

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

BRUNO HENRIQUE FONTOURA

**DETERMINAÇÃO RÁPIDA E DE BAIXO CUSTO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE EM CASCAS DE CASTANHEIRA UTILIZANDO IMAGENS
DIGITAIS E MODELO DE REGRESSÃO MULTIVARIADA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO – PR
2021**

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

BRUNO HENRIQUE FONTOURA

**DETERMINAÇÃO RÁPIDA E DE BAIXO CUSTO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE EM CASCAS DE CASTANHEIRA UTILIZANDO IMAGENS
DIGITAIS E MODELO DE REGRESSÃO MULTIVARIADA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO – PR
2021

BRUNO HENRIQUE FONTOURA

**DETERMINAÇÃO RÁPIDA E DE BAIXO CUSTO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE EM CASCAS DE CASTANHEIRA UTILIZANDO IMAGENS
DIGITAIS E MODELO DE REGRESSÃO MULTIVARIADA**

**RAPID AND LOW-COST DETERMINATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL
IN HULLS OF BRAZIL NUT USING DIGITAL IMAGES AND MULTIVARIATIONAL
REGRESSION MODEL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Curso de Bacharelado em
Química da Universidade Tecnológica Federal
do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Solange Teresinha
Carpes

Coorientador: Dr^a. Ellen Cristina Perin

PATO BRANCO

2021



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE
TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO DEPARTAMENTO DE



QUÍMICA BACHARELADO

TERMO DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO RÁPIDA E DE BAIXO CUSTO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM
CASCAS DE *Bertholletia excelsa*, UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS E MODELOS DE
REGRESSÃO MULTIVARIADA

POR

BRUNO HENRIQUE FONTOURA

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 09 DE JUNHO às 09h:30min., como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^a. Dr^a. Solange Teresinha Carpes
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ellen Cristina Perin
Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Marina Leitte Mitterer Daltoé
Membro da banca

Prof. Dr. Luciano Lucchetta
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064.027120/2021-48.

Dedico à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida e por ter chegado até aqui com saúde. A minha família, Pai, Mãe e irmão que sempre se doaram para que eu tenha conseguido chegar até este momento.

As minhas avós, avó e madrinha pelas orações e carinho.

A Família Decarli, Alberto, Carmem, Pablo, Edina, Ariadne, Ariel, Iris pela amizade e pelo incentivo, conversas, conselhos e por der dado suporte em muitos momentos de minha vida.

Aos meus amigos, Francisco Edval Neto, Carla Elisa Sarolli, Juliana Giantini da Silva, Patrick Albani, Pâmela Savi Mondo, por sempre estarem do meu lado, me incentivando, auxiliando, aconselhando e principalmente sendo amigo(a) nos momentos de necessidade.

A profª Drª Ana Paula Bilck, pelo incentivo e mostrar o caminho a seguir, pelas conversas divertidas e ensinamentos.

Aos Profªs Dras Mariana Sikora, Raquel Dalla Costa da Rocha e ao Prof Dr Rodrigo Brackmann professores (as) que considero meus amigos (as).

A minha Orientadora Profª Drª Solange Teresinha Carpes, por ter acreditado no meu potencial e ter aberto as portas quando muitos as fecharam.

A minha amiga e Coorientadora Drª Ellen Cristina Perin, pelo auxílio, ensinamentos, paciência, broncas, desabafos, os meus “vou desistir”. Por ter se doado a me auxiliar, muitas vezes abrindo as portas da sua casa e doando seu tempo para o meu bem, Obrigado!

A minha amiga Bruna Perin, pela amizade, carinho, auxílio no laboratório, deixando muitas vezes de lado suas coisas para me auxiliar.

RESUMO

FONTOURA, Bruno Henrique. Determinação rápida e de baixo custo de baixo custo do potencial antioxidante das cascas da castanheira utilizando imagens digitais e modelo de regressão multivariada. 2021. 65 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2021.

O Brasil possui uma vasta biodiversidade e dentre as plantas encontradas no território brasileiro está a *Bertholletia excelsa*, conhecida popularmente como castanheira, muito reconhecida pela sua amêndoa a castanha-do-pará. Os metabolitos especializados são compostos essenciais para as plantas, os quais atuam como defesa à agentes biótico e abiótico. Colaboram na perpetuação da espécie e na sua adaptação ao ambiente e ao clima. Podemos destacar os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides como metabólitos especializados. Esses compostos podem possuir potencial antioxidante. Antioxidantes são compostos (endógenos ou exógenos) que podem neutralizar os radicais livres, que são moléculas endógenas ou geradas por fatores externos com elétrons desemparelhados, os quais podem causar dano celular. O desequilíbrio entre radicais livres e antioxidantes, pode gerar o estresse oxidativo, responsável por certas doenças degenerativas como Mal de Alzheimer, Parkinson e até mesmo câncer. Com o objetivo de extrair compostos com potencial antioxidante é importante realizar um planejamento experimental para otimizar a extração desses compostos bioativos. Desta forma, ensaios como compostos fenólicos totais (CFT), ABTS, DPPH e FRAP são úteis para avaliar o potencial antioxidante em extratos de plantas. Para auxiliar nessa otimização e quantificação, ferramentas estatísticas podem ser utilizadas, a fim de observar os fatores que influenciam na extração como tempo, temperatura e concentração do solvente e nos levar de uma forma segura a obtenção das melhores condições de extração. Na procura por facilidade nos processos do dia-a-dia de laboratório e na minimização dos custos de análises foram desenvolvidos modelos quimiométricos a fim de prever as características de interesse. Neste sentido, neste trabalho, modelos utilizando imagens digitais foram utilizados para avaliar o potencial antioxidante em extratos de cascas de castanheira. O delineamento composto central rotacional (CCR) utilizado no estudo sugeriu como melhor condição de extração CFT com atividade

antioxidante aquela próxima ao ponto central, cuja concentração de etanol foi de 50%. Os resultados indicaram uma modelagem eficiente para CFT, FRAP e DPPH, já o modelo para o ensaio ABTS mostrou necessitar de outros testes para a busca de um modelo mais eficiente.

Palavras chave: *Bertholletia excelsa*. Castanheira Antioxidante. Otimização. Quimiometria.

ABSTRACT

FONTURA, Bruno Henrique. Fast and low-cost determination of the antioxidant potential in Brazil nut using digital images and multivariate regression model. 2021. 65 f. Course completion work (Bachelor of Chemistry) Federal Technological University of Paraná. White Duck, 2021.

Brazil has a vast biodiversity and among the plants found in the Brazilian territory is the *Bertholletia excelsa*, popularly known as Brazil nut, well known for its almond and Brazil nut. Specialized metabolites are essential compounds for plants, which act as a defense to biotic and abiotic agents. They collaborate in the perpetuation of the species and its adaptation to the environment and climate. We can highlight phenolic compounds, terpenes and alkaloids as specialized metabolites. These compounds may have antioxidant potential. Antioxidants are compounds (endogenous or exogenous) that can neutralize free radicals, which are endogenous molecules or molecules generated by external factors with unpaired electrons, which can cause cell damage. The imbalance between free radicals and antioxidants can generate oxidative stress, responsible for certain degenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and even cancer. In order to extract compounds with antioxidant potential, it is important to carry out an experimental design to optimize the extraction of these bioactive compounds. Thus, tests such as total phenolic compounds (CFT), ABTS, DPPH and FRAP are useful to assess the antioxidant potential in plant extracts. To assist in this optimization and quantification, statistical tools can be used, in order to observe the factors that influence the extraction such as time, temperature and solvent concentration and lead us in a safe way to obtain the best extraction conditions. In the search for ease in the daily laboratory processes and the minimization of analysis costs, chemometric models were developed in order to predict the characteristics of interest. In this sense, in this work, models using digital images were used to evaluate the antioxidant potential in chestnut bark extracts. The central composite rotational design (CCR) used in the study suggested as the best condition for CFT extraction with antioxidant activity the one close to the central point, whose ethanol concentration was 50%. The results indicated an

efficient modeling for CFT, FRAP and DPPH, while the model for the ABTS test showed that it needed other tests to search for a more efficient model.

Keywords: *Bertholletia excelsa*. Brazil nut Antioxidant. Optimization. Chemometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Bertholletia excelsa*, conhecida popularmente como castanheira, castanha do brasil e castanho do pará. 23
- Figura 2 – estrutura química do ácido gálico, classificado como um composto fenólico simples. 24
- Figura 3 – estrutura química da quercetina, classificada como um polifenol. 25
- Figura 4 - exemplo genérico do mecanismo de ao dos antioxidantes. 28
- Figura 5 - mecanismo de reao ABTS 29
- Figura 6 - mecanismo de reao do método DPPH 29
- Figura 7 - mecanismo de reao do método FRAP 29
- Figura 8 - gráficos de superfície de resposta e contorno (a-c e d-f) respectivamente para os efeitos de solvente (concentrao de etanol (%)), da temperatura de extrao (c) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (pff) no teor de compostos fenólicos totais (cft) em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira). 47
- Figura 9 - gráficos de superfície de resposta e contorno (a-c e d-f) respectivamente para os efeitos de solvente (concentrao de etanol (%)), da temperatura de extrao (c) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (pff) em atividade antioxidante pelo método abts em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira). 48
- Figura 10 - gráficos de superfície de resposta e contorno (a-c e d-f) respectivamente para os efeitos de solvente (concentrao de etanol (%)), da temperatura de extrao (c) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (pff) em atividade antioxidante pelo método dpph em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira). 49
- Figura 11 - gráficos de superfície de resposta e contorno (a-c e d-f) respectivamente para os efeitos de solvente (concentrao de etanol (%)), da temperatura de extrao (c) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (pff) em atividade antioxidante pelo método frap em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira). 50
- Figura 12 - gráficos de pareto para os efeitos de solvente (concentrao de etanol (%)), da temperatura de extrao (c) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (pff) no teor de compostos fenólicos totais (cft) (a) e

atividade antioxidante pelos métodos abts (b), dpvh (c) e frap (d) em cascas de <i>Bertholletia excelsa</i> (castanheira).	51
Figura 13 - imagens superiores das repetições do extrato obtidos a partir do planejamento experimental	56
Figura 14 - imagens obtidas na análise de CFT.	57
Figura 15 - imagens obtidas na análise de aa pelo método ABTS.	57
Figura 16 - imagens obtidas na análise de aa pelo método DPPH.	58
Figura 17 - imagens obtidas na análise de aa pelo método FRAP.	58
Figura 18 - gráficos da relação dados observados versus preditos para compostos fenólicos obtido pelas imagens dos extratos (ie) (a) e das imagens dos ensaios (ien) (b) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (pls). Nvl: número ótimo de variáveis latentes, pd: proporção dependente, r ² : coeficiente de determinação, rmsec: raiz quadrada média dos erros de calibração, rpd: valor predito residual em cascas de <i>Bertholletia excelsa</i> (castanheira).	59
Figura 19 - gráficos da relação dados observados versus preditos para atividade antioxidante pelo método abts obtido pelas imagens dos extratos (ie) (a) e das imagens dos ensaios (ien) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (pls). Nvl: número ótimo de variáveis latentes, pd: proporção dependente, r ² : coeficiente de determinação, rmsec: raiz quadrada média dos erros de calibração, rpd: valor predito residual em cascas de <i>Bertholletia excelsa</i> (castanheira).	60
Figura 20 - gráficos da relação dados observados versus preditos para atividade antioxidante pelo método dpvh obtido pelas imagens dos extratos (ie) (a) e das imagens dos ensaios (ien) (b) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (pls). Nvl: número ótimo de variáveis latentes, pd: proporção dependente, r ² : coeficiente de determinação, rmsec: raiz quadrada média dos erros de calibração, rpd: valor predito residual em cascas de <i>Bertholletia excelsa</i> (castanheira).	61
Figura 21 - gráficos da relação dados observados versus preditos para atividade antioxidante pelo método frap obtido pelas imagens dos extratos (ie) (a) e das imagens dos ensaios (ien) (b) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (pls). Nvl: número ótimo de variáveis latentes, pd: proporção dependente, r ² : coeficiente de determinação, rmsec: raiz	

quadrada média dos erros de calibração, rpd: valor predito residual em
cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Planejamento experimental **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- Tabela 2 - Planejamento experimental e resultados. 40
- Tabela 3 - efeitos lineares, quadráticos e efeitos de interação das variáveis tempo de extração, temperatura de extração e concentração de etanol (%) utilizando delineamento composto central rotacional (dccb) sobre as variáveis resposta teor de compostos fenólicos totais (cft) em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira). 42
- Tabela 4 - Efeitos lineares, quadráticos e efeitos de interação das variáveis tempo de extração, temperatura de extração e concentração de etanol (%) utilizando delineamento composto central rotacional (dccb) sobre as variáveis resposta atividade antioxidante pelos métodos abts, dpph e frap em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira). 43
- Tabela 5 - Equações do modelo de regressão empregadas para determinar a melhor condição de extração, coeficientes de correlação (r^2), qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (g.l) para cada variável (compostos fenólicos totais (tpc), métodos antioxidantes abts, dpph e frap) em delineamento composto central rotacional (dccb) em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).53
- Tabela 6 - Resultado obtidos através das equações com os coeficientes de regressão significativos por análise estatística obtidas pelo modelo. 54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1. OBJETIVOS	20
1.2 GERAL	20
1.3 ESPECIFICOS	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	21
3.2 BERTHOLLETIA EXCELSA – CASTANHEIRA	22
3.3 METABÓLITOS ESPECIALIZADOS	23
3.3.1 Compostos fenólicos	24
3.3.2 Alcalóides	25
3.3.3 Terpenos	26
3.4 RADICAIS LIVRES	26
3.5 ANTIOXIDANTES	27
3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	34
4.2 PREPARO DO EXTRATO	35
4.3 VARIÁVEIS DEPENDENTES	35
4.3.1 Compostos fenólicos totais	35
4.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS	35
4.3.3 Atividade antioxidante pelo método DPPH	36
4.3.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP	36
4.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO PLSR	36
4.5 ANÁLISE ESTÁTICA	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 EFEITO DOS FATORES: CONCENTRAÇÃO DE ETANOL, TEMPERATURA E TEMPO DE EXTRAÇÃO NAS ANÁLISES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ABTS, DPPH E FRAP).	39
5.2 GRAFICOS DE SUPERFÍCIES DE RESPOSTA	45
5.3 RESPOSTA GLOBAL (RG)	52
5.4 DESEMPENHO DA PREVISÃO DO MODELO DE REGRESSÃO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLSR)	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Em nosso planeta existe uma infinidade de plantas com variadas características e aplicações. O Brasil possui uma rica flora, uma vez que a maior floresta do mundo, a floresta amazônica se encontra no território brasileiro (Souza et al., 2019).

Entre essa vasta gama de plantas, existem diversas com propriedades medicinais, muitas delas já bem conhecidas e utilizadas e outras ainda não elucidadas, apenas com conhecimento empírico.

Dentre as plantas que fazem parte da flora brasileira podemos destacar a *Bertholletia excelsa*, conhecida pelo seu nome popular, castanheira, doravante chamada dessa forma. É uma árvore de grande porte e mais popularmente conhecida por sua amêndoa, a castanha-do-pará (John; Shahidi., 2010).

A castanha-do-pará é um alimento que possui presença significativa de micronutrientes como: sódio, potássio, magnésio e selênio (Santos et al., 2010). Existem estudos relatando a atividade antioxidante da castanha-do-pará (Maldonado et al., 2020; Nascimento et al., 2020; Sartori et al., 2020; Gomes et al., 2019), porém são escassos os estudos abordando o potencial antioxidante das cascas dessa árvore.

Dentre os compostos com potencial antioxidante, alguns são pertencentes ao metabolismo especializado das plantas. Compostos desse metabolismo não apresentam função estrutural e vital para a vida das plantas, muito embora, alguns compostos sejam essenciais em diversas situações, principalmente as relacionadas a situações de estresse biótico e abiótico (Barat et al., 2017).

Além disso, a síntese destas substâncias pode trazer grandes vantagens competitivas e adaptativas em relação as demais plantas, condição tal denominada alelopatia (Latif et al., 2017).

Esses compostos também possuem função de defesa de patógenos e insetos, pigmentação e reprodução através de polinizadores e adaptações de modo geral (Moore et al., 2019).

Como metabólitos especializados podemos destacar as três principais macroclasses pertinentes: os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (Rai et al., 2017).

Os compostos fenólicos são uma das principais classes dos metabólitos especializados com estrutura e função bem definidas, podendo ser divididos em diversas subclasses, desde um composto mais simples como um fenol simples, até aos polifenóis (compostos fenólico com mais de um anel aromático), com diversas outras classes incluídas (Izidoro et al., 2021).

O consumo dessa classe de compostos tem sido associado a efeitos benéficos para a saúde, por apresentarem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobianas, em função da atividade biológica em que esses compostos agem, de forma a neutralizar os radicais livres ou até mesmo inibir suas ações deletérias em nosso organismo (Oliveira et al., 2011).

Contudo, constantemente os organismos dos seres humanos produzem compostos de defesas (antioxidantes endógenos), em função de reações e situações adversas (situações que fujam da homeostase) (Gutteridge et al., 2018).

A produção desses compostos tende a ocorrer em maior intensidade quando da ocorrência do aumento da produção de radicais livres por alguma determinada situação.

No entanto, quando a produção de radicais livres é superior à produção de antioxidantes naturais do organismo, leva a necessidade de obtenção de compostos antioxidantes por meio da dieta (antioxidantes exógenos) (Gomes et al., 2013).

O desequilíbrio entre radicais livres e antioxidantes é chamado estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010).

Na prática, para identificação e estimativa de compostos com potencial antioxidante *in vitro*, podemos destacar o método de quantificação de compostos fenólicos totais (classe de foco nesse estudo) e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP (Badarinath et al., 2010).

No entanto, no processo de identificação e quantificação desses compostos, se faz necessário a realização de otimização das condições, visando resultados mais seguros, de maior confiabilidade e reprodutibilidade.

Para realizar a otimização das condições de extração de compostos bioativos, normalmente é necessário a utilizar um planejamento experimental, onde fatores como, concentração de solvente, temperatura e tempo de extração são testados afim de definir a condição que maximiza a extração desses compostos (Andrade et al., 2015).

No entanto, dependendo do planejamento utilizado, pode demandar uma grande quantidade de experimentos, elevando o custo e o tempo para realização do estudo.

Logo, visando reduzir tal demanda, pode-se utilizar planejamentos estatísticos reduzidos com menos experimentos, a exemplo o fatorial fracionado, Box-Behnken e o composto central rotacional (Zamora-Gasga et al., 2017).

Também é importante ressaltar que além de planejamentos podemos utilizar diversas ferramentas estatísticas que auxiliam também na obtenção de dados igualmente confiáveis.

Uma das ferramentas que vem sendo empregada é a quimiometria, onde um modelo matemático é gerado a fim de prever as variáveis resposta de maneira mais rápida e de baixo custo (Morellos et al., 2016).

O presente trabalho tem por objetivo a otimização das condições de extração (concentração de etanol, temperatura e tempo de extração) das cascas do tronco da castanheira (*Bertholletia excelsa*) (castanheira) a fim de quantificar os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante por diferentes métodos.

Em paralelo, será realizado a construção de um modelo matemático com a finalidade de prever as mesmas variáveis supracitadas, de forma rápida e com baixo custo utilizando imagens digitais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo desse estudo foi otimizar a extração para quantificar o teor total dos compostos fenólicos e atividade antioxidante nos extratos das cascas do tronco da castanheira (*Bertholletia excelsa*) e gerar modelos quimiométricos das mesmas variáveis resposta por meio de análise de imagens digitais para prever valores de concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante no extrato de castanheira.

2.2 ESPECIFICOS

- Elaborar um planejamento experimental eficaz na extração de compostos com potencial antioxidante;
- Estimar através de ferramentas estatísticas a melhor condição de extração;
- Elaborar um modelo quimiométrico para prever compostos fenólicos totais e atividade antioxidante através da utilização de imagens digitais e calibração multivariada.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Desde os tempos mais antigos os seres humanos vêm buscando formas de melhorar sua saúde e qualidade de vida, buscando estratégias para prevenção de enfermidades. A utilização de plantas medicinais com esse intuito destacava-se como sendo a única forma de tratamento e prevenção de enfermidades até o advento da farmacologia (Dalar et al., 2018).

Atualmente o uso de plantas medicinais tem sido bastante disseminado, principalmente em países em desenvolvimento, uma vez que, a utilização de fitoterápicos tem apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Mattos et al., 2018).

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Existem registros históricos datados de 2800 anos a.C. de que civilizações antigas como egípcios, hindus e chineses faziam uso de plantas medicinais para tratamentos de saúde, sendo que a utilização de plantas medicinais era a única forma de tratamento e prevenção de enfermidades até os avanços da farmacologia nos séculos XIX e XX (Firmo et al., 2011).

De acordo com a OMS para uma planta ser considerada medicinal, ela precisa possuir, em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (Lima et al., 2016).

Existem uma ampla variedade de plantas que são vendidas em mercados populares, feiras livres, lojas de produtos naturais e até mesmo em farmácias, comercializadas muitas vezes em escala industrial, garantindo diversos benefícios a saúde (Rocha et al., 2013).

Entretanto, os benefícios anunciados ou até mesmo repassados através do senso comum (conhecimento empírico) não possuem validade científica quanto sua eficácia e ou toxicidade se fazendo necessário o desenvolvimento de pesquisas científicas para comprovações de tais propriedades (Balbino; Dias, 2010).

No território brasileiro encontra-se a floresta amazônica, com uma das maiores biodiversidades do mundo, possuindo uma grande variedade de plantas com seu

potencial medicinal já caracterizado, mas por outro lado há diversas plantas que ainda não foram elucidadas (Santos; Ferreira., 2005).

3.2 CASTANHEIRA - *Bertholletia excelsa*

A *Bertholletia excelsa* (

Figura 1), conhecida popularmente como castanheira, castanheira verdadeira, castanha do Pará e castanha do Brasil, pertence a família das Lecitidáceas, é uma planta nativa do Brasil e tem ampla distribuição na floresta Amazônica (Santos et al., 2010).

Considerada de grande porte, a castanheira pode medir até 60 m de altura, e seu diâmetro pode medir de 100 a 180 cm (Costa et al., 2009).

Existe uma grande valorização da sua amêndoa, por ser comestível e possuir elevado valor nutricional (Bouvie et al., 2016). A castanha possui elevada concentração de selênio e grandes quantidades de cálcio, magnésio, folato, sódio e potássio (Dumont et al., 2006; Lemire et al., 2009; Segura et al., 2006).

Popularmente a castanheira é utilizada como alimento e seus resíduos podem ser utilizados na geração de energia e também na área medicinal (Shanley et al., 2005).

Existem relatos na literatura de atividade anti-inflamatória tripanocida, sendo o extrato de castanheira capaz de inibir o crescimento do *Trypanossoma cruzi* agente causador da doença de chagas (Campos et al., 2005).

Também há relatos na literatura da presença de compostos fenólicos e tocoferóis (Santos et al., 2013), ambos compostos que apresentam potencial antioxidante (Yang et al., 2009), e que vem sendo associados a diversos benefícios a saúde (Del Ré; Jorge., 2012).

Existe uma vasta quantidade estudos a respeito da amêndoa da castanheira, porem são escassos os estudos a respeito das características da *Bertholletia excelsa* em outras matrizes da planta.

Figura 1 - *Bertholletia excelsa*, conhecida popularmente como castanheira, castanha do Brasil e castanho do Pará.



Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/37306682/extrativismo-da-castanha-do-brasil-e-avaliado-em-estudo-antropologico>

3.3 METABÓLITOS ESPECIALIZADOS

As plantas produzem diversos compostos orgânicos necessários para sua sobrevivência, estes podem ser divididos em metabólitos primários e secundários, este último atualmente chamado metabolismo especializado.

Os metabólitos primários correspondem as substâncias que realizam os processos fotossintéticos, apresentam função estrutural e de armazenamento de energia (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, lipídeos), sendo essenciais para os processos vitais das plantas (Cunha et al., 2016).

Já os metabólitos especializados diferentemente dos primários não possuem função estrutural, tampouco energética, sua função é principalmente relacionada a defesa das plantas frente a situações de estresses, sejam eles bióticos ou abióticos.

Além disso, atua também na produção de compostos visando a atração de agentes polinizadores (compostos com cor, odor e sabor) e competitividade entre plantas, como sobrevivência (alelopatia) (Matsuura et al., 2018).

Essas características surgiram evolutivamente com a necessidade de sobrevivência, através de mutações surgiram novos compostos com tal finalidade. Porém, cada espécie possui suas próprias características quanto a presença de metabólitos especializados, podendo ser divididos basicamente em três principais

grandes grupos que são distintos quimicamente entre si: compostos fenólicos, alcaloides e terpenos (Guauque et al., 2010).

3.3.1 Compostos fenólicos

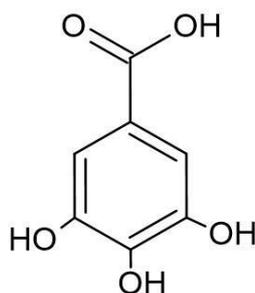
Os compostos fenólicos são uma das maiores classe de metabólitos especializados presente nas plantas, todos com estrutura química e atividade biológica variada (Dai; Mumper., 2010).

Em comum, essa classe de compostos possuem ao menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas ligados a ele, podendo serem classificados como fenóis simples (quando possuem apenas um anel aromático) (a exemplo, o ácido gálico na figura 2) e polifenóis quando possuem dois ou mais (a exemplo a quercetina na figura 3) (Telles et al., 2017).

O grupo dos compostos fenólicos é constituído de moléculas simples (ácidos fenólicos) e moléculas com alto grau de polimerização (taninos com elevado peso molecular), além disso eles podem estar na forma livre ou também ligados a açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos) e proteínas (Alves et al., 2020).

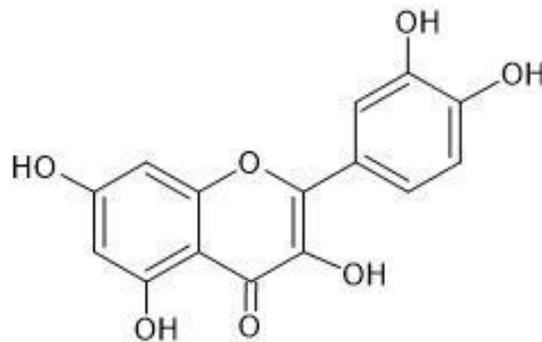
Estes compostos podem ser sintetizados a partir de duas vias metabólicas via do ácido chiquímico e via do ácido malônico, dependendo da espécie envolvida (Teramoto et al., 2011).

Figura 2 – Estrutura química do ácido gálico, classificado como um composto fenólico simples.



Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 3 – Estrutura química da quercetina, classificada como um polifenol.



Fonte: Autoria própria, 2021.

Os flavonoides são um dos mais importantes grupos e diversificado do reino vegetal, sendo amplamente distribuídos pelo reino vegetal (Pereira et al., 2016). Q

Quimicamente são pertencentes a macroclasse dos compostos fenólicos (Kowalski et al. 2020). Podendo ser subclassificados como flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianidinas dentre outras classes (Dos Santos; Farias Rodrigues., 2017).

Os taninos são classificados como condensados e hidrolisáveis. Os taninos são compostos de massa molecular intermediária a alta, capazes de formar complexos com proteínas e outros polímeros, sendo portanto, responsáveis pela sensação gustativa de adstringência ao paladar (Santiago et al., 2020).

Os ácidos fenólicos ou também chamados de fenóis simples podem ser classificados em dois subgrupos os ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, ácido vinílico etc.) e ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeíco, ácido ferúlico etc.) (Oliveira; Bastos., 2011).

As cumarinas são derivados do ácido chiquimico pela via do ácido cinâmico. Elas podem ocorrer livres ou combinadas com açúcares e ácidos. Atualmente as cumarinas são classificados em 4 grupos, cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas substituídas no anel de lactona (Hussain et al., 2018).

3.3.2 Alcalóides

Outra classe, de suma importância pertencente ao metabolismo especializado, são os alcaloides. São na sua maioria, compostos orgânicos aromáticos nitrogenados, que possuem pelo menos a substituição de um nitrogênio em sua estrutura (Teramoto et al., 2011).

Nas plantas, esses compostos geralmente possuem funções de defesa por conta de sua alta toxicidade e em doses mais baixas podem ser usados na farmacologia como por exemplo a morfina e a codeína (Taiz; Zeiger., 2013).

3.3.3 Terpenos

Os terpenos são outra classe dos metabolitos especializados das plantas e podem ser classificados a partir do seu número de carbonos como: monoterpenos (C10), sequiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Os terpenos são produzidos através da vias do ácido mevalônico e via do metileritritol fosfato (Rocha et al., 2020; Taiz; Zeiger., 2013; Teramoto et al., 2011).

Os monoterpenos devido ao seu baixo peso molecular podem ser chamados de óleos essenciais ou essências. De modo geral os terpenos possuem função de pigmentação e proteção nas plantas contra herbívoros e animais (Felipe; Bicas., 2017)

3.4 RADICAIS LIVRES

Um radical livre é um átomo, fragmento de um complexo ou molécula que possui elétrons desemparelhados em sua última camada, geralmente com número ímpar de elétrons (Poprac et al., 2017).

Nestas condições, o átomo ou molécula se torna altamente reativo, buscando o elétron faltante para se estabilizar. Os radicais livres, possuem tempo de meia vida curta, porém neste curto espaço de tempo podem acarretar em grandes danos celulares.

Esses radicais podem ser gerados por fontes endógenas (processos biológicos que ocorrem naturalmente no organismo) e fontes exógenas (fontes externas) (Sharma et al., 2018).

Nas fontes endógenas de radicais livres, que são aquelas em que o próprio organismo produz, são gerados principalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citosol (Ježek et al., 2018,).

Os processos respiratórios e diversas outras reações biológicas necessárias para a manutenção da vida são também responsáveis pela geração de radicais livres (Sikora et al., 2008).

Os quais estão envolvidos com reações de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Barreiros et al., 2006).

Na forma exógena, situações essas relacionadas a invasores bióticos e/ou condições adversas relacionadas ao consumo excessivo de álcool, tabaco, radiação ultravioleta e gama, medicamentos ou dieta inadequada, ocasionando diversos danos ao organismo quando sintetizados de forma excessiva. Por outro lado, os radicais livres também apresentam funções benéficas ao organismo, atuando principalmente como sistema de defesa (Fitria., 2013).

No entanto, o corpo humano possui mecanismo próprio de defesa frente a produção de radicais livres, quando demasiado, composto principalmente por sistemas enzimáticos (Barreiro; Díaz., 2017). Porém, quando há um desequilíbrio entre a relação de quantidade produzida de radicais livres e antioxidantes, este processo é conhecido como estresse oxidativo (Alegre et al., 2020).

O estresse oxidativo é o responsável por algumas doenças degenerativas e doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imunológico e diabetes (Agassiz et al., 2018; Vasconcelos et al., 2019).

As principais espécies de radicais livres conhecidas como espécies reativas do oxigênio (ERO) e espécie reativas do nitrogênio (ERN) são: hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), alcoxila (RO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitros (ONOO^-). Estas espécies podem ser altamente reativas provocando graves danos aos lipídeos, proteínas e ao DNA (Losada-Barreiro; Bravo-Díaz., 2017).

3.5 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos que agem na defesa das células, capazes de inibir e/ou reduzir a ação dos radicais livres e em suas reações associadas, a figura 4 representa uma reação genérica do mecanismo de ação de um antioxidante (Cakmakci et al., 2015).

A ação dos antioxidantes pode reduzir o estresse oxidativo e mutações no DNA e demais danos das células ocasionados por tais substâncias. Estudos

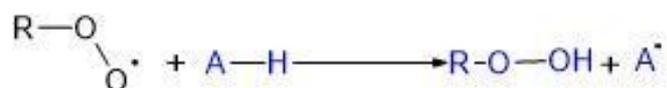
epidemiológicos relacionam a prevenção de doenças degenerativas e do câncer através da ação de compostos antioxidantes (Godic et al., 2014).

Os antioxidantes podem ser classificados como endógenos e exógenos, os endógenos são aqueles produzidos pelo próprio organismo principalmente por os sistemas enzimáticos (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

Estes sistemas são compostos principalmente pelas seguintes enzimas: glutationa-peroxidase, catalase, metionina-redutase e superóxido-dismutase, é variado conforme o organismo envolvido (Barbosa et al., 2014).

Os antioxidantes classificados como exógenos ou dietéticos são aqueles obtidos através da alimentação (Guerra-Araiza et al. 2013). O consumo de frutas, grãos, combinações de vitaminas e minerais, fibras e alguns compostos fenólicos como antioxidantes tem mostrado bons resultados no combate a doenças crônicas degenerativas causadas por radicais livres (Guerra-Araiza et al., 2013).

Figura 4 - Exemplo genérico do mecanismo de ação dos antioxidantes.



Fonte: Autoria própria, 2021.

Existem alguns métodos para avaliação e quantificação da atividade antioxidante em extratos de plantas. Entre os métodos mais usais pode-se destacar o método do sequestro do radical ABTS, sequestro do radical DPPH e o método de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} (FRAP).

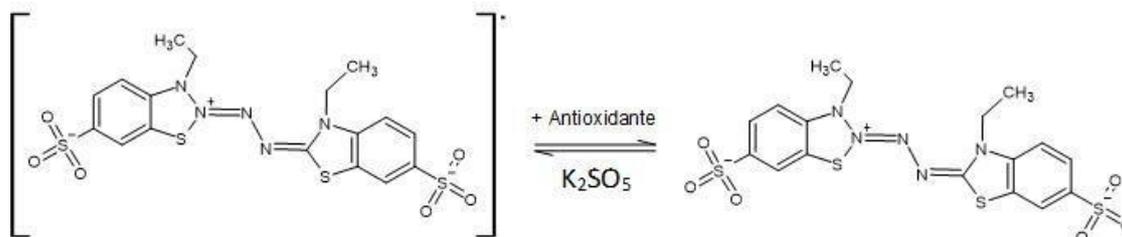
Geralmente são métodos colorimétricos onde uma amostra biológica age capturando um radical sintético ou reduzindo um composto redox, seu resultado é expresso em relação a um padrão predeterminado (Floegel et al., 2011).

O método ABTS mede a capacidade relativa de um antioxidante de capturar o radical ABTS. É um método de maior amplitude sendo capaz de estimar a atividade antioxidante de com compostos de maior gama de polaridade (compostos polares e apolares).

O ABTS é gerado pela reação de um agente oxidante forte (persulfato de potássio) com o sal ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico))

sendo seu mecanismo de reação a doação de uma molécula de hidrogênio pelo antioxidante, neutralizando o radical, conforme figura 5 (Shalaby; Shanab., 2013).

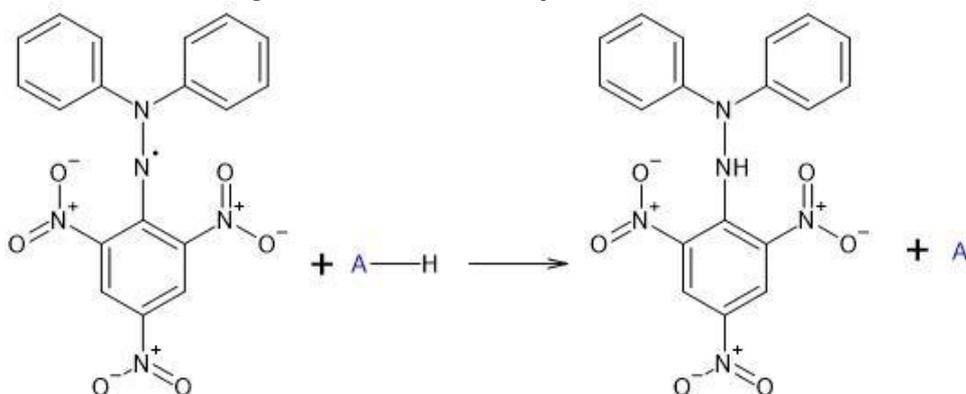
Figura 5 - Mecanismo de reação ABTS



Fonte: Autoria própria, 2021.

O método DPPH consiste na capacidade do antioxidante doar uma molécula de hidrogênio para o radical sintético DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) de cor violeta e neutralizando-o formando um composto de coloração amarela, conforme mecanismo descrito na figura 6, diferente do ABTS que engloba uma maior gama de compostos o DPPH possui afinidade maior com compostos polares (Floegel et al., 2011).

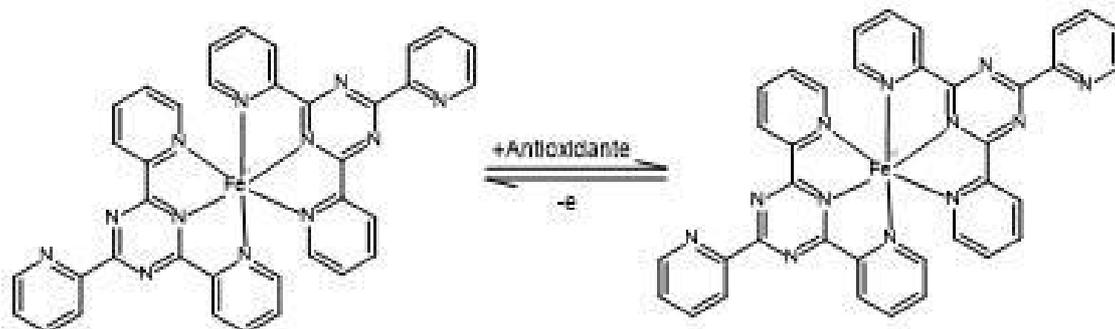
Figura 6 - Mecanismo de reação do método DPPH



Fonte: Autoria própria, 2021.

Por fim, o método FRAP (poder de redução do ferro) é um método que avalia o poder de redução dos extratos antioxidantes, sendo que o mecanismo de reação dos antioxidantes de oxido-redução é avaliado pela redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , conforme mecanismo apresentado na figura 7: assim como ABTS e o DPPH o FRAP é um método colorimétrico (Dudonne et al., 2009).

Figura 7 - Mecanismo de reação do método FRAP



Fonte: Autoria própria, 2021.

No entanto, de maneira geral, para uma extração e estimativa mais eficiente dos compostos com potencial antioxidante é importante a elaboração de um planejamento experimental, onde são analisadas a relação das variáveis independentes com as variáveis dependentes, permitindo assim a otimização das condições e resultados.

3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Planejamento experimental é uma técnica em que processos experimentais podem ser otimizados utilizando variadas ferramentas estatísticas para determinar as interações das variáveis independentes (a exemplo: tempo, temperatura, pH, concentração de solventes entre outros) nas dependentes (variáveis resposta) (Andrade et al., 2015; Waszkowiak.,2016).

Dentre os planejamentos experimentais, os completos investigam a influência de todas as variáveis experimentais envolvidas no processo e suas interações sobre as variáveis dependentes (Gunst; Mason, 2009). Esses planejamentos geram grandes quantidades de ensaios experimentais, bem como elevação de custo e tempo dependendo do número de variáveis e níveis envolvidos.

Quanto maior o número de variáveis investigadas maior será o número de experimentos em um planejamento fatorial completo, no entanto, uma alternativa para redução do número de experimento é a aplicação de planejamentos como o fatorial fracionado e composto central rotacional, onde somente uma fração do total de experimentos é realizado (Castro, 2015).

A escolha de um planejamento experimental depende dos objetivos do trabalho, se o objetivo for identificar poucos fatores que podem influenciar o processo pode ser utilizado planejamentos fatoriais completos ou fracionados, porém se o objetivo for otimizar o processo podem também ser utilizados planejamentos como Box-Behnken e composto central (CCD) (Dorta et al., 2013).

3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

O planejamento experimental composto central rotacional (CCR) é um delineamento experimental com um fatorial 2^k (k fatores) com repetição no ponto central para que possa estimar o erro puro e pontos axiais que determinam os termos quadráticos (Xiong et al., 2014).

O CCR é um planejamento experimental útil na metodologia de superfície de resposta para construir um modelo de segunda ordem (quadrático) sem a utilização de um planejamento fatorial completo de 3 níveis (Xynos et al., 2014).

Consiste em um planejamento fatorial estudado em dois estágios: um conjunto de pontos centrais que geralmente são replicados para melhorar a precisão do experimento e um planejamento rotacional com conjunto de postos axiais realizadas nos valores de alfa (Xynos et al., 2014).

Ao comparar o CCR com planejamentos completos, o mesmo apresenta vantagens por possuir menor número de combinações entre os níveis dos fatores, trazendo menores custo e maior qualidade no ajuste da superfície de resposta (Andrade et al., 2015).

Com a evolução das tecnologias computacionais tem sido possível obter uma vasta quantidade de informações, muitas vezes complexas e multivariadas de análises químicas, esses instrumentos analíticos tem a capacidade de produzir respostas multivariadas para cada amostra extraindo o máximo de informações relevantes (Souza et al., 2017).

3.8 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área da química em que métodos matemáticos, estatísticos e computacionais são empregados para interpretar, investigar e classificar dados químicos (Souza; Poppi., 2012).

Nos modelos quimiométricos, nos casos em que são utilizadas as imagens digitais, os canais de cores RGB são extraídos. Através dos canais de cores o software estatístico prediz resultados, os quais são comparados com os resultados obtidos através das variáveis de respostas experimentais, tendo como resultado o quão próximo o modelo predito ficou do experimental (Araújo et al., 2018).

Há na literatura uma vasta quantidade de trabalhos utilizando a quimiometria como alternativa de uma metodologia barata e simples. Araújo et al. (2018) desenvolveram um modelo quimiométrico capaz de identificar com facilidade a estabilidade em leite cru através de alterações no pH, obtendo um resultado com erro de predição em torno de 0,3, tornando assim a metodologia precisa e eficaz.

Outro exemplo de estudo quimiométrico foi realizado por De Camargo et al. (2018), onde foi desenvolvido um modelo quimiométrico através de imagens digitais para determinar massa, volume aparente e densidade aparente de grãos de milho, obtendo um bom resultado entre os valores medidos e os valores preditos pelo modelo PLS.

Podemos destacar como subáreas da quimiometria o planejamento de experimentos onde busca-se encontrar quais são as variáveis que afetam um processo e suas possíveis interações entre as variáveis em estudo (Houghton; Kalivas., 2000).

No reconhecimento de padrões, partindo de informações como medidas químicas ou dados espectrais é possível encontrar similaridade e detectar tendências entre os dados (Rusak et al., 2003).

Por fim a calibração multivariada procura estabelecer um modelo que relacione resultados químicos ou espectrais com propriedade como por exemplo concentração (Pereira et al., 2014).

A calibração multivariada busca obter uma função matemática que relacione propriedades de interesse com resultados analíticos e instrumentais, dentro os diversos métodos o mais utilizado é o de regressão dos quadrados mínimos parciais (PLS) (Damasceno et al., 2015).

Na calibração univariada é utilizada apenas uma medida instrumental para cada amostra de calibração, na calibração multivariada duas ou mais respostas instrumentais são relacionadas com a propriedade de interesse (Sen et al., 2016).

Diversos modelos de calibração multivariada são utilizadas, como por exemplo: Regressão linear Multipla (MLR), Regressão por componentes principais (PCR) e regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) (Morellos et al., 2016).

No método PLSR as variáveis latentes (aquelas que não são observáveis) são estimadas como agregados lineares ou componentes, podendo correlacionar as variáveis latentes com o valor predito em termos de coeficiente de correlação (R) e o

erro médio de predição (RMSEP) que deve ser minimizado para que os resultados sejam satisfatórios.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de castanheira foram colhidas na zona rural do município de Alto Paraíso – RO no mês de julho de 2019 e cedidas gentilmente pela empresa Fonte Clara Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda. com sede no município de Bom Sucesso do Sul - PR.

4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Tabela 1 - Planejamento experimental

Ensaio	Solvente (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	20 (-1)	50 (-1)	50 (-1)
2	20 (-1)	50 (-1)	100 (1)
3	20 (-1)	70 (1)	50 (-1)
4	20 (-1)	70 (1)	100 (1)
5	80 (1)	50 (-1)	50 (-1)
6	80 (1)	50 (-1)	100 (1)
7	80 (1)	70 (1)	50 (-1)
8	80 (1)	70 (1)	100 (1)
9	0 (-1,68)	60 (0)	75 (0)
10	100 (1,68)	60 (0)	75 (0)
11	50 (0)	40 (-1,68)	75 (0)
12	50 (0)	80 (1,68)	75 (0)
13	50 (0)	60 (0)	30 (-1,68)
14	50 (0)	60 (0)	120 (1,68)
15 (C)	50 (0)	60 (0)	75 (0)

Fonte: Autoria própria, 2021

As cascas do tronco da castanheira foram secas em estufa a 37°C por 24 horas, moídas em moinho de facas (Tecnal R-TE-650/1) (malha 30). As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas em freezer com temperatura de -12 °C até a realização das análises.

Os extratos e análises realizadas nesse estudo ocorreram nos laboratórios de química da UTFPR – Campus Pato Branco e na Central de análises vinculada ao campus.

Para desenvolvimento do estudo, foi utilizado um planejamento composto central rotacional (DCCR) com eixo de quatro pontos e triplicata no composto central. As corridas foram realizadas em triplicata e a determinação dos efeitos foram obtidas

por três variáveis independentes (concentração de etanol, temperatura e tempo de extração) e em cinco níveis cada (-1,68179, -1, 0, 1 e 1,68179). Cada nível respectivamente é equivalente a cada condição: concentração de etanol (0, 20, 50, 80 e 100% v/v), temperatura (40, 50, 60, 70 e 80 °C) e tempo de extração (30, 50, 75, 100 e 120 min) (Tabela 1). Cada variável independente foi avaliada e o delineamento foi conduzido com 15 corridas em triplicata, totalizando 45 ensaios.

4.2 PREPARO DO EXTRATO

Os extratos foram obtidos a partir de 0,5 gramas de casca de castanheira e 30 mL de solvente em banho-maria por determinado tempo nas condições estabelecidas pelo delineamento supracitado. Os extratos foram homogeneizados em vórtex em intervalos de 15 min e posteriormente centrifugados a 12000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -12 °C até a realização das análises.

4.3 VARIÁVEIS DEPENDENTES

4.3.1 Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos foi realizada através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau, utilizando ácido gálico como padrão de referência, descrito por Singleton et al. (1999). Alíquota de 0,5 mL de extrato e 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocateau (1:10) foram colocados em tubos de ensaio. Após 5 minutos de repouso da mistura, foram adicionados 2,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ 4% e mantidos ao abrigo da luz por 2 horas à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (UV-Vis Bel Photonics, 2000 Piracicaba, Brasil) e os resultados foram expressos em g. 100 g⁻¹ EAG (Equivalente em ácido gálico).

4.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} (Rufino et al., 2007) (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi realizada de acordo com método descrito por Re et al. (1999). Uma solução de ABTS 7mM com persulfato de potássio 140 mM foi mantida por 12-16 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para

produzir o radical ABTS^{•+}. Passado o tempo de incubação o radical foi diluído em etanol absoluto em quantidade suficiente para obter um valor de absorvância de 0,7 em espectrofotômetro a 734 nm. As leituras posteriores também foram realizadas na mesma faixa espectral. O Trolox, um antioxidante sintético análogo a vitamina E foi utilizado como padrão. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mM TEAC g⁻¹ (TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

4.3.3 Atividade antioxidante pelo método DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Saral et al. (2016). Para avaliação da atividade antioxidante os extratos foram reagidos com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (Stankevičius et al., 2010). A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL de extrato, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,3 mM em etanol. O antioxidante sintético Trolox foi utilizado para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em mM TEAC g⁻¹.

4.3.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP

O ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) ocorreu de acordo com metodologia descrita por Singleton et al. (1999) e baseia-se na capacidade do antioxidante reduzir o Fe⁺³ em Fe⁺², na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, formando-se um complexo de coloração azul intensa com o Fe⁺². A análise foi realizada em ambiente escuro, transferindo-se uma alíquota de 90 µL de extrato diluído e 2,7 mL de reagente FRAP. Após homogeneização, manteve-se as amostras em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em 595 nm. Uma curva padrão de sulfato ferroso foi preparada e os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mM Fe⁺² g⁻¹.

4.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO PLSR

Os extratos obtidos através do planejamento experimental descritos anteriormente (Tabela 1) tiveram suas imagens registradas. Além disso, foram obtidas também as imagens dos ensaios de cada variável resposta (compostos fenólicos totais, atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP). As imagens foram obtidas em um mini estúdio fotográfico (56 leds Evobox 60 cm plus – EVOBOX PLUS), utilizando uma câmera de celular Apple Iphone, modelo XR em condições padronizadas.

As imagens digitais (8 bits) foram então recortadas com dimensões de 400 x 400 pixels utilizando o programa GIMP versão 2.10.18. Foram extraídos os tons de cinzas das imagens nos três canais de cores (vermelho, verde e azul) (RGB – red, green and blue) para compor a matriz de dados. Nesse estudo, foram extraídos 256 tons de cinzas para cada canal de cor (três canais), totalizando 768 variáveis resposta.

O método da regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR) requer duas matrizes: uma matriz X composta pelos tons de cinza, a qual é extraída das imagens digitais e uma matriz Y com os valores obtidos através dos ensaios espectrofotométricos, sendo este o método escolhido para o estudo.

A partir das imagens digitais obtidas foram realizados dois métodos de modelagem: o primeiro método foi obtido utilizando as imagens dos extratos de cada experimento do delineamento e denominado de imagens dos extratos (IE). Neste caso, na matriz X as imagens foram obtidas do extrato puro e na matriz Y os seus valores de referência foram obtidos por espectroscopia de UV/VIS no comprimento de onda específico para cada variável dependente. No segundo método, foram utilizadas como matriz X as imagens correspondentes das variáveis de resposta (compostos fenólicos totais, atividade antioxidantes pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP) e correlacionado com os valores obtidos com as análises espectrofotométricas de UV/VIS, denominadas imagens dos ensaios (IE).

Para a realização do registro da extração dos tons de cinzas dos canais RGB e a modelagem PLSR foi utilizado o programa Chemostat® V. Os gráficos preditos x observados foram desenvolvidos utilizando o programa OriginPro 8.5.

A avaliação da precisão e desempenho dos modelos gerados foram obtidos pelo número de variáveis latentes (NLV), proporção dependente (DP), erro quadrático médio de calibração (RMSEC), coeficiente de determinação (R^2) e valor preditivo residual (RPD).

4.5 ANÁLISE ESTÁTICA

O programa STATISTICA 8.0 foi utilizado para analisar os resultados obtidos na execução do planejamento experimental. Os dados foram analisados por análise variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$), estimativa dos efeitos, teste de Tukey ($p \leq 0,05$), coeficiente de determinação, qui-quadrado e falta de ajuste. Os gráficos de superfície de resposta e de contorno também foram gerados. Os valores obtidos nas execuções de planejamento foram apresentados como valor médio com seu respectivo desvio padrão. Foi utilizado também o cálculo da resposta global (RG) conforme descrito na equação 1 visando a otimização geral das variáveis de resposta em uma única condição.

$$\text{Equação 1 - Equação da resposta global (RG)} \\ RG = [R(x_1)/MR(x_1) + R(x_2)/MR(x_2) + \dots + R(x_n)/MR(x_n)]$$

Onde $R(x_n)$ é a resposta para um elemento em um experimento particular e $MR(x_n)$ é a maior resposta no conjunto para aquele elemento n .

As estruturas químicas apresentadas neste trabalho foram desenhadas através do software livre ACD/ChemSketch.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DOS FATORES: CONCENTRAÇÃO DE ETANOL, TEMPERATURA E TEMPO DE EXTRAÇÃO NAS ANÁLISES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ABTS, DPPH E FRAP).

De acordo com estudos conduzidos por Chew et al. (2011) os principais fatores que podem influenciar na extração de compostos com potencial antioxidante são: concentração de solvente, tempo de extração e temperatura de extração.

Cada um dos fatores citados acima foi avaliado em 5 níveis, os níveis máximos e mínimos foram determinados a partir do estudo citado acima enquanto a proporção amostra solvente foi determinado por estudos dirigidos por (Casagrande et al., 2019; Da Silva et al., 2018) e também por estudos prévios realizados pelo próprio grupo de pesquisa (Perin et al., 2020).

A proporção solvente-amostra selecionada para o presente experimento foi 0,5 g de *Betholletia excelsa* e 30 mL⁻¹ de etanol. A escolha do solvente se deu em função do custo, polaridade e pela baixa toxicidade comparada a outros solventes como metanol, acetona, hexano, dentre outros, visando possíveis aplicações futuras. As variáveis dependentes analisadas foram compostos fenólicos totais (TPC), atividade antioxidante (AA) pelo método do sequestro do radical ABTS e DPPH e poder de oxidação do ferro (FRAP).

Três distintos métodos de atividade antioxidante foram utilizados visando ampliar as respostas obtidas através de diferentes mecanismos de ação, havendo uma complementação nas respostas obtidas.

os resultados para a análise de CFT variaram de 10,86±0,007 a 20,44±0,121 g 100 g⁻¹. Para as análises de AA, ABTS e DPPH os resultados variaram entre 57,40±2,48 a 423,14±1,72 e 327,22±0,48 mM TE g⁻¹ a 2010,83±7,94 respectivamente, e por fim para FRAP houve variação de 1623,61±15,92 a 2783,03±4,12 mM Fe²⁺ g⁻¹ de casca de castanheira, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 1 - Planejamento experimental e resultados.

Ensaio	Solvente (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	CFT (g 100 g ⁻¹)	ABTS (mM TEAC g ⁻¹)	DPPH (mM TEAC g ⁻¹)	FRAP (mM Fe ²⁺ g ⁻¹)
1	-1 (20)	-1 (50)	-1 (50)	14,83±0,18* h	57,50±2,48 k	665,14±3,28 h	1623,61±15,92 k
2	-1 (20)	-1 (50)	1 (100)	15,87±0,03 g**	146,53±2,23 i	622,00±15,89 hi	2099,05±7,98 h
3	-1 (20)	1 (70)	-1 (50)	16,41±0,13 f	146,43±5,32 h	569,45±10,56 i	2130,21±16,63 g
4	-1 (20)	1 (70)	1 (100)	14,54±0,14 h	234,00±7,33 e	957,66±2,40 g	1996,99±13,95 i
5	1 (80)	-1 (50)	-1 (50)	17,38±0,21 e	227,09±0,36 e	1477,41±10,61 d	2481,18±13,14 f
6	1 (80)	-1 (50)	1 (100)	19,27±0,14 b	193,84±4,26 g	1456,96±39,44 d	2647,28±6,79 c
7	1 (80)	1 (70)	-1 (50)	18,00±0,08 cd	211,51±5,07 f	1459,01±13,88 d	2583,14±2,46 d
8	1 (80)	1 (70)	1 (100)	15,81±0,04 g	194,16±5,74 g	1173,42±15,80 f	2501,28±1,98 f
9	-1,68 (0)	0 (60)	0 (75)	10,86±0,07 i	149,62±5,40 hi	327,22±0,48 j	1635,70±2,44 k
10	1,68 (100)	0 (60)	0 (75)	16,07±0,22 fg	121,33±4,52 j	1200,98±10,10 f	1819,50±7,48 j
11	0 (50)	-1,68 (40)	0 (75)	17,83±0,02 d	312,12±6,62 c	1370,70±30,51 e	2546,73±12,03 e
12	0 (50)	1,68 (80)	0 (75)	20,38±0,08 a	325,80±2,33 c	1661,67±51,54 c	2783,03±4,12 a
13	0 (50)	0 (60)	-1,68 (30)	20,44±0,12 a	423,14±1,72 a	1317,30±34,57 e	2727,94±13,41 b
14	0 (50)	0 (60)	1,68 (120)	19,27±0,15 b	353,31±9,48 b	2010,83±7,94 a	2765,78±4,29 a
15 (C)	0 (50)	0 (60)	0 (75)	18,34±0,07 c	283,35±1,23 d	1843,25±2,69 b	2624,23±12,71 c

*Média das triplicatas com seus respectivos desvios padrão;

** Teste de Tukey, valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as corridas ($\leq P \leq 0,05$) e letras iguais representam que não houve diferença significativa entre os ensaios ($p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos para CFT tiveram uma maior extração no ensaio 13, condições de 50% de etanol, 60 °C e 30 min. A partir do teste de médias, podemos observar que não houve diferença entre as corridas 12 e 13 ($p \leq 0,05$) representando que possivelmente a concentração de 50% de etanol obteve uma extração mais eficiente desses compostos. A corrida 9 obteve o menor valor para CFT, sendo as condições da mesma de 0% de etanol (água destilada), temperatura de 60°C e tempo de extração de 75 min, evidenciando que em concentrações menores de solvente ocorre uma extração menos eficiente dos compostos fenólicos.

Os resultados para AA mostram que para o método ABTS a melhor condição se deu na corrida 13 nas condições 50% de etanol, 60 °C e 30 min, a corrida 1 teve a menor extração dos compostos com as condições de 20% de etanol, 50 °C e 50 min, com diferença significativa entre as demais corridas ($P \leq 0,05$).

Para o método DPPH o melhor resultado se deu na corrida 14 com as condições de 50% de etanol, 60 °C e 120 min com diferença significativa entre as demais corridas ($P \leq 0,05$).

A corrida 9 foi onde ocorreu a menor extração dos compostos nas condições de 0% de etanol, 60 °C e 75 min, com diferença significativa ($\leq P \leq 0,05$).

Entre os demais valores da coluna, porém pode-se observar que as corridas 1, 2 e 3 apresentaram menor extração dos compostos, ambas com concentração de etanol de 20% o que pode evidenciar também que uma concentração menor de solvente é uma condição em que não ocorre uma maximização na extração dos compostos com atividade antioxidante,

O método FRAP assim como o DPPH apresentou melhor resultado na corrida 14, nas condições 50% de etanol, 60 °C e 120 min, com diferença significativa entre as demais corridas ($\leq P \leq 0,05$).

Já as corridas 1 e 9 tiveram o pior resultado, ambas não apresentaram diferença significativa entre si $P \leq 0,05$ nas condições de 20% etanol, 50 °C, 50 min e 0% de etanol, 60 °C e 75 min respectivamente.

Até o momento de análise dos dados de CFT é possível verificar, contudo, que concentrações de etanol de 0% e 20% obtiveram resultados menos eficientes, em contrapartida melhor concentração parece estar mais próxima do ponto central, na concentração de 50% de etanol.

Em trabalho realizado por John e Shahidi (2010), foram extraídos compostos fenólicos com os solventes: 70% de acetona, 80% de etanol e 70% de metanol, onde

a extração em etanol apresentou valores semelhantes ao presente trabalho, sendo que a extração com acetona foi a mais efetiva. Também foram detectados através de HPLC a presença de compostos fenólicos livres como: ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido vanílico e ácido elágico, além de compostos mais complexos como catequinas, quercetina, galocatequina.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, foi possível avaliar a estimativa dos efeitos e demais informações conforme apresentados na tabela 3 e figura 12-A.

Tabela 2 - Efeitos lineares, quadráticos e efeitos de interação das variáveis tempo de extração, temperatura de extração e concentração de etanol (%) utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR) sobre as variáveis resposta teor de compostos fenólicos totais (CFT) em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).

CFT	SS	G.L	QM	F	p	EE	E
X ₁ L	67.891	2	67.8906	111.786	0.0000	2.574	0
X ₁ Q	104.733	2	104.7329	172.442	0.0000	-3.882	0
X ₂ L	0.6404	2	0.6404	1.054	0.3110	0.250	0
X ₂ Q	0.0778	2	0.0778	0.128	0.7223	0.106	0
X ₃ L	1.9858	2	1.9858	3.270	0.0785	-0.440	0
X ₃ Q	2.9901	2	2.9901	4.923	0.0325	0.656	0
X ₁ L por X ₂ L	3.5909	2	3.5909	5.913	0.0199	-0.774	0
X ₁ L por X ₃ L	0.1062	2	0.1062	0.175	0.6782	0.133	0
X ₂ L por X ₃ L	18.3337	2	18.3337	30.188	0.0003	-	0
Erro	22.9835	38	0.6073	-	-	-	-
SS total	275.099	47	-	-	-	-	-
Falta de ajuste	22.5652	5	4.5130	290.19	0.0000	-	-

Soma dos quadrados (SS), grau de liberdade (G.L), quadrado médio (QM), erro padrão (EP), linear e quadrático (L e Q). Etanol (X₁L e X₁Q), Temperatura (X₂L e X₂Q) e Tempo (X₃L e X₃Q)

Para os CFT (figuro 12 e tabela 3) o fator concentração de etanol (termos quadráticos) teve a maior influencia entre os fatores ($\leq p \leq 0,05$)

O fator tempo (termos quadráticos) também apresentou influencia significativa. As interações solvente x temperatura e a interação temperatura x tempo também apresentaram influencia significativa.

O fator temperatura não apresentou influência significativa ($p \leq 0,05$), assim como o fator solvente-tempo.

A avaliação dos fatores para AA pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP seguem apresentados na tabela 4 e figura 12B (ABTS), 12C (DPPH) e 12D (FRAP).

Tabela 3 -Efeitos lineares, quadráticos e efeitos de interação das variáveis tempo de extração, temperatura de extração e concentração de etanol (%) utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR) sobre as variáveis resposta atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).

ABTS	SS	G.L	QM	F	p-valor	EE	E
X ₁ L	6847.7	2	6847.7	2.0318	0.16219	25.856	18
X ₁ Q	160570.6	2	160570.6	47.644	0.00000	-152.02	22
X ₂ L	8976.2	2	8976.2	2.6634	0.11094	29.603	18
X ₂ Q	3448.0	2	3448.0	1.0231	0.31818	-22.277	22
X ₃ L	66.6	2	66.6	0.0198	0.88895	-2.550	18
X ₃ Q	4351.6	2	4351.6	1.2912	0.26294	25.026	22
X ₁ L por X ₂ L	16482.3	2	16482.3	4.8906	0.03309	-52.412	23
X ₁ L por X ₃ L	16411.2	2	16411.2	4.8695	0.03345	-52.299	23
X ₂ L por X ₃ L	4.7	2	4.7	0.0014	0.97031	-0.888	23
Erro	128067.3	38	3370.2	-	-	-	-
SS total	406536.0	47	-	-	-	-	-
Falta de ajuste	127470.6	5	25494.1	1410.04	0.00000	-	-
DPPH	SS	G.L	QM	F	p-valor	EE	E
X ₁ L	3915734	2	3915734	116.412	0.00000	618.302	57
X ₁ Q	5286580	2	5286580	157.166	0.00000	-872.28	69
X ₂ L	40124	2	40124	1.193	0.28163	62.589	57
X ₂ Q	805424	2	805424	23.945	0.00002	-340.47	69
X ₃ L	315659	2	315659	9.384	0.00401	175.551	57
X ₃ Q	391286	2	391286	11.633	0.00155	-237.31	69
X ₁ L por X ₂ L	110131	2	110131	3.274	0.07829	135.481	74
X ₁ L por X ₃ L	158973	2	158973	4.726	0.03600	-162.77	74
X ₂ L por X ₃ L	10359	2	10359	0.308	0.58218	41.551	74
Erro	1278200	38	33637	-	-	-	-
SS total	11259559	47	-	-	-	-	-
Falta de ajuste	1263382	5	252676	562.71	0.00000	-	-
FRAP	SS	G.L	QM	F	p-valor	EE	E
X ₁ L	1568510	2	1568510	78.240	0.00000	391.325	44
X ₁ Q	3249884	2	3249884	162.110	0.00000	683.913	53
X ₂ L	126184	2	126184	6.294	0.01659	110.993	44
X ₂ Q	3109	2	3109	0.155	0.69594	-21.155	53
X ₃ L	52764	2	52764	2.632	0.11302	71.773	44

X ₃ Q	9415	2	9415	0.469	0.49731	36.811	53
X ₁ L por X ₂ L	75461	2	75461	3.764	0.05981	-112.15	57
X ₁ L por X ₃ L	24958	2	24958	1.245	0.27152	-64.50	57
X ₂ L por X ₃ L	275176	2	275176	13.726	0.00067	-214.16	57
Erro	761799	38	20047	-	-	-	-
SS total	7294552	47	-	-	-	-	-
Falta de ajuste	758271	5	151654	1418.56	0.00000	-	-

Soma dos quadrados (SS), grau de liberdade (G.L), quadrado médio (QM), erro padrão (EP), linear e quadrático (L e Q). Etanol (X₁L e X₁Q), Temperatura (X₂L e X₂Q) e Tempo (X₃L e X₃Q).

A ANOVA e estimativa dos efeitos demonstram que para os ensaios de AA o fator solvente apresenta efeito significativo ($p \leq 0,05$) para todos. Para o ensaio ABTS as interações solvente e tempo e solvente temperatura também apresentaram interação significativa, enquanto os efeitos tempo, temperatura e as interações temperatura x tempo não apresentam interação.

Para o ensaio DPPH além do fator solvente conforme já citado, os fatores tempo e temperatura (termos quadráticos) também apresentaram efeito significativo, assim como a interação solvente-tempo. Já o fator temperatura (função linear) e as interações solvente x temperatura e tempo x temperatura não influenciaram significativamente.

No ensaio FRAP além do fator solvente, a temperatura (em termos lineares) também apresentou efeito significativo, bem como a interação tempo x temperatura ($p \leq 0,05$), as demais condições e interações foram não significativas.

De modo geral, é importante ressaltar que o fator solvente foi o que mais mostrou efeito significativo através das análises de cada variável independente e suas interações dos efeitos, evidenciando que concentrações menores de solvente (etanol) são mais eficazes para extração de compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante. E que concentrações baixas de etanol (0% e 20%) a extração dos compostos não foi tão efetiva, assim como temperaturas mais elevadas, evidenciando que concentração intermediária de solvente e temperaturas mais brandas levam a uma melhor otimização da extração.

5.2 SUPERFÍCIES DE RESPOSTA

As figuras de superfícies de resposta e contorno das variáveis dependentes (CFT, ABTS, DPPH e FRAP) em função dos 3 fatores de otimização (concentração de etanol, temperatura e tempo) também foram gerados para melhor entendimento dos dados. O gráfico de superfície de resposta é considerado uma boa ferramenta para estimar a interação entre os efeitos, auxiliando na otimização dos planejamentos e predição ou ainda “tendência” de qual a melhor interação pode vir a maximizar a extração (Sun et al., 2010).

Para CFT, o fator concentração de solvente (% etanol) e temperatura (figuras 8A, D, B e E respectivamente de superfície e contorno para solvente e tempo) apresentam uma resposta mais otimizada em concentrações e temperaturas mais próximas do ponto central, enquanto o tempo parece ser melhor otimizado em uma condição de maior tempo de extração e temperatura acima do ponto central (figura 8C e F).

Ao relacionar essas informações com os dados do planejamento experimental e ensaios expressos na tabela 2 observamos que a melhor condição de extração para CFT foi de 50% de etanol, 60 °C e 30 min (20,44 g GAE 100 g⁻¹). Já a melhor condição encontrada nos dados obtidos através da equação da tabela 5 é possível observar que os dados são bem similares corroborando com os gráficos da figura 9.

No ensaio ABTS, a concentração do solvente se mostrou sendo o fator de maior importância na otimização, com tendência de que concentrações intermediárias de solvente são mais eficientes na extração dos compostos fenólicos, assim como também é observado o mesmo comportamento ao fator temperatura (fig. 9A,9D).

O fator tempo representado nas figuras 9B, 19E, mostra a tendência de que em tempos maiores de extração leva a uma melhora na otimização da extração. A interação tempo x temperatura (fig. 9C,9F) não se mostrou significativa (tabela 4), apesar disso apresentando tendência de que a melhor extração pode ocorrer em maior tempo de extração e temperaturas mais elevadas.

A figura 11 representa a superfície de contorno para o ensaio DPPH, ao analisar as figuras 10A, 10C, 10D e 10F, pode-se observar a tendência que a concentração de solvente e temperatura em níveis mais próximos do ponto central

resultam na melhor extração de compostos com potencia antioxidante, indo de encontro aos dados apresentados anteriormente e para os demais ensaios.

Podemos observar ao analisar as figuras 10B e 10E que houve interação entre os fatores tempo x temperatura, indicando que em tempos maiores de extração é obtido melhor otimização.

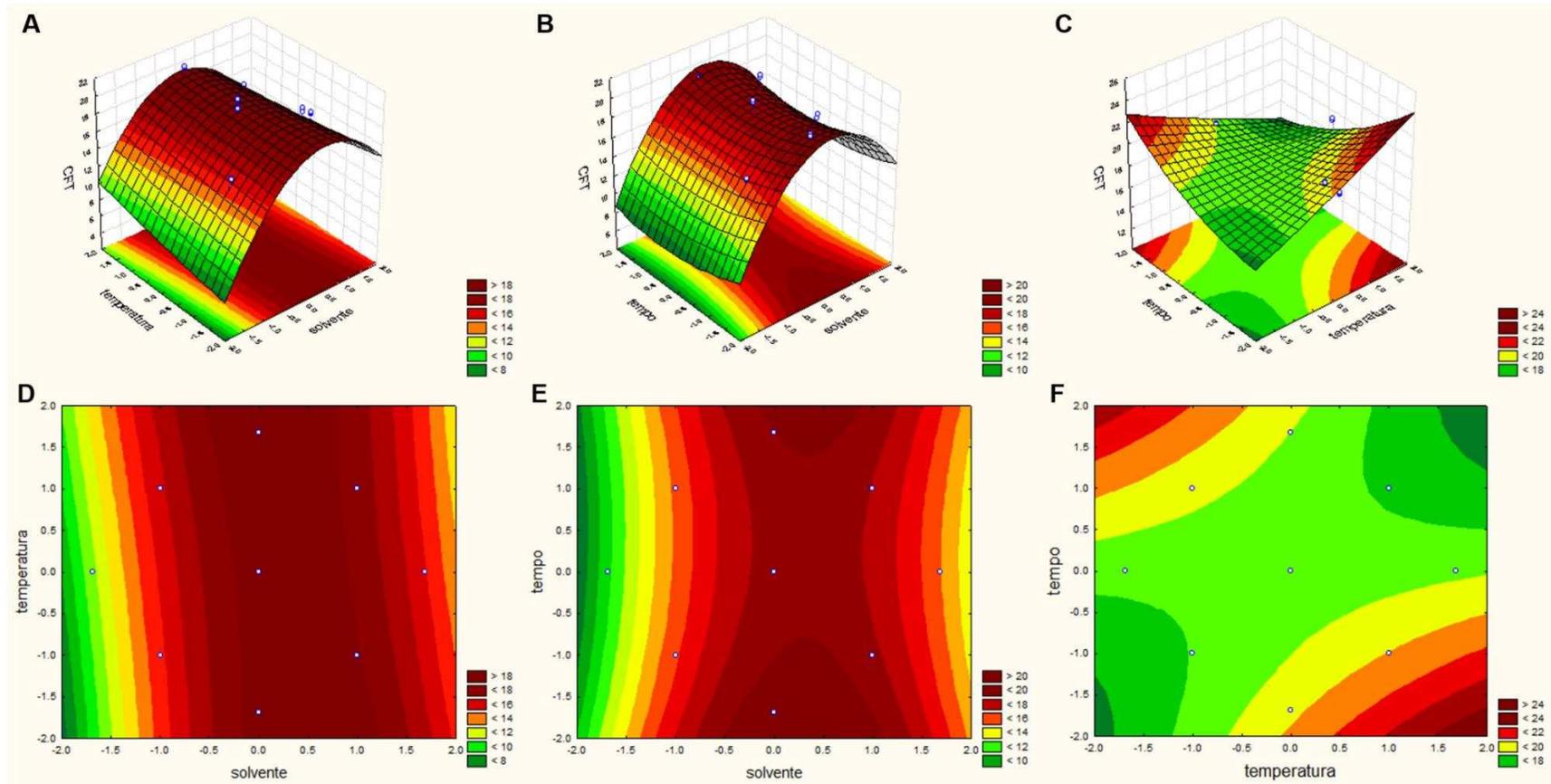
No ensaio FRAP, os índices foram similares as demais variáveis, com melhor otimização em concentração de etanol e temperatura intermediárias e maior tempo associado a maior temperatura (Figura 11).

De fato, o fator concentração de etanol foi o fator com maior influencia na extração dos CFT e atividade antioxidante, indicando que a concentração próxima ao valor intermediário (ponto central) (entre 50 e 60%) é onde a extração é eficientemente otimizada.

Também é possível observar uma tendência de que em temperaturas mais elevadas a extração pode ser mais eficiente, mas temos que levar em conta a temperatura de ebulição do etanol que é em torno de 78 °C Souza et al. (2021).

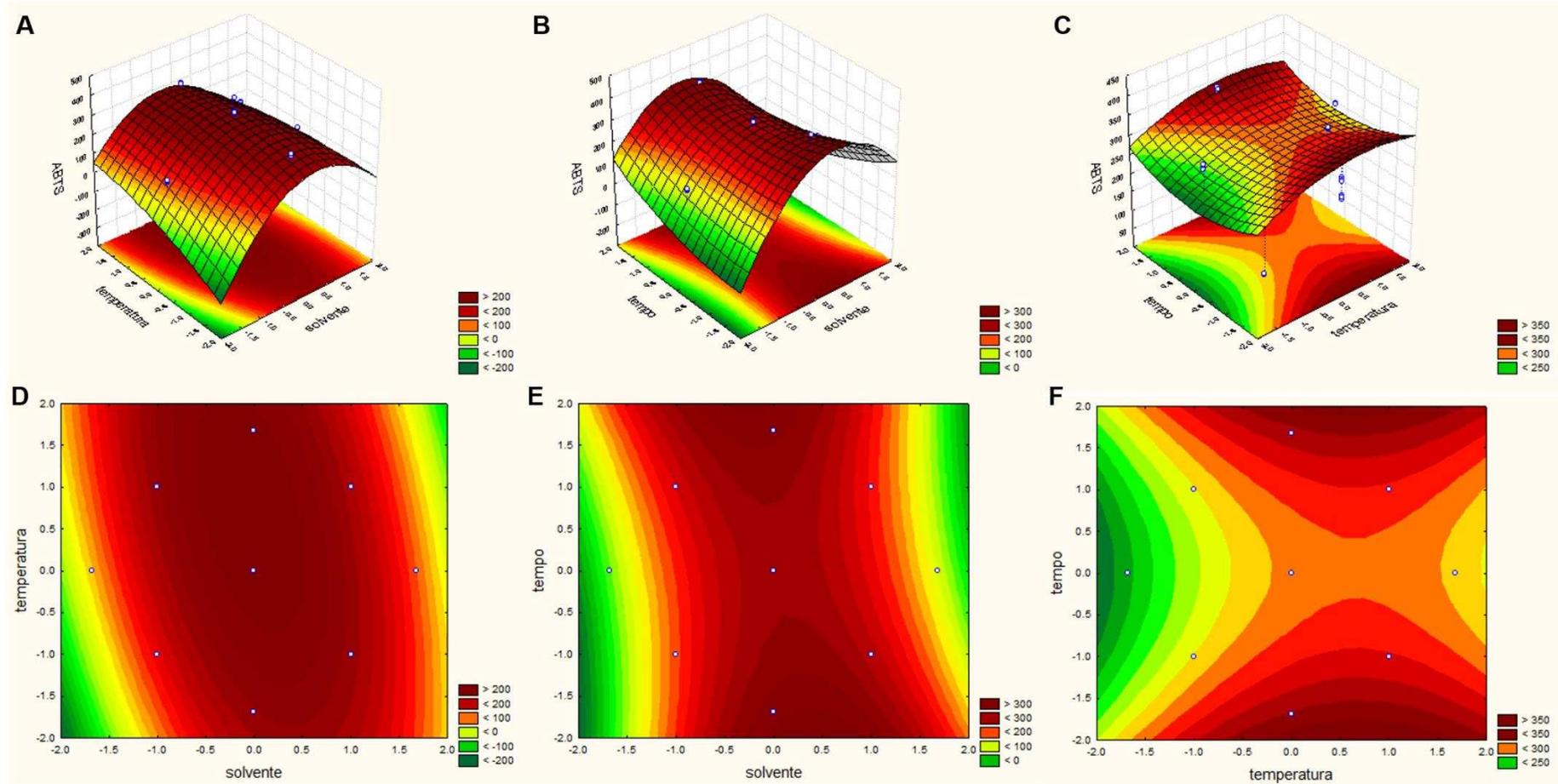
É importante observar a possível degradação dos compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante em temperaturas elevadas, uma vez que a temperatura ideal de CFT foi próxima a 60°C (Sari et al., 2020).

Figura 8 - Gráficos de superfície de resposta e contorno (A-C e D-F) respectivamente para os efeitos de solvente (concentração de etanol (%), da temperatura de extração (°C) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (PFF) no teor de compostos fenólicos totais (CFT) em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).



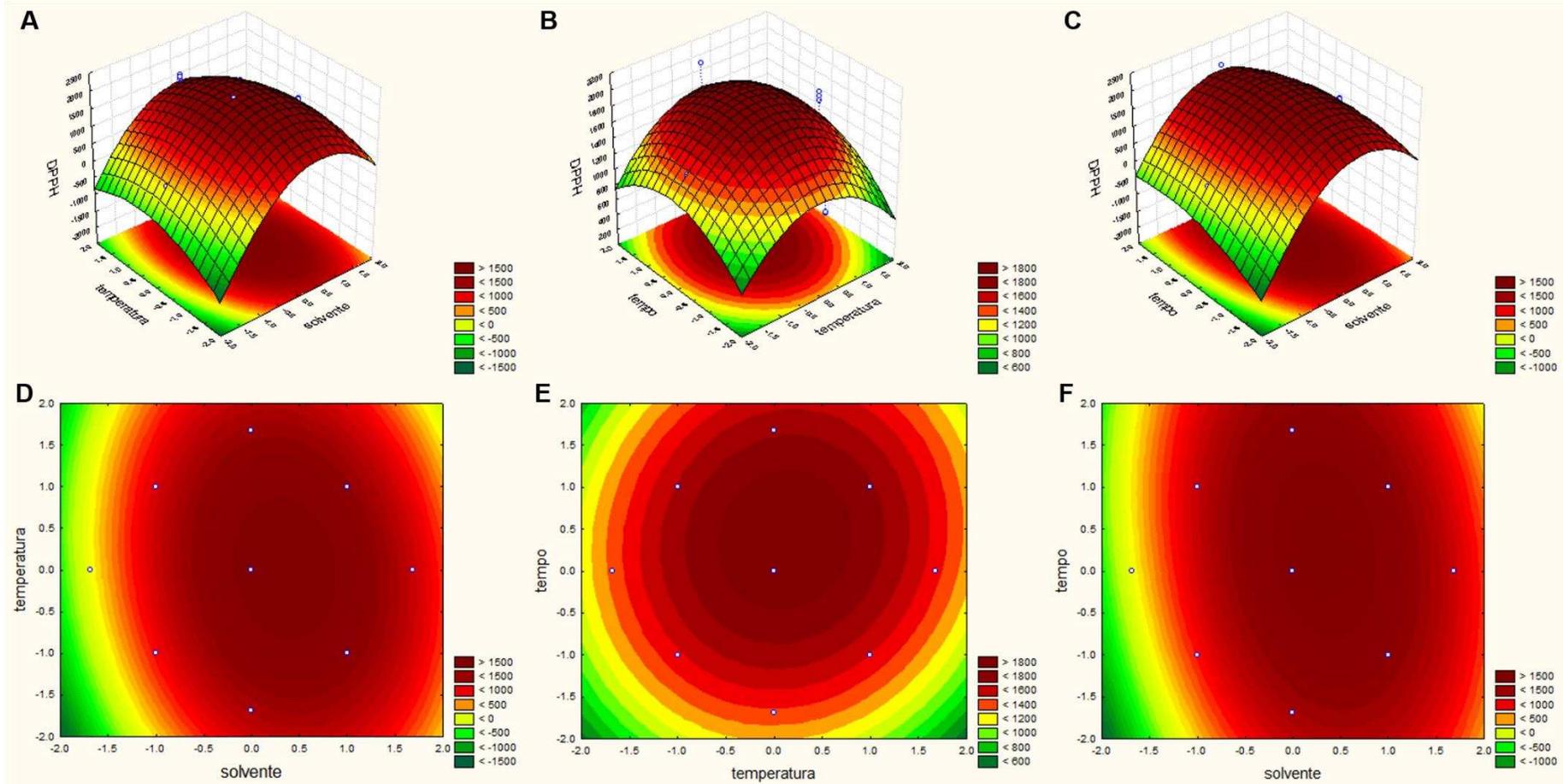
Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 9 - Gráficos de superfície de resposta e contorno (A-C e D-F) respectivamente para os efeitos de solvente (concentração de etanol (%), da temperatura de extração (°C) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (PFF) em atividade antioxidante pelo método ABTS em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).



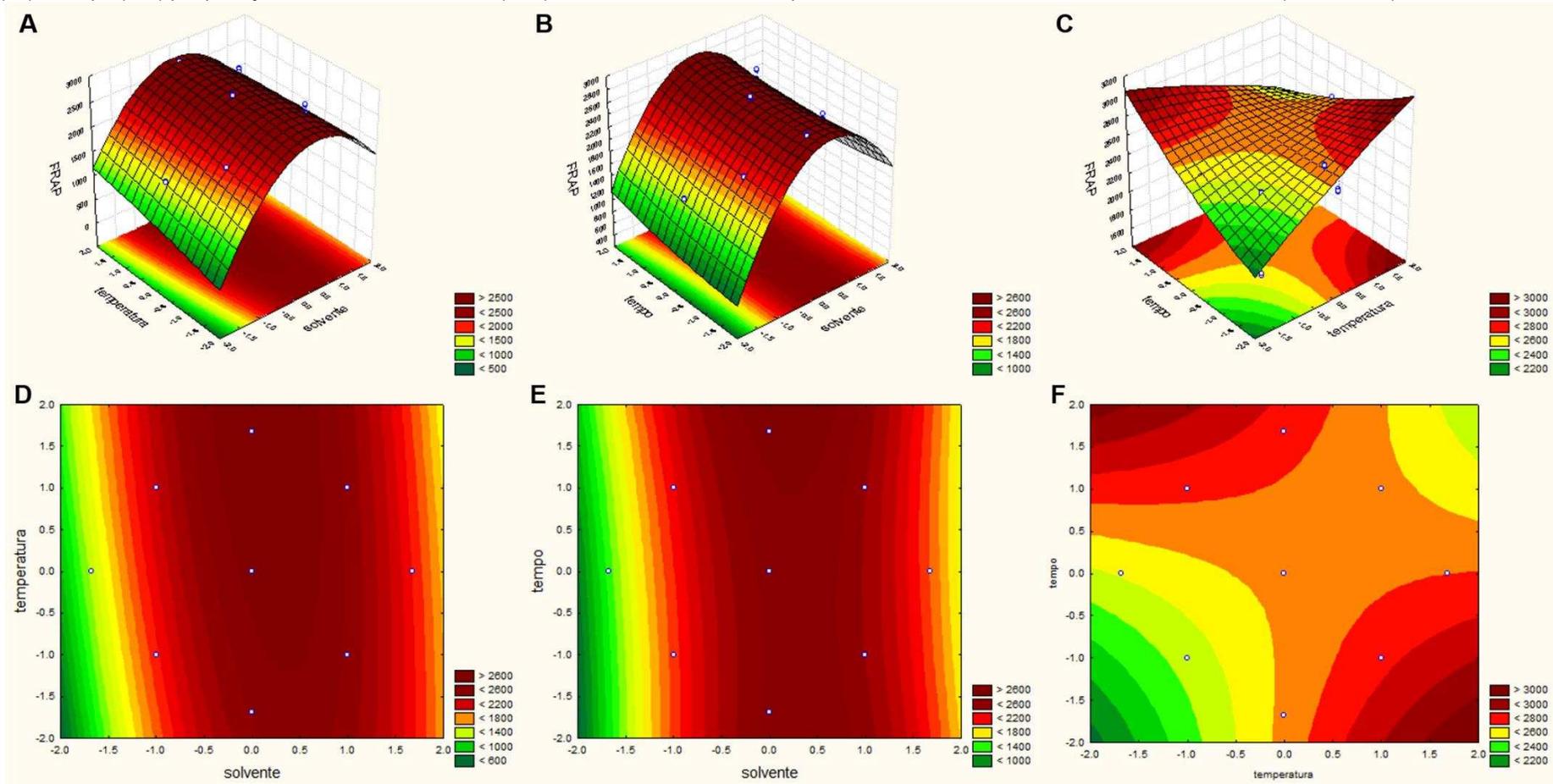
Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 10 - Gráficos de superfície de resposta e contorno (A-C e D-F) respectivamente para os efeitos de solvente (concentração de etanol (%)), da temperatura de extração (°C) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (PFF) em atividade antioxidante pelo método DPPH em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanha).



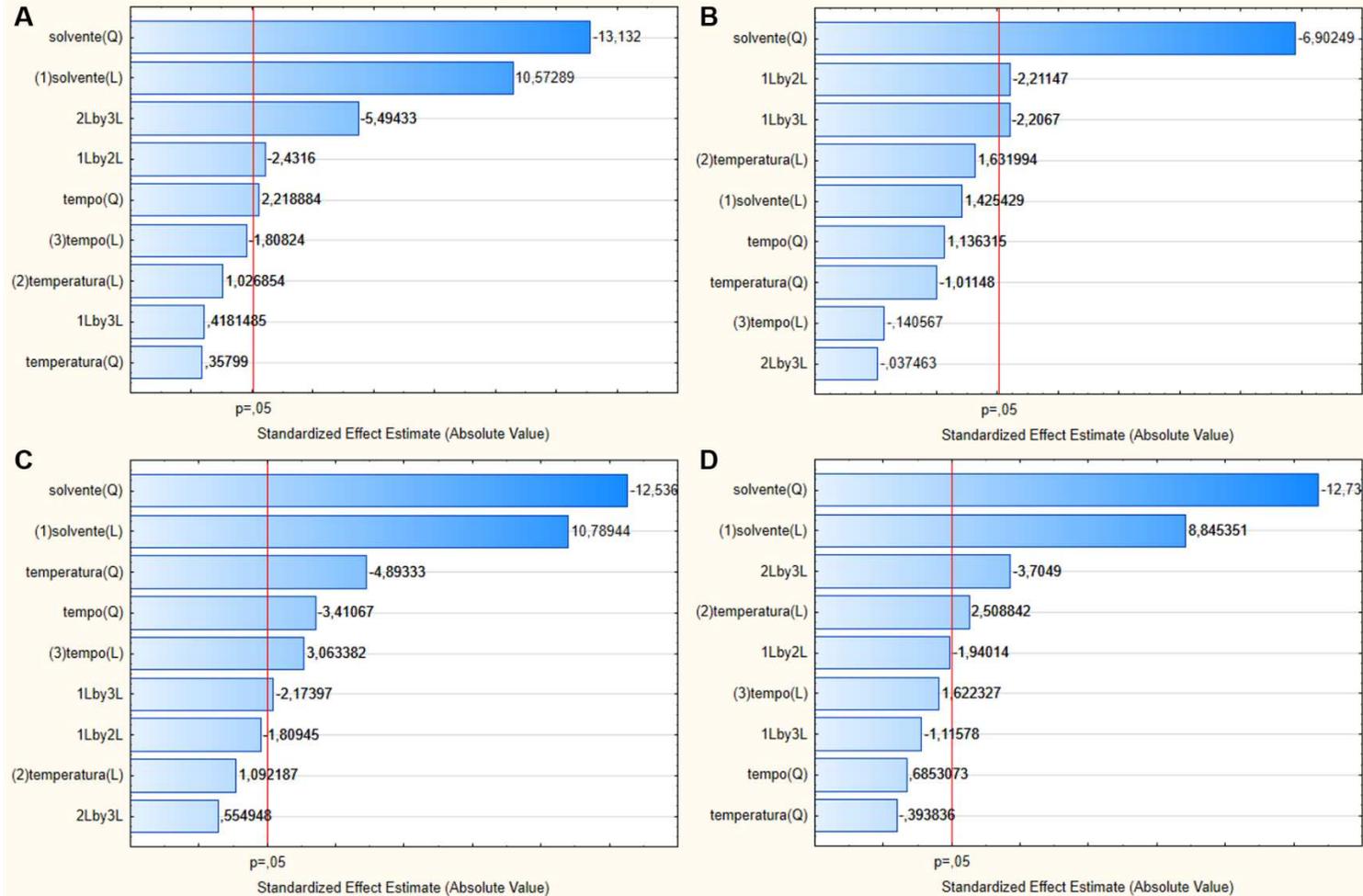
Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 11 - Gráficos de superfície de resposta e contorno (A-C e D-F) respectivamente para os efeitos de solvente (concentração de etanol (%)), da temperatura de extração (°C) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (PFF) em atividade antioxidante pelo método FRAP em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanha).



Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 12 - Gráficos de Pareto para os efeitos de solvente (concentração de etanol (%)), da temperatura de extração (°C) e tempo (min) por planejamento fatorial fracionário (PFF) no teor de compostos fenólicos totais (CFT) (A) e atividade antioxidante pelos métodos ABTS (B), DPPH (C) e FRAP (D) em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanha).



Fonte: autoria própria, 2021.

A figura 12 representa os gráficos de paretos para os ensaios de CFT e AA (ABTS, DPPH e FRAP). Os índices de CFT e AA (ABTS, DPPH e FRAP) (Figura 12A) demonstra que a concentração de solvente foi o fator que apresentou mais influencia significativa, indicando maior eficiente em níveis mais baixos.

Já o fator tempo a tendência apresentada é para que em níveis menores o fator tempo é mais eficiente na extração dos CFT.

A figura 12B representa os gráficos de paretos para o ensaio ABTS representa que o único fator com influencia significativa foi a concentração de solvente, e representa a tendência de uma melhor eficiência na extração em níveis menores de concentração de solvente.

Para o ensaio DPPH (figura 12C) os fatores concentração de solvente e temperatura apresentaram influencia significativa com tendência de em concentrações de solvente em níveis mais baixos e tempos mais próximos ao ponto central a uma melhor otimização da extração.

A análise dos gráficos de paretos do ensaio FRAP (figura 8D) representa que em níveis menores de concentração de solvente e temperaturas mais próximas do ponto central a extração pode ser mais eficiente.

5.3 RESPOSTA GLOBAL (RG)

Ao calcular a reposta global (RG) (equação 1), visando determinar uma condição “geral” para as quatro variáveis dependentes desse estudo, no delineamento experimental aqui empregado, foi obtido o valor de 6,10, correspondente a corrida 13 (50% de etanol, a 60 °C e 30 min de extração), sendo esta considerada a melhor condição global de extração.

O modelo de regressão foi obtido através dos coeficientes de regressão significativos pela análise estatística, gerando também o coeficiente determinação (R^2) que representa o próximos o modelo predito com o modelo experimental estão, mostrando também se o modelo necessita de ajustes (qui-quadrado – X^2) (Xiong et al., 2014), os resultados estão expressos na tabela 5.

Tabela 4 - Equações do modelo de regressão empregadas para determinar a melhor condição de extração, coeficientes de correlação (R^2), qui-quadrado (X^2), graus de liberdade (G.L) para cada variável (compostos fenólicos totais (TPC), métodos antioxidantes ABTS, DPPH e FRAP) em delineamento composto central rotacional (DCCR) em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).

Variáveis	Equações	R^2	X^2	G.L	p
CFT	$y=18,44+1,29X_1-1,94X_1^2+0,33X_3^2-0,39X_1X_2-0,87X_2X_3$	0,92	1,31	47	1.0000
ABTS	$y=293,53-76,01X_1^2-26,21X_1X_2-26,15X_1X_3$	0,68	922,08	47	0.0000
DPPH	$y=1865,87+309,15X_1-436,14X_1^2-170,24X_2^2+87,78X_3-118,65X_3^2-81,39X_1X_3$	0,89	2176,86	47	0.0000
FRAP	$y=2634,56+195,66X_1-341,96X_1^2+55,50X_2-107,08X_2X_3$	0,90	431,95	47	0.0000

Etanol (linear X_1 e quadrático X_1^2), Temperatura (linear X_2 e quadrático X_2^2) e Tempo (linear X_3 e quadrático X_3^2).

O coeficiente de determinação para CFT foi de 0,92, indicando que 92% da variação foi explicada pelo modelo, com $p>0,05$, mostrando que os resultados não apresentaram diferença significativa entre os dados preditos e os observados. Portanto tal resultado apresentou elevada eficiência e confiabilidade para tal variável.

Para os ensaios de AA (ABTS, DPPH e FRAP) o coeficiente de determinação foi de 0,68, 0,89 e 0,90, respectivamente mostrando que 68%, 89% e 90% da variação foi explicada pelo modelo.

Os valores de p para os ensaios ABTS, DPPH e FRAP foram menores que 0,05 indicando que foi significativa a diferença entre os dados preditos e observados, necessitando ainda de alguns ajustes no planejamento experimental, principalmente para ABTS

Estudos conduzidos por Hosu et al. (2014) avaliando AA de vinhos obteve um valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,96 pelos métodos ABTS e DPPH, valores de R^2 superiores aos encontrados no presente estudo. Por outro lado, estudo realizado por Pace et al. (2013) com cenouras obtiveram valor de R^2 em torno de 0,50 para o ensaio de compostos fenólicos totais, indicando que variação pode ser explicada 50% pelo modelo, resultados menores e menos eficientes dos encontrados no presente estudo.

A partir das equações geradas no modelo de regressão, utilizando derivada parcial foi possível calcular a melhor condição para os fatores concentração

de etanol (%), temperatura (°C) e tempo (min) para cada ensaio realizado nesse estudo (CFT, ABTS, DPPH e FRAP) e os resultados seguem apresentados na tabela 6.

Tabela 5 - Resultado obtidos através das equações com os coeficientes de regressão significativos por análise estatística obtidas pelo modelo.

	Solvente (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
CFT	58,86*	63,67	28,31
ABTS	50,00	60,00	75
DPPH	59,91	60,00	81,45
FRAP	58,58	60,00	87,96

*Cálculos realizados por meio de derivadas parciais e posterior interpolação dos dados para decodificação dos níveis.

Através dos dados obtidos na tabela 6 e em comparação com os dados apresentados na tabela 2 podemos observar que a melhor concentração de solvente foi em 50% de etanol para todos os ensaios. Valores muito próximos aos obtidos na tabela 6, o que pode explicar a concentração de solvente como sendo o fator de maior influência em todos os ensaios realizados tal como a concentração utilizada.

O fator temperatura se mostrou semelhante aos obtidos pela resolução da equação em comparação aos dados obtidos nos ensaios com exceção de uma pequena variação para a análise CFT (60 °C tabela 2 e 63,67 °C tabela 6).

O fator tempo dos ensaios foi o que apresentou maior variação entre as variáveis, demonstrando a necessidade de melhorar a otimização, corroborando portanto com os demais dados apresentados.

Também é importante observar que é possível que em estudos futuros seja necessário elaborar otimização para CFT e outra para AA, levando em consideração as diferenças de níveis principalmente no fator tempo. A atividade antioxidante quantificada pode ser oriunda de outras classes de metabolitos especializados e não apenas ou em maior quantidade de compostos fenólicos.

5.4 DESEMPENHO DA PREVISÃO DO MODELO DE REGRESSÃO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLSR)

Diferentemente do que foi apresentado até o momento, dados utilizando métodos convencionais de determinação de compostos e atividade antioxidante, nessa segunda parte do estudo, partimos para uma abordagem menos convencional e que vem ganhando espaço em função da sua praticidade, rapidez e baixo custo. Contudo, nesse intuito de encontrar uma forma eficiente e de baixo custo para predição dos níveis de CFT e AA das cascas da *Bertholletia excelsa*, desenvolveu-se um modelo quimiométrico utilizando o método de extração dos canais de cores RGB dos extratos obtidos através do planejamento experimental e dos ensaios (CFT, ABTS, DPPH e FRAP).

Recapitulando que nessa etapa do estudo, foram estudadas e seguem apresentadas duas abordagens de modelagem: a primeira utilizando a relação das imagens dos extratos com os valores de concentração de cada variável dependente (CFT, ABTS, DPPH e FRAP).

A segunda modelagem foi realizada utilizando as imagens de cada ensaio propriamente dito das variáveis dependentes com os valores em concentração obtidos para os mesmos.

Para garantir uma maior robustez do método foi utilizado um menor número possível de variáveis latentes (NVL), levando em consideração que quanto maior o número de NVL maior pode ser o ruído incorporado aos modelos (Santos et al., 2019).

Dessa forma o NVL para cada variável de resposta (ensaios CFT, ABTS, DPPH e FRAP) foi fixado em 5, mantendo o coeficiente de determinação R^2 acima de 0,85 para todos os ensaios.

Seria possível também utilizar um número maior de NVL para obtenção de um R^2 maior, no entanto, considerando que o aumento de NVL leva também a um aumento de ruídos. Neste trabalho foram utilizados 5 NVL para obter um R^2 superior no mínimo a 0,85.

Segundo Andrés et al. (2007) um coeficiente de determinação (R^2) de 0,80 é considerado o limite de confiabilidade do método.

Estudos realizados por Kawamura et al. (2017) na identificação de carbono e nitrogênio no solo obtiveram valores de R^2 utilizando de 7 a 14 variáveis latentes entre 0,96 e 0,99.

Há uma variedade de estudos na literatura utilizando o método PLSR, a exemplo, como descritas a seguir. De Camargo et al. (2018) visando a determinação de massa, volume e densidade de grãos de milho utilizando imagens, para tal, também por PLSR, obtiveram R^2 entre 0,90 e 0,94, com 5 NVL, próximo ao obtido nesse estudo para CFT.

Também em trabalho conduzido por Böck et al. (2018) para identificar etanol e aguardente com utilização de imagens, apresentou resultado satisfatório com R^2 de 0,99. Mostrando que é possível gerar modelos eficientes e de elevada confiabilidade para determinação de diversas variáveis resposta.

As imagens obtidas para os extratos produzidos a partir do planejamento experimental CCD estão representadas na figura 14. Para a análise CFT e AA pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP as imagens obtidas dos ensaios seguem representadas nas figuras 15, 16, 17 e 18 respectivamente.

Figura 13 - Imagens das 15 repetições do extrato obtidos a partir do planejamento experimental



Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 14 - Imagens das 15 repetições obtidas na análise de CFT.



Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 15 - Imagens obtidas nas 15 repetições na análise de AA pelo método ABTS.



Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 16 - Imagens obtidas nas 15 repetições na análise de AA pelo método DPPH.



Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 17 - Imagens obtidas nas 15 repetições na análise de AA pelo método FRAP.



Fonte: autoria própria, 2021.

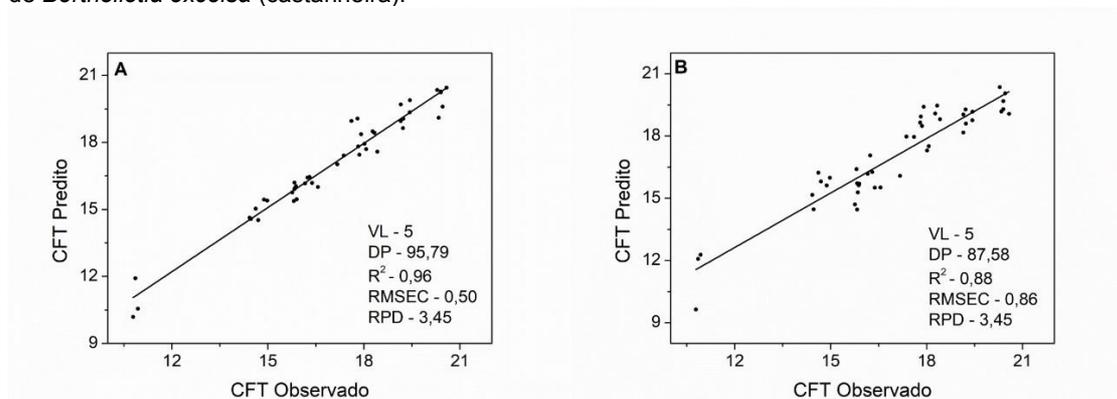
Inicialmente os resultados quimiométricos para CFT seguem apresentados na figura 19. A figura 19A representa a capacidade predita do método pelas imagens dos extratos com os valores de concentração obtidos. Essa abordagem resultou em um R^2 DE 0,96, utilizando 5 variáveis latentes. O valor de RMSEC que indica o erro da modelagem, onde quanto menor o valor, menor o erro de calibração do modelo (De Carvalho et al., 2015), foi também utilizado para avaliar o ajuste e poder preditivo do modelo, obtendo um valor de 0,50.

O valor de RPD foi de 3,45, o que segundo Santos et al. (2019) valores acima de 3 são classificados como bons, como um modelo confiável. No entanto, valores abaixo de 3 podem caracterizar o modelo como não confiável. Nesse sentido, a modelagem de CFT nessa abordagem imagem de extrato x concentração foi considerada eficiente.

A figura 19B representa a utilização do método PLSR pela segunda abordagem utilizada, a que foi empregada as imagens dos ensaios em relação a concentração do próprio ensaio. Para tal, foi obtido um R^2 de 0,88, utilizando 5 variáveis latentes. O valor RMSEC foi de 0,86 e RPD de 3,45 o que o torna caracterizado como um modelo confiável. O RPD nesse caso, sempre será o mesmo independente da abordagem, uma vez que para obtenção de seu valor é levado em consideração apenas os valores de concentração em si e não as imagens.

Com isso, se verificarmos as demais respostas dessa segunda abordagem (figura 19B) comparada a primeira (figura 19A), é possível visualizar um melhor desempenho na primeira, se levarmos em consideração o menor RMSEC, maior R^2 utilizando o mesmo NVL.

Figura 18 - Gráficos da Relação dados observados versus preditos para compostos fenólicos obtido pelas imagens dos extratos (IE) (A) e das imagens dos ensaios (IEN) (B) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR). VL: Número ótimo de variáveis latentes, DP: proporção dependente, R^2 : coeficiente de determinação, RMSEC: raiz quadrada média dos erros de calibração, RPD: valor predito residual em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).



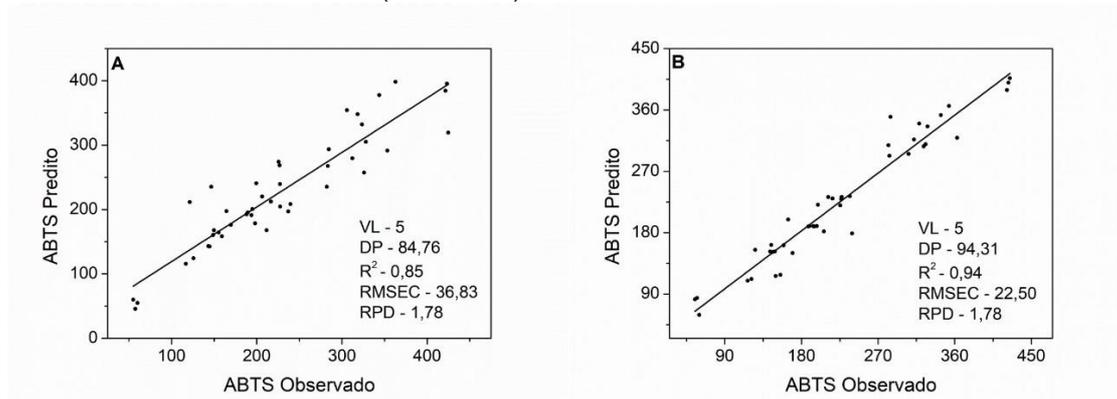
Fonte: autoria própria, 2021.

Para AA pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP os resultados seguem apresentados nas figuras 20, 21 e 22 respectivamente.

Para o ensaio ABTS a figura 20A avaliando a capacidade preditiva pela primeira abordagem (IE), apresentou um R^2 de 0,85 valor esse que está acima do limite de confiabilidade e mínimo estipulado nesse estudo, enquanto o valor para o valor pelo método PLSR (figura 20B), apresentou R^2 0,94.

O valor do RMSEC foi respectivamente de 36,83 e 22,50 para IE e IEN respectivamente. E o valor de RPD foi de 1,78 indicando que possivelmente o modelo não seja confiável, necessitando assim de otimização para uma melhor confiabilidade. Corroborando também com os dados apresentados desde a etapa de otimização, na etapa 1 desse estudo.

Figura 19 - Gráficos da Relação dados observados versus preditos para atividade antioxidante pelo método ABTS obtido pelas imagens dos extratos (IE) (A) e das imagens dos ensaios (IEN) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR). NVL: Número ótimo de variáveis latentes, PD: proporção dependente, R^2 : coeficiente de determinação, RMSEC: raiz quadrada média dos erros de calibração, RPD: valor predito residual em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).

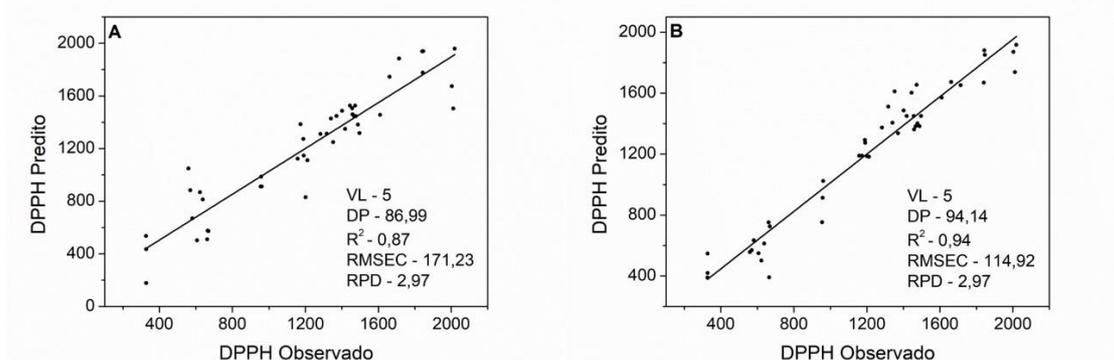


Fonte: autoria própria, 2021.

Em relação ao ensaio DPPH (Figura 21A e 21B) os valores de R^2 foram de 0,87 e 0,94 IE e IEN respectivamente, ambos apresentando valores acima de 0,80 utilizando 5 NVL.

Quanto aos valores de RMSEC foram de 36,83 (EI) e 22,50 (IEN) e o valor de RPD de 2,97. O valor de RPD foi abaixo de 3 caracterizando o modelo como não confiável, no entanto por se tratar de um valor muito próximo a 3 consideramos como confiável, considerando os demais dados desse estudo, inclusive de otimização.

Figura 20 - Gráficos da relação dados observados versus preditos para atividade antioxidante pelo método DPPH obtido pelas imagens dos extratos (IE) (A) e das imagens dos ensaios (IEN) (B) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR). NVL: Número ótimo de variáveis latentes, PD: proporção dependente, R²: coeficiente de determinação, RMSEC: raiz quadrada média dos erros de calibração, RPD: valor predito residual em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).

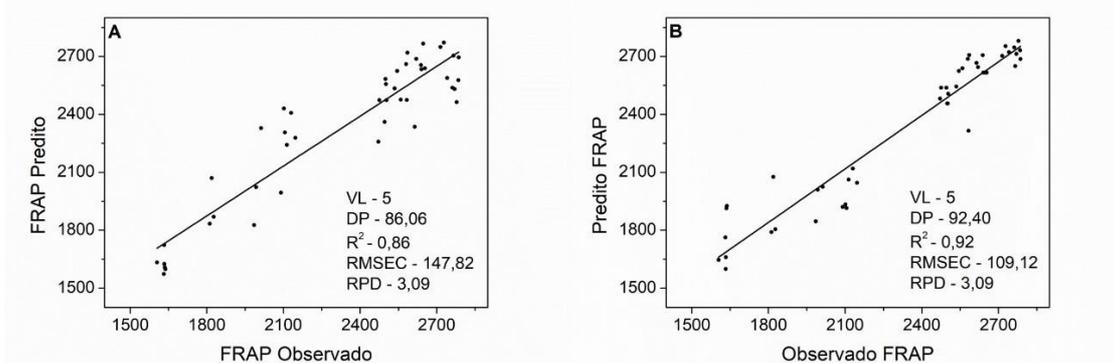


Fonte: autoria própria, 2021.

Os resultados da última variável dependente analisada, o ensaio FRAP (figura 22A e 22B) apresentou valor de R² de 0,86 (EI) e 0,92 (IEN) utilizando também 5 variáveis latentes, valores tais que indicam confiabilidade no modelo.

Em relação aos valores de erro indicados pelo RMSEC foram de 147,82 e 109,12 para as respectivas abordagens IE e IEN. Por fim, o valor de RPD foi de 3,09, indicando que o modelo desenvolvido é confiável e atende ao proposto neste estudo.

Figura 21 - Gráficos da relação dados observados versus preditos para atividade antioxidante pelo método FRAP obtido pelas imagens dos extratos (IE) (A) e das imagens dos ensaios (IEN) (B) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR). NVL: Número ótimo de variáveis latentes, PD: proporção dependente, R²: coeficiente de determinação, RMSEC: raiz quadrada média dos erros de calibração, RPD: valor predito residual em cascas de *Bertholletia excelsa* (castanheira).



Fonte: autoria própria, 2021.

Os resultados obtidos para os modelos se mostraram satisfatórios, com exceção do ensaio ABTS que obteve valor de RPD muito abaixo de 3,0 caracterizando que o modelo necessita de ajuste. De modo geral os dois modelos apresentaram

eficiência parecida, porém o modelo das imagens dos ensaios (IEN) se mostrou discretamente mais eficiente que o método com imagens dos extratos (IEN).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de um planejamento experimental é peça fundamental para a otimização da extração de compostos fenólicos e determinação da atividade antioxidante, uma vez que torna a extração mais eficiente, reprodutível e de maior confiabilidade. Nesse sentido, ao utilizarmos o planejamento de composto central rotacional, podemos considerar que os resultados apresentaram uma extração eficiente sugerida aqui, sendo ela próxima ao ponto central de concentração de etanol (50%), temperatura de 60 °C e tempo de extração de 30 min.

É importante ressaltar também que o planejamento utilizado para tal abordagem convencional de quantificação das variáveis dependentes, pode ser considerado rápido, de menor custo e mesmo assim eficaz, mesmo não se tratando de um planejamento completo. No entanto, de fato, o ensaio de ABTS se mostrou ainda não otimizado, necessitando ajustes no planejamento.

De outro ponto de vista, é possível considerar também a utilização e emprego de dois extratos. Um para CFT e um para a determinação da AA, já que os resultados obtidos nas equações com os coeficientes de regressão, mostraram para essa variável uma condição um pouco mais variada do que para as demais estudadas.

Os modelos quimiométricos são ferramentas que, otimizadas de forma adequada, podem trazer facilidade e economia em análises de rotina.

Em suma, quanto ao estudo quimiométrico, os resultados indicaram uma modelagem eficiente para CFT, FRAP e DPPH, já o modelo para o ensaio ABTS mostrou necessitar de outros testes para melhor ajuste e busca de um modelo mais eficiente. Um fato importante a ser considerado no caso do ABTS, é a rapidez em que ocorre a reação, em que a leitura ocorre em apenas 6 min. Logo, o tempo entre a realização das leituras e registro das imagens pode ter ocorrido alguma interferência na geração das imagens.

De maneira geral, esse estudo atendeu aos objetivos propostos, considerando de maneira geral os resultados satisfatórios. No entanto, é sugerido a continuação dos estudos com a castanheira, utilizando técnicas cromatográficas que poderão contribuir para o aumento do número de informações sobre esta espécie encontrada no Bioma Brasileiro, na Floresta Amazônica, possibilitando também novas aplicações em diversas áreas, como medicinais, cosmético e até mesmo em alimentos.

7 REFERÊNCIAS

AGASSIZ; VASQUES, A.; BARROS, E. DE; FONSECA, M. Estresse oxidativo, exercício físico e saúde encefálica. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, p. 76–98, 2018.

ALEGRE, P.; MATHIAS, L.; LOURENÇO, M. A.; et al. Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Reduz o Estresse Oxidativo e Melhora o Metabolismo Energético da Lesão de Isquemia-Reperusão Miocárdica Em Ratos Euterpe. **Arq Bras Cardiol.**, v. 114, n. 1, p. 78–86, 2020.

ALVES, R.; LEONARDO DOS SANTOS, A.; MATOS SILVA SOUSA, H.; et al. Determinação Dos Compostos Fenólicos Totais Em Cascas De Frutas Encontradas No Cerrado Brasileiro. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 7, n. Especial, p. 26–33, 2020.

ANDRADE, R. A. M. DE S.; MACIEL, M. I. S.; SANTOS, A. M. P.; MELO, E. DE A. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 354–360, 2015.

ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; NAVAJAS, E. A.; et al. Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science**, v. 76, n. 3, p. 509–516, 2007.

ARAÚJO, A.; MARINHO, W.; DE ARAÚJO GOMES, A. A Fast and Inexpensive Chemometric-Assisted Method to Identify Adulteration in Acai (Euterpe oleracea) Using Digital Images. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1920–1926, 2018. Food Analytical Methods.

BADARINATH, A. V; RAO, K. M.; MADHU, C.; et al. A Review on *in-vitro* antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010. Disponível em: <<https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=383951>>.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: Um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 992–1000, 2010.

BARAT, K. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS SECONDARY PLANT METABOLITES. , v. 7, n. 1, p. 104–126, 2017.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARBOSA, M. R.; MEDEIROS DE ARAÚJO, M.; II, S.; et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

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

BÖCK, F. C.; HELFER, G. A.; DA COSTA, A. B.; DESSUY, M. B.; FERRÃO, M. F. Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1951–1957, 2018. Food Analytical Methods.

BOUVIE, L.; BORELLA, D. R.; PORTO, P. A. O.; SILVA, A. C.; LEONEL, S. Caracterização físico-química dos frutos de castanheira do Brasil. **Nativa**, v. 4, n. 2, p. 107–111, 2016.

CAKMAKCI, S.; TOPDAŞ, E. F.; KALIN, P.; et al. Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 472–481, 2015.

DE CAMARGO, V. R.; DOS SANTOS, L. J.; PEREIRA, F. M. V. A Proof of Concept Study for the Parameters of Corn Grains Using Digital Images and a Multivariate Regression Model. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1852–1856, 2018. Food Analytical Methods.

CAMPOS, F. R.; JANUÁRIO, A. H.; ROSAS, L. V.; et al. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 26–29, 2005.

DE CARVALHO, B. M. A.; DE CARVALHO, L. M.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; et al. Rapid detection of whey in milk powder samples by spectrophotometric and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 174, p. 1–7, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.003>>.

CASAGRANDE, M.; ZANELA, J.; PEREIRA, D.; et al. Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1120–1129, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11694-018-00027-x>>.

CASTRO, M. V. DE. **Utilização de planejamento experimental para otimizar a produção de metabólitos secundários produzidos por *Penicillium sp.*, isolado do ambiente marinho** Tese, 2015. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

CHEW, K. K.; NG, S. Y.; THOO, Y. Y.; et al. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. **International Food Research Journal**, v. 18, p. 571–578, 2011.

COSTA, J. R.; CASTRO, A. B. C.; WANDELLI, E. V.; CORAL, S. C. T.; SOUZA, S. A. G. DE. Aspectos silviculturais da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 843–850, 2009.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; DOS SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175, 2016.

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

DALAR, A.; MUKEMRE, M.; UNAL, M.; OZGOKCE, F. Traditional medicinal plants of Ağrı Province, Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, n. August, p. 56–72, 2018.

DAMASCENO, D.; TOLEDO, T. G.; GODINHO, M. S.; et al. Análise multivariada de imagens na química: Um experimento para determinação do pH de águas potáveis. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 836–841, 2015.

DORTA, E.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Optimization of Factors Affecting Extraction of Antioxidants from Mango Seed. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 1067–1081, 2013.

DUDONNE, S., VITRAC, X., COUTIERE, P., WOILLETZ, M. AND MERILLON, J. M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). **J. Agric. Food Chem**, v. 57, p. 1768–1774, 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf803011r>>.

DUMONT, E.; DE PAUW, L.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 684–692, 2006.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos: compostos majoritários de óleos essenciais. **Química e Sociedade**, v. 39, n. 2, p. 120–130, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>>.

FIRMO, W.; MENEZES, C.; PASSOS, C. E.; et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, v. 18, n. 2, p. 90–95, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3462495>>.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>>.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. , v. 2014, 2014.

GOMES, B.; NASCIMENTO, C.; LAGE, I.; et al. ANTIOXIDANTES COMO FORMA DE PREVENÇÃO CONTRA A AÇÃO DOS RADICAIS LIVRES NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO CUTÂNEO. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

GUAUQUE, M. DEL P.; CASTAÑO, J. C.; GÓMEZ, M. Detección de metabolitos secundarios en Ambrosia peruviana Willd y determinación de la actividad antibacteriana y antihelmíntica. **Infectio**, v. 14, n. 3, p. 186–194, 2010. Elsevier. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70110-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70110-7)>.

GUERRA-ARAIZA, C.; ÁLVAREZ-MEJÍA, A. L.; SÁNCHEZ-TORRES, S.; et al. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. **Free Radical Research**, v. 47, n. 6–7, p. 451–462, 2013.

GUNST, R. F.; MASON, R. L. Fractional factorial design. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 1, n. 2, p. 234–244, 2009.

HOSU, A.; CRISTEA, V. M.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113–118, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.153>>.

HOUGHTON, T. P.; KALIVAS, J. H. Implementation of Traditional and Real-World Cooperative Learning Techniques in Quantitative Analysis Including Near Infrared Spectroscopy for Analysis of Live Fish. **Journal of Chemical Education**, v. 77, n. 10, p. 1314–1318, 2000.

HUSSAIN, M. I.; QAMAR ABBAS, S.; REIGOSA, M. J. Atividades e novas aplicações das cumarinas enquanto metabólitos secundários. **Planta Daninha**, v. 36, p. 1–13, 2018.

IZIDORO, M.; PRATES, A. R.; NEVES, C. S.; et al. Propriedades funcionais e organolépticas de plantas condimentares: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e2010614958, 2021.

JEŽEK, J.; COOPER, K. F.; STRICH, R. Reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: The yin and yang of mitochondrial dysfunction and cancer progression. **Antioxidants**, v. 7, n. 1, 2018.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196–209, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.008>>.

KAWAMURA, K.; TSUJIMOTO, Y.; RABENARIVO, M.; et al. Vis-NIR spectroscopy and PLS regression with waveband selection for estimating the total C and N of paddy soils in Madagascar. **Remote Sensing**, v. 9, n. 10, 2017.

KOWALSKI, L.; DIAS DA SILVA, A.; RODRIGUES PAGNO, A.; PIANA, M. Atividade Antimicrobiana de Flavonoides: uma Revisão de Literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51–65, 2020.

LEMIRE, M.; MERGLER, D.; HUEL, G.; et al. Biomarkers of selenium status in the amazonian context: Blood, urine and sequential hair segments. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 19, n. 2, p. 213–222, 2009.

LIMA, I. E. O.; NASCIMENTO, L. A. M.; SILVA, M. S. Comercialização de plantas medicinais no município de arapiraca-AL. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 462–472, 2016.

LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 133, p. 379–402, 2017. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.061>>.

MATSUURA, H. N.; MALIK, S.; DE COSTA, F.; et al. Specialized Plant Metabolism Characteristics and Impact on Target Molecule Biotechnological Production. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 169–183, 2018. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12033-017-0056-1>>.

MATTOS, G.; CAMARGO, A.; DE SOUSA, C. A.; ZENI, A. L. B. Medicinal plants and herbal medicines in primary health care: The perception of the professionals. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735–3744, 2018.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.

MORELLOS, A.; PANTAZI, X. E.; MOSHOU, D.; et al. Machine learning based prediction of soil total nitrogen, organic carbon and moisture content by using VIS-NIR spectroscopy. **Biosystems Engineering**, v. 152, p. 104–116, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.04.018>>.

OLIVEIRA, D.; BASTOS, D. BIODISPONIBILIDADE DE ÁCIDOS FENÓLICOS. **Quimica Nova**, v. 31, n. 4, p. 1051–1056, 2011.

OLIVEIRA, L.; MUZITANO, M.; COUTINHO, M.; MELO, G.; COSTA, S. Plantas Mediciniais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá , RJ , Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos. **Revista Científica Internacional**, v. 4, n. 17, p. 54–74, 2011.

PACE, B.; CEFOLA, M.; RENNA, F.; et al. Multiple regression models and Computer Vision Systems to predict antioxidant activity and total phenols in pigmented carrots. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 1, p. 74–81, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.005>>.

PEREIRA, I. S. P.; RODRIGUES, V. F.; VEGA, M. R. G. Flavonoids from the genus Solanum. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 4–26, 2016.

PEREIRA, P. C. DE S.; FREITAS, C. F. DE; CHAVES, C. S.; et al. CHEMOMETRY IN UNDERGRADUATE CHEMISTRY COURSES: A PROPOSAL FOR THE USE OF MULTIVARIATE ANALYSIS IN THE DETERMINATION OF pK a. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1417–1425, 2014.

PERIN, E. C.; FONTOURA, B. H.; LIMA, V. A.; CARPES, S. T. RGB pattern of images allows rapid and efficient prediction of antioxidant potential in Calycophyllum spruceanum barks. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 7104–7114, 2020. King Saud University. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.07.015>>.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>>.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: Aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389–399, 2012.

ROCHA, E. D.; SILVA, V. E. A.; PEREIRA, F. C. S.; et al. Qualitative terpene profiling of Cannabis varieties cultivated for medical purposes. **Rodriguesia**, v. 7, 2020.

ROCHA, F. A. G. DA; ARAÚJO, L. S. G. DE; LIMA, T. G. D.; et al. Características Do Comércio Informal De Plantas Medicinais No Município De Lagoa Nova/Rn. **Holos**, v. 5, p. 264, 2013.

RUFINO, M. DO S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; et al. ISSN 1679-6535 Julho, 2007 Fortaleza, CE. , p. 0–3, 2007.

RUSAK, D. A.; BROWN, L. M.; MARTIN, S. D. Classification of vegetable oils by principal component analysis of FTIR spectra. **Journal of Chemical Education**, v. 80, n. 5, p. 541–543, 2003.

SANTIAGO, M. C. P. DE A.; ANJOS, M. R. DOS; JESUS, M. S. C. DE; et al. ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p.61446–61462, 2020.

DOS SANTOS, D. S.; FARIAS RODRIGUES, M. M. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29, 2017.

SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, P. A. M.; GUEDES, W. N.; et al. Chemometrics in analytical chemistry – an overview of applications from 2014 to 2018. **Eclética Química Journal**, v. 44, n. 2, p. 11, 2019.

SANTOS, M.; FERREIRA, M. Inventário de espécies medicinais empregadas pelo IEPA, Macapá - AP. **Journal of Visual Languages & Computing**, v. 1, n. 3, p. 159–180, 2005. Disponível em: <https://www.m-culture.go.th/mculture_th/download/king9/Glossary_about_HM_King_Bhumibol_A_dulyadej's_Funeral.pdf>.

SANTOS, O. V.; CORRÊA, N. C. F.; CARVALHO, R. N.; et al. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 841–847, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.054>>.

SANTOS, O. V. DOS; LOPES, A. S.; AZEVEDO, G. O.; SANTOS, Â. C. Processing of Brazil-nut flour: characterization, thermal and morphological analysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 264–269, 2010.

SARAL, Ö.; YILDIZ, O.; ALIYAZICIOĞLU, R.; et al. Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 194–202, 2016.

SARI, R.; CONTERNO, P.; DA SILVA, L. D.; et al. Extraction of phenolic compounds from *tabernaemontana catharinensis* leaves and their effect on oxidative stress markers in diabetic rats. **Molecules**, v. 25, n. 10, 2020.

SEGURA, R.; JAVIERRE, C.; LIZARRAGA, M. A.; ROS, E. Other relevant components of nuts: Phytosterols, folate and minerals. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. SUPPL. 2, 2006.

SEN, I.; OZTURK, B.; TOKATLI, F.; OZEN, B. Combination of visible and mid-infrared spectra for the prediction of chemical parameters of wines. **Talanta**, v. 161, p. 130–137, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.057>>.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 42, n. 5, p. 556–564, 2013.

SHANLEY, P.; MEDINA, G.; SILVIA, I.; IMBIRIBA, M. **Frutíferas e Plantas Úteis Livro.pdf**. 2005.

SHARMA, G. N.; GUPTA, G.; SHARMA, P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. , v. 28, n. 2, p. 139–154, 2018.

SIKORA, E.; CIEŚLIK, E.; LESZCZYŃSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 55–59, 2008.

DA SILVA, A. P. A. B.; AMORIM, R. M. F.; DE FREITAS LOPES, R.; et al. Calycophyllum spruceanum BENTH ameliorates acute inflammation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, n. March, p. 103–109, 2018. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.023>>.

SINGLETON, V.; LIBBEY, L. M.; WALRADT, J. P. analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Anitoxidants by Means Of Folin-Ciocalteu Reagent. **Lipids**, v. 3, n. 6, p. 561, 1999.

SOUZA, A. E. C.; CERQUEIRA, D. A.; SOUSA, N. G.; CARDOSO, C. R. Simulação do processo de destilação extrativa para produção de etanol anidro utilizando etilenoglicol como agente de separação. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e45610414228, 2021.

SOUZA, A. M. DE; POPPI, R. J. Experimento didatico de quimiometria parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SOUZA, M. J. C.; LOBATO, S. L. X.; MENEZES, R. A. D. O. Conhecimento tradicional de plantas medicinais na comunidade ribeirinha do Igarapé Banha no Município de Mazagão - Amapá, Amazônia brasileira. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 9, n. 1, p. 51, 2019.

SOUZA, M.; KUHNEN, S.; CRISTINA, D.; et al. PREDIÇÃO DOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES NA PARTE AÉREA DAS ESPÉCIES *Secale cereale* L., *Avena strigosa* L. E *Raphanus sativus* L. POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR). , v. 40, n. 9, p. 1074–1081, 2017.

STANKEVIČIUS, M.; MARUŠKA, A.; JAKOBSONE, I.; AKUNECA, I. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activities of spice plants extracts. , , n. 2, p. 85–91, 2010.

SUN, Y. X.; LIU, J. C.; KENNEDY, J. F. Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus* (Schaeff.: Fr.) O.K. Miller by Box-Behnken statistical design. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 1, p. 209–214, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5^o ed. Porto Alegre, 2013.

TELLES, A. C.; KUPSKI, L.; FURLONG, E. B. Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. **Food Chemistry**, v. 214, p. 293–299, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.079>>.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; CUNHA, M. G. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 2, 2011.

VASCONCELOS, N. R. I. DE; DÁTILLO, G. M. P. DE A.; CHIES, A. B.; et al. Oxidative stress among informal caregivers. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, 2019.

WASZKOWIAK, K.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. Binary ethanol–water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 5, p. 777–786, 2016.

XIONG, Q.; LI, X.; ZHOU, R.; et al. Extraction, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *E. corneum gigeriae galli*. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, n. 1, p. 247–256, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.068>>.

XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; GIKAS, E.; et al. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 323–330, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.10.040>>.

YANG, J.; LIU, R. H.; HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.07.007>>.

ZAMORA-GASGA, V. M.; SERAFÍN-GARCÍA, M. S.; SÁNCHEZ-BURGOS, J. A.; ESTRADA, R. M. V.; SÁYAGO-AYERDI, S. G. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Starfruit (*Averrhoa carambola* L) Leaves. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 4, p. 1–10, 2017.