. R. M., Lopes, C. S., Calixto, N. O., Reis, P. A., Passaes, C. P. B., Paes, M. C., Dalmau, S. R., Sabino, K. C. C., & Todeschini, A. R. (2004). Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(1), 135–141.
- Simas, R. C., Barrera-Arellano, D., Eberlin, M. N., Catharino, R. R., Souza, V., & Alberici, R. M. (2012). Triacylglycerols oxidation in oils and fats monitored by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(7), 1193–1200. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2010-5>
- Simas, R. C., Catharino, R. R., Cunha, I. B. S., Cabral, E. C., Barrera-Arellano, D., Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2010). Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 135(4), 738–744. <https://doi.org/10.1039/b923272a>
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2016). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento* (A. Editora (ed.)).

- Singh, T. P., Singh, R. K., & Malik, P. (2014). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Annona squamosa* Linn bark. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(1), 60–64. <https://doi.org/10.31254/jsir.2014.3110>
- Singla, E., Dharwal, V., & Naura, A. S. (2020). Gallic acid protects against the COPD-linked lung inflammation and emphysema in mice. *Inflammation Research*, 69(4), 423–434. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01333-1>
- Sissons, C. H., Wong, L., & Cutress, T. W. (1996). Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques. *Archives of Oral Biology*, 41(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(95\)00103-4](https://doi.org/10.1016/0003-9969(95)00103-4)
- Smedes, F., & Askland, T. (1999). Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, 38(3), 193–201.
- Solano, R. J., Sierra, C. A., & Ávila Murillo, M. (2020). Antifungal activity of LDPE/lauric acid films against *Colletotrichum tamarilloi*. *Food Packaging and Shelf Life*, 24(July 2019), 100495. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100495>
- Sonboli, A., Babakhani, B., & Mehrabian, A. R. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 61(3–4), 160–164. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-3-401>
- Song, K.-H. (2022). Antibiotics for multidrug-resistant gram-positive bacteria. *J Korean Med Assoc*, 65(8), 478–489. <https://doi.org/10.5124/jkma.2022.65.8.478>
- Sousa, J. N., Paraíso, A. F., Andrade, J. M. O., Lelis, D. F., Santos, E. M., Lima, J. P., Monteiro-Junior, R. S., D'Angelo, M. F. S. V., de Paula, A. M. B., Guimarães, A. L. S., & Santos, S. H. S. (2020). Oral gallic acid improve liver steatosis and metabolism modulating hepatic lipogenic markers in obese mice. *Experimental Gerontology*, 134(February), 110881. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110881>
- Sousa, R. M. F., de Moraes, S. A. L., Vieira, R. B. K., Napolitano, D. R., Guzman, V. B., Moraes, T. S., Cunha, L. C. S., Martins, C. H. G., Chang, R., de Aquino, F. J. T., do Nascimento, E. A., & de Oliveira, A. (2015). Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. *Industrial Crops and Products*, 65, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.050>

- Souza, V. H. da S., Basting, R. T., Sousa, I. M. de O., Queiroz, N. D. C. A., Carvalho, J. E. de, & Foglio, M. A. (2020). Evaluation of non-clinical toxicity of extract and vouacapanes from fruits of *Pterodon pubescens* Benth. *Drug and Chemical Toxicology*, *0*(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1822858>
- Spindola, H. M., Carvalho, J. E. de, Ruiz, A. L. T. G., Rodrigues, R. A. F., Denny, C., Sousa, I. M., Tamashiro, J. Y., & Foglio, M. A. (2009). Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *20*, 569–575.
- Spindola, H. M., Servat, L., Denny, C., Rodrigues, R. A. F., Eberlin, M. N., Cabral, E., Sousa, I. M. O., Tamashiro, J. Y., Carvalho, J. E., & Foglio, M. A. (2010). Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacology*, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-10-1>
- Spindola, H. M., Servat, L., Rodrigues, R. A. F., Sousa, I. M. O., Carvalho, J. E., & Foglio, M. A. (2011). Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *656*(1–3), 45–51. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2011.01.025>
- Steffens, S., Veillard, N. R., Arnaud, C., Pelli, G., Burger, F., Staub, C., Zimmer, A., Frossard, J.-L., & Mach, F. (2005). Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*, *434*(7034), 782–786. <https://doi.org/10.1038/nature03389>
- Sunil, C., & Xu, B. (2019). An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry*, *166*(May), 112066. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112066>
- Suzuki, R. M., Sérgio Gomes, M. C., Sgorlon, J. G., Oliveira Defendi, R., Raimundini Aranha, A. C., & Sipoli, C. C. (2023). Reusing a residue from the juice industry: extraction of oil from passion fruit seeds and its incorporation into liposomes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.
- Szwajgier, D., Borowiec, K., & Zapp, J. (2019). Activity-guided purification reveals quercetin as the most efficient cholinesterase inhibitor in wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit extract. *Emirates Journal of Food and Agriculture*,

31(5), 386–394. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i5.1957>

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). *Fisiologia vegetal* (Artmed (ed.); 5th ed.).
- Takeuchi, H., Sekine, S., Kojima, K., & Aoyama, T. (2008). The application of medium-chain fatty acids: Edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(SUPPL. 1), 320–323.
- Tan, C. X., Chong, G. H., Hamzah, H., & Ghazali, H. M. (2018). Comparison of subcritical CO₂ and ultrasound-assisted aqueous methods with the conventional solvent method in the extraction of avocado oil. *Journal of Supercritical Fluids*, 135(November 2017), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.036>
- Tanaka, M., Sugama, A., Sumi, K., Shimizu, K., Kishimoto, Y., Kondo, K., & Iida, K. (2020). Gallic acid regulates adipocyte hypertrophy and suppresses inflammatory gene expression induced by the paracrine interaction between adipocytes and macrophages in vitro and in vivo. *Nutrition Research*, 73, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.09.007>
- Taofiq, O., Corrêa, R. C. G., Barros, L., Prieto, M. A., Bracht, A., Peralta, R. M., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). A comparative study between conventional and non-conventional extraction techniques for the recovery of ergosterol from *Agaricus blazei* Murrill. *Food Research International*, 125, 108541. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108541>
- Teshome, A., Dereje, B., Nwankwo, C. S., & Okpala, C. O. R. (2022). Physiochemical Properties, Lipid Breakdown, β -Carotenoids, Tocopherols, Vitamins, Amino and Fatty Acid Profiles of Soxhlet Extracted Oil from Different Garden Cress Seed (*Lepidium sativum* L.) Genotypes in Ethiopia. *Journal of Oleo Science*, 71(9), 1299–1308. <https://doi.org/10.5650/jos.ess22046>
- Toda, T. A., Santana, A. J. M., Ferreira, J. A., de Jesus Agnolon Pallone, E. M., de Aguiar, C. L., & da Costa Rodrigues, C. E. (2022). Evaluation of Techniques for Intensifying the Process of the Alcoholic Extraction of Coffee Ground Oil Using Ultrasound and a Pressurized Solvent. *Foods*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/foods11040584>
- Toledo, A. C. O., Assunção, D. P. da S. F. de, Boscardin, P. M. D., & Paula, J. de F. P. de. (2020). Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Produced With Aqueous Extract of *Pterodon Emarginatus* Vogel - Fabaceae Seeds Associated With Gentamicin Sulfate and Hyaluronic Acid With Potential Antimicrobial Activity /

- Bioss ntese E Caracteriza. *Brazilian Journal of Development*, 6(12), 100655–100677. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-526>
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Tsukui, A., Santos J nior, H. M., Oigman, S. S., De Souza, R. O. M. A., Bizzo, H. R., & Rezende, C. M. (2014). Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. *Food Chemistry*, 164, 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.039>
- Tung, Y. T., Chua, M. T., Wang, S. Y., & Chang, S. T. (2008). Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technology*, 99(9), 3908–3913. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.050>
- Turkez, H., Togar, B., Tatar, A., Geyikoglu, F., & Hacimuftuoglu, A. (2014). Cytotoxic and cytogenetic effects of α -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia (Poland)*, 69(7), 936–942. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0393-5>
- Tutunchi, P., Roufegarinejad, L., Hamishehkar, H., & Alizadeh, A. (2019). Extraction of red beet extract with β -cyclodextrin-enhanced ultrasound assisted extraction: A strategy for enhancing the extraction efficacy of bioactive compounds and their stability in food models. *Food Chemistry*, 297, 124994. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124994>
- Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4–14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>
- Tzima, K., Brunton, N. P., Lyng, J. G., Frontuto, D., & Rai, D. K. (2021). The effect of Pulsed Electric Field as a pre-treatment step in Ultrasound Assisted Extraction of phenolic compounds from fresh rosemary and thyme by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 69(September 2020), 102644. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102644>
- Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606–4610. <https://doi.org/10.1128/aem.65.10.4606-4610.1999>

- Valentim, D. S. S., Duarte, J. L., Oliveira, A. E. M. F. M., Cruz, R. A. S., Carvalho, J. C. T., Conceição, E. C., Fernandes, C. P., & Tavares-Dias, M. (2018). Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows in vitro efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae). *Journal of Fish Diseases*, *41*(3), 443–449. <https://doi.org/10.1111/jfd.12739>
- Veiga, A., Toledo, M. da G. T., Rossa, L. S., Mengarda, M., Stofella, N. C. F., Oliveira, L. J., Gonçalves, A. G., & Murakami, F. S. (2019). Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. *Journal of Microbiological Methods*, *162*(May), 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>
- Vieira, C. R., Marques, M. F., Soares, P. R., Matuda, L., de Oliveira, C. M. A., Kato, L., da Silva, C. C., & Guillo, L. A. (2008). Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. *Phytomedicine*, *15*(6–7), 528–532. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.08.003>
- Vigbedor, B. Y., Osei Akoto, C., & Neglo, D. (2023). Isolation and Identification of Flavanone Derivative Eriodictyol from the Methanol Extract of *Azelia africana* Bark and Its Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2023*. <https://doi.org/10.1155/2023/9345047>
- Vila Verde, G. M., Barros, D. A., Oliveira, M. S., Aquino, G. L. B., Santos, D. M., de Paula, J. R., Dias, L. D., Pi eiro, M., & Pereira, M. M. (2018). A Green Protocol for Microwave-Assisted Extraction of Volatile Oil Terpenes from *Pterodon emarginatus* Vogel. (Fabaceae). *Molecules*, *23*(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030651>
- Vuković, N., Vukić, M., Đelić, G., Kacaniova, M., & Cvijović, M. (2018). The investigation of bioactive secondary metabolites of the methanol extract of *eryngium amethystinum*. *Kragujevac Journal of Science*, *40*(40), 113–129. <https://doi.org/10.5937/kgjsci1840113v>
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (Vol. 99, Issue 1). CRC Press.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(6), 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wang, Q., Sohrabi, R., & Tholl, D. (2014). Analysis of diterpenes and triterpenes from plant

foliage and roots. *Plant Isoprenoids: Methods and Protocols*, 149–159.

- Wang, R., Zhu, X., Wang, Q., Li, X., Wang, E., Zhao, Q., Wang, Q., & Cao, H. (2020). The anti-tumor effect of taxifolin on lung cancer via suppressing stemness and epithelial-mesenchymal transition in vitro and oncogenesis in nude mice. *Annals of Translational Medicine*, 8(9), 590–590. <https://doi.org/10.21037/atm-20-3329>
- Wang, S. (2012). A review of medicinal plant species with elemene in China. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(44), 3032–3040. <https://doi.org/10.5897/ajpp11.670>
- Właź, P., Socała, K., Nieoczym, D., Łuszczki, J. J., Arnowska, I., Arnowski, T., Czuczwar, S. J., & Gasiór, M. (2012). Anticonvulsant profile of caprylic acid, a main constituent of the medium-chain triglyceride (MCT) ketogenic diet, in mice. *Neuropharmacology*, 62(4), 1882–1889. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.015>
- Xiaoyun, G., Xiang, F., Xingchuang, X., Ye, S., & Zhao, Y. (2017). *Polarity inversion voltage strategy based nano-ESI (nano-electrospray ionization) and operation method thereof*.
- Xie, G., Meng, X., Wang, F., Bao, Y., & Huo, J. (2017). Eriodictyol attenuates arsenic trioxide-induced liver injury by activation of Nrf2. *Oncotarget*, 8(40), 68668–68674. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19822>
- Xie, P. J., Huang, L. X., Zhang, C. H., You, F., & Zhang, Y. L. (2015). Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. *Food and Bioproducts Processing*, 93(February), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.10.004>
- Xie, X., Feng, J., Kang, Z., Zhang, S., Zhang, L., Zhang, Y., Li, X., & Tang, Y. (2017). Taxifolin protects RPE cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Molecular Vision*, 23(December 2016), 520–528.
- Xinmei, X., Ning, X., & Jianbin, H. (2015). Physiological function of phytosterol and its application. *Animal Husbandry and Feed Science*.
- Yang, W. S., Kim, D., Yi, Y. S., Kim, J. H., Jeong, H. Y., Hwang, K., Kim, J. H., Park, J., & Cho, J. Y. (2017). AKT-targeted anti-inflammatory activity of the methanol extract of *Chrysanthemum indicum* var. *albescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 201, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.001>
- Yao, C., Jiang, J., Tu, Y., Ye, S., Du, H., & Zhang, Y. (2014). β -elemene reverses the drug

- resistance of A549/DDP lung cancer cells by activating intracellular redox system, decreasing mitochondrial membrane potential and P-glycoprotein expression, and inducing apoptosis. *Thoracic Cancer*, 5(4), 304–312. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12093>
- Yao, Z., Gu, Y., Zhang, Q., Liu, L., Meng, G., Wu, H., Xia, Y., Bao, X., Shi, H., Sun, S., Wang, X., Zhou, M., Jia, Q., Wu, Y., Song, K., Gao, W., Guo, C., & Niu, K. (2019). Estimated daily quercetin intake and association with the prevalence of type 2 diabetes mellitus in Chinese adults. *European Journal of Nutrition*, 58(2), 819–830. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1713-2>
- Yu, T., Yang, Y., Kwak, Y. S., Song, G. G., Kim, M. Y., Rhee, M. H., & Cho, J. Y. (2017). Ginsenoside Rc from *Panax ginseng* exerts anti-inflammatory activity by targeting TANK-binding kinase 1/interferon regulatory factor-3 and p38/ATF-2. *Journal of Ginseng Research*, 41(2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.02.001>
- Zainuddin, M. F., Fai, C. K., Ariff, A. B., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2021). Current pretreatment/cell disruption and extraction methods used to improve intracellular lipid recovery from oleaginous yeasts. *Microorganisms*, 9(2), 1–28. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020251>
- Zaniol, F., Calisto, J. F. F., Cozzer, G., Ferro, D. M., Dias, J. L., Rodrigues, L. G. G., Mazzutti, S., Rezende, R. S., Simões, D. A., Ferreira, S. R. S., Dal Magro, J., & Oliveira, J. V. (2020). Comparative larvicidal effect of *Pterodon* spp. extracts obtained by different extraction methods. *Journal of Supercritical Fluids*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104993>
- Zhanataev, A. K., Kulakova, A. V., Nasonova, V. V., & Durnev, A. D. (2008). In vivo study of dihydroquercetin genotoxicity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 145(3), 338–340. <https://doi.org/10.1007/s10517-008-0085-7>
- Zhang, H., Yuan, Y., Zhu, X., Xu, R., Shen, H., Zhang, Q., & Ge, X. (2022). *Physicochemical Properties, and Volatile Compounds from*.
- Zhang, J., Zhang, H. da, Chen, L., Sun, D. W., Mao, C. fei, Chen, W., Wu, J. Z., Zhong, S. L., Zhao, J. H., & Tang, J. H. (2014). β -elemene reverses chemoresistance of breast cancer via regulating MDR-related microRNA expression. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry*,

- and Pharmacology*, 34(6), 2027–2037. <https://doi.org/10.1159/000366398>
- Zhang, Q. A., Zhang, Z. Q., Yue, X. F., Fan, X. H., Li, T., & Chen, S. F. (2009). Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry*, 116(2), 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.071>
- Zhang, W. Y., Lee, J. J., Kim, Y., Kim, I. S., Han, J. H., Lee, S. G., Ahn, M. J., Jung, S. H., & Myung, C. S. (2012). Effect of eriodictyol on glucose uptake and insulin resistance in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7652–7658. <https://doi.org/10.1021/jf300601z>
- Zhang, Y., Zhang, R., & Ni, H. (2020). Eriodictyol exerts potent anticancer activity against A549 human lung cancer cell line by inducing mitochondrial-mediated apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *Archives of Medical Science*, 16(2), 446–452. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.85152>
- Zhang, Z. R., Al Zaharna, M., Wong, M. M. K., Chiu, S. K., & Cheung, H. Y. (2013). Taxifolin Enhances Andrographolide-Induced Mitotic Arrest and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells via Spindle Assembly Checkpoint Activation. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054577>
- Zhen, Z., Xi, T. F., & Zheng, Y. F. (2015). Surface modification by natural biopolymer coatings on magnesium alloys for biomedical applications. In *Surface Modification of Magnesium and Its Alloys for Biomedical Applications* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-078-1.00011-6>
- Zhong, J., Wang, Y., Yang, R., Liu, X., Yang, Q., & Qin, X. (2018). The application of ultrasound and microwave to increase oil extraction from *Moringa oleifera* seeds. *Industrial Crops and Products*, 120(April), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.028>
- Zhou, J., Wang, M., Saraiva, J. A., Martins, A. P., Pinto, C. A., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Cao, H., Xiao, J., & Barba, F. J. (2022). Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry*, 384, 132236.
- Zhou, K., Wang, L., Cheng, R., Liu, X., Mao, S., & Yan, Y. (2017). Elemene Increases Autophagic Apoptosis and Drug Sensitivity in Human Cisplatin (DDP)-Resistant Lung Cancer Cell Line SPC-A-1/DDP By Inducing Beclin-1 Expression. *Oncology Research*. <https://doi.org/10.3727/096504017x14954936991990>

- Zhu, G. F., Guo, H. J., Huang, Y., Wu, C. T., & Zhang, X. F. (2015). Eriodictyol, a plant flavonoid, attenuates LPS-induced acute lung injury through its antioxidative and anti-inflammatory activity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *10*(6), 2259–2266. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2827>
- Zhu, T., Li, X., Luo, L., Wang, X., Li, Z., Xie, P., Gao, X., Song, Z., Su, J., & Liang, G. (2015). Reversion of malignant phenotypes of human glioblastoma cells by β -elemene through β -catenin-mediated regulation of stemness-, differentiation- and epithelial-to-mesenchymal transition-related molecules. *Journal of Translational Medicine*, *13*, 356. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0727-2>
- Zia, S., Khan, M. R., Zeng, X. A., Sehrish, Shabbir, M. A., & Aadil, R. M. (2019). Combined effect of microwave and ultrasonication treatments on the quality and stability of sugarcane juice during cold storage. *International Journal of Food Science and Technology*, *54*(8), 2563–2569. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14167>
- Žlabur, J. Š., Brajer, M., Voća, S., Galić, A., Radman, S., Rimac-Brnčić, S., Xia, Q., Zhu, Z., Grimi, N., Barba, F. J., & Hulak, N. (2021). Ultrasound as a promising tool for the green extraction of specialized metabolites from some culinary spices. *Molecules*, *26*(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules26071866>
- Zou, B., Li, Q. Q., Zhao, J., Li, J. M., Cuff, C. F., & Reed, E. (2013). β -Elemene and taxanes synergistically induce cytotoxicity and inhibit proliferation in ovarian cancer and other tumor cells. *Anticancer Research*, *33*(3), 929–940.
- Zwingelstein, M., Draye, M., Besombes, J. L., Piot, C., & Chatel, G. (2020). Viticultural wood waste as a source of polyphenols of interest: Opportunities and perspectives through conventional and emerging extraction methods. *Waste Management*, *102*, 782–794. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.11.034>