

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA VERDE E
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DO RESÍDUO DE
CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. E DO SEU FITOCOSMÉTICO

GIOVANA SANT'ANA PEGORIN

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCINÉIA DOS SANTOS

COORIENTADOR: Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

ARARAQUARA - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA VERDE E
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DO RESÍDUO DE
CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. E DO SEU FITOCOSMÉTICO

GIOVANA SANT'ANA PEGORIN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCINÉIA DOS SANTOS

COORIENTADOR: Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

ARARAQUARA - SP

2019

-
- P376d** Pegorin, Giovana Sant'Ana.
Desenvolvimento de metodologia analítica verde e avaliação da citotoxicidade do extrato do resíduo de *Caryocar brasiliense* Camb. e do seu fitocosmético / Giovana Sant'Ana Pegorin. – Araraquara, 2019.
95 f. : il.
- Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.
- Orientadora: Lucinéia dos Santos.
Coorientador: Cristiano Soleo de Funari
1. *Caryocar brasiliense* Camb. 2. Fitocosmético. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Toxicidade. 5. Metabólitos secundários. I. Santos, Lucinéia dos, orient. II. Funari, Cristiano Soleo de, coorient. III. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA VERDE E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DO RESÍDUO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. E DO SEU FITOCOSMÉTICO

AUTORA: GIOVANA SANT'ANA PEGORIN
ORIENTADORA: LUCINÉIA DOS SANTOS
COORDENADOR: CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCINÉIA DOS SANTOS
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP Assis

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacológicas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP Assis

Araraquara, 09 de agosto de 2019

*Dedico este trabalho a Deus, à
minha família (meus pais, noivo,
avós, tios e primos) e às pessoas
especiais, que sempre estiveram e
estarão ao meu lado, dando apoio,
carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e do conhecimento.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e dedicação. Obrigada por tudo que fizeram para que eu conseguisse dar mais um passo na minha carreira.

Aos meus familiares e ao meu noivo, pelo incentivo e motivação.

À Prof^a Dr^a Lucinéia dos Santos, pela orientação, incentivo, confiança, ajuda na execução do trabalho e amizade.

Ao Prof^o Dr. Cristiano Soleo de Funari, pela coorientação do trabalho, conhecimentos transmitidos e amizade.

Ao Prof^o Dr. André Gonzaga dos Santos, por ter me acolhido em seu laboratório e me auxiliado no desenvolvimento deste trabalho, além da amizade e da colaboração dos seus alunos de pós-graduação e do técnico responsável por seu laboratório (Caio).

Ao Prof^o Rondinelli Donizetti Herculano, por permitir a realização de testes de citotoxicidade em seu laboratório e pela acolhida.

Aos técnicos de laboratório do Câmpus de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara (Adriana, Ana Lúcia e Mateus) e do Instituto de Química de Araraquara – UNESP (Juliana e João).

Aos amigos que a pós-graduação me proporcionou e que, em diferentes momentos, foram essenciais na minha vida e formação.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A geração de resíduos nas diversas atividades humanas tem sido tema central em discussões sobre sustentabilidade ambiental, com destaque para os resíduos agroindustriais. Sabe-se que a partir de tecnologias verdes, os resíduos de biomassa apresentam grande potencial para impulsionar a produção sustentável e gerar produtos químicos de alto valor agregado. O Cerrado é considerado o bioma mais ameaçado no Brasil e no mundo, devido à expansão das fronteiras agrícolas com subseqüentes perdas de espécies vegetais nativas. Entretanto, ainda hospeda 4600 espécies endêmicas, que merecem ser preservadas, como *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae), mais conhecido como pequi. Dentro desse contexto, a realização de estudos de prospecção química e farmacológica do resíduo da polpa do pequi, visando o desenvolvimento de fitoprodutos, abre a possibilidade de uso dessa matéria-prima na fabricação de produtos de alto valor agregado, permitindo que sua valorização econômica resulte no equilíbrio entre sua produção agrícola e a proteção do meio ambiente. Diante do que foi exposto, este trabalho teve por objetivo desenvolver metodologias verdes para identificar os metabólitos secundários presentes no extrato hidroetanólico da torta (resíduo) da polpa do pequi, a partir do resíduo obtido no processo de extração de seu óleo, e também no fitocosmético à base deste extrato. Ademais, avaliar a toxicidade *in vitro* deste extrato e do fitocosmético. Em relação à toxicidade *in vitro*, o extrato não proporcionou o rompimento da membrana das hemácias na avaliação da atividade hemolítica em concentrações iguais ou inferiores a 125 µg/mL. Além disso, o creme base e o fitocosmético também apresentaram 0% de hemólise em todas as concentrações (250, 125 e 62,5 µg/mL), semelhante estatisticamente ao controle negativo, demonstrando que as amostras não promoveram nenhum dano na membrana celular das hemácias, sendo, portanto, atóxicas. No teste de citotoxicidade pelo método MTT, nos três tempos de tratamentos (24, 48 e 72 h), o extrato, o creme base e o fitocosmético se mostraram atóxicos nas concentrações (15,6 a 250 µg/mL). O valor de CI₅₀ do extrato foi superior a 50%, indicando uma citotoxicidade a ser desconsiderada. Estes resultados sugerem o uso deste extrato no desenvolvimento de um novo fitocosmético. A partir das análises por CLAE-DAD/UV, foi possível desenvolver uma condição cromatográfica apropriada para separar e identificar os metabólitos secundários neste extrato. A melhor condição utilizou H₂O ultrapura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e MeOH e a coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®). Esta condição, convertida para um sistema CLUE-QTOF-EM, foi utilizada para a identificação tentativa dos metabólitos secundários, sendo identificadas substâncias da classe dos compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides (glicosilados ou não), além de açúcares. O ácido clorogênico (m/z 353 [M-H]⁻), glicosídeo do ácido cafeico (m/z 341 [M-H]⁻), ácido *p*-cumárico (m/z 163 [M-H]⁻), miricetina-galoil-glicosídeo (m/z 631 [M-H]⁻), sacarose (m/z 341 [M-H]⁻) e metil-2-O- α -ramnopiranosil- β -glicosídeo (m/z 471 [M-H]⁻) foram algumas das substâncias identificadas. Sendo assim, foi possível afirmar que a condição cromatográfica desenvolvida foi eficaz na resolução dos picos, bem como na detecção e identificação das substâncias por meio dos espectros no UV e de massas.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense* Camb. Fitocosmético. Resíduos agroindustriais. Toxicidade. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The generation of waste in the various human activities has been the central theme in discussions on environmental sustainability, with emphasis on agroindustrial waste. It is known that from green technologies, biomass residues have great potential to boost sustainable production and generate high added value chemicals. The Cerrado is considered the most threatened biome in Brazil and the world, due to the expansion of agricultural borders with subsequent losses of native plant species. However, it still hosts 4600 endemic species that deserve to be preserved, such as *Caryocar brasiliense* Camb., better known as pequi. In this context, the study of chemical and pharmacological prospecting of the pequi pulp residue, aiming at the development of plant products, opens the possibility of using this raw material in the manufacture of products with high added value, allowing that its economic appreciation results in the balance between the agricultural production and the environment protection. In view of the foregoing, this work aimed to develop green methodologies to identify the secondary metabolites present in the hydroethanolic extract of the pequi pulp residue, from the residue obtained in the extraction process of its oil, as well as in phytocosmetic with a base of this extract. In addition, to assess the in vitro toxicity level of this extract and of this phytocosmetic in order to confirm its safety. In relation to in vitro toxicity, the extract did not cause rupture of the red blood cells in the evaluation of hemolytic activity at concentrations equal or lower than 125 µg/mL. Furthermore, the base cream and the phytocosmetic also showed 0% of hemolysis at all concentrations (250, 125 and 62.5 µg/mL), similar to the negative control, showing that the samples analyzed did not promote any damage to the erythrocytes membrane, therefore, they are not toxic. In the MTT cytotoxicity test, at the three treatment times (24, 48 and 72 h), the extract, the base cream and the phytocosmetic were non-toxic in the concentrations (15.6 to 250 µg/mL). The IC₅₀ value of the extract was higher than 50%, indicating a cytotoxicity to be disregarded. These results suggest that the use of this extract is safe for development of a new phytocosmetic. From the analyzes by HPLC-DAD/UV, it was possible to develop an appropriate chromatographic condition to separate and identify the secondary metabolites in this extract. The best condition utilized ultrapure H₂O acidified with 0.1% (v/v) formic acid and MeOH and the C18 Hydro 250 x 4.6 mm x 4 µm (Phenomenex ®) column. This condition, converted to a CLUE-QTOF-MS system, was used for the tentative identification of secondary metabolites, being identified substances of the phenolic compounds class, such as phenolic acids and flavonoids (glycosylated or not), as well as sugars. Chlorogenic acid (m/z 353 [M-H]⁻), caffeic acid glycoside (m/z 341 [M-H]⁻), *p*-coumaric acid (m/z 163 [M-H]⁻), myrecitin-galloyl-glycoside (m/z 631 [M-H]⁻), sucrose (m/z 341 [M-H]⁻) and methyl-2-O- α -rhamnopyranosyl- β -glycoside (m/z 471 [M-H]⁻) were some of the substances identified in extract. Thus, it was possible to state that the chromatographic condition developed was effective in the resolution of the peaks, as well as in the detection and identification of the substances by means of UV and mass spectra.

Keywords: *Caryocar brasiliense* Camb. Phytocosmetic. Agroindustrial waste. Toxicity. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas.	25
Figura 2. Poços de microplacas representando o controle negativo (CN) com 0% de hemólise e o controle positivo (CP) com 100% de hemólise.	36
Figura 3. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com controle negativo (CN), controle positivo (CP) e extrato (E) por 24, 48 e 72 h nas diferentes concentrações (1- 625 µg/mL; 2- 1250 µg/mL; 3- 2500 µg/mL; 4- 5000 µg/mL; 5- 10000 µg/mL; 6- 20000 µg/mL).	39
Figura 4. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com controle negativo (CN), controle positivo (CP) e extrato (E) por 24, 48 e 72 h nas diferentes concentrações (1 - 15,6 µg/mL; 2 - 31,2 µg/mL; 3 - 62,5 µg/mL; 4 - 125 µg/mL; 5 - 250 µg/mL).	40
Figura 5. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com controle negativo (CN), controle positivo (CP) e creme base (CB) por 24, 48 e 72 h.	41
Figura 6. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com creme base (CB), controle positivo (CP) e creme com extrato (CE) por 24, 48 e 72 h nas diferentes concentrações (1 - 15,6 µg/mL; 2 - 31,2 µg/mL; 3 - 62,5 µg/mL; 4 - 125 µg/mL; 5 - 250 µg/mL).	42
Figura 7. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e EtOH em 250 nm. Colunas: (A) C18 150 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis® Express) e (B) C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®). 5 a 100% EtOH em 30 min, vazão 0,8 mL/min, 20 µL, no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).	44
Figura 8. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e EtOH em 250 (A) e 280 (B) nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), 5 a 100% EtOH em 30 min, vazão 0,8 mL/min, 20 µL (48,2 mg/mL), no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).	46
Figura 9. Cromatograma representativo da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e EtOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), EtOH 3% para 35% em 20 min; EtOH 35% para 84% em 5 min; EtOH 84% em 15 min; EtOH 84% para 100% em 1 min; EtOH 100% em 4 min (Condição 8), vazão 0,8 mL/min, 20 µL (48,2 mg/mL), no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).	48
Figura 10. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e EtOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), condições 5 (A), 7 (B) e 8 (C), fluxo 0,8 mL/min, 20 µL (48,2 mg/mL), no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).	49

Figura 11. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e MeOH em 250 (A) e 280 (B) nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), 5 a 100% MeOH em 30 min, fluxo 1 mL/min, 20 µL (50,7 mg/mL), no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).	51
Figura 12. Cromatograma representativo da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e MeOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), MeOH 5% em 15 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min (Condição 16), vazão 1 mL/min, 20 µL (50,7 mg/mL), no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).	53
Figura 13. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e MeOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), condições 12 (A), 15 (B) e 16 (C), vazão 1 mL/min, 20 µL (50,7 mg/mL), nos cromatógrafos Thermo Scientific (CLAE 2) e Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).....	54
Figura 14. Comprimento de onda de máxima absorção dos picos do cromatograma representativo da fração FA1 eluída com fase móvel composta por e H ₂ O ultrapura e MeOH, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), Condição 16, no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).....	56
Figura 15. Pureza dos picos do cromatograma representativo da fração FA1 eluída com fase móvel composta por e H ₂ O ultrapura e MeOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), Condição 16, no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).	57
Figura 16. Cromatogramas representativos das frações FD1 (A), FD2 (B) e FD4 (C) eluídas com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% para 5% em 15 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min (Condição 1), vazão 1 mL/min, 20 µL (10 mg/mL), no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).	58
Figura 17. Cromatogramas representativos da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura sem (A) e com (B) 0,1% de ácido fórmico e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min; MeOH 0% para 5% em 10 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min (Condição 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (20 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).	60
Figura 18. Cromatograma representativo da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura e MeOH em 254 nm, coluna fenil 250 x 4,0 mm x 5 µm (NST®), MeOH 5% em 10 min, MeOH 5% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96%	

para 100% em 1 min, (Condição 1), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (20 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2)..... 61

Figura 19. Cromatograma representativo da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (20 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2) (A) e ampliação do cromatograma entre os picos 17 a 34 (B).. 62

Figura 20. Cromatograma representativo da fração C1 (fitocosmético) eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (6 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2) (A) e ampliação do cromatograma entre os picos 15 a 29 (B).....64

Figura 21. Cromatogramas representativos da fração FE2 (A) e da coinjeção com ácido cafeico (B) eluídos com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH, em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL, no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2). 65

Figura 22. Cromatogramas representativos da fração FE2 (A) e da coinjeção com ácido clorogênico (B) eluídos com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH, em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL, no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2)..... 67

Figura 23. Cromatogramas representativos da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH, monitorado em 254 (A), 315 (B), 327 (C), 365 (D) e 445 (E) nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (20 mg/mL), forno de coluna 30°C no cromatógrafo Shimadzu (CLAE 4)..... 68

Figura 24. Espectros no UV obtidos <i>online</i> a partir da fração FE2 do extrato.	70
Figura 25. Estrutura de um flavonoide.	71
Figura 26. Estruturas do ácido cinâmico e do ácido benzoico.	72
Figura 27. Cromatogramas representativos da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H ₂ O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH, coluna C18 100 x 2,1 mm x 1,8 μm (Acquity Waters®), MeOH 5% em 4,5 min, MeOH 5% para 20% em 1,8 min, MeOH 20% para 100% em 5,4 min e MeOH 100% em 1 min, vazão 0,4 mL/min e volume de injeção 1 μL, no modo positivo (A) e negativo (B), no cromatógrafo Waters (CLUE).	73
Figura 28. Espectros de massas (EM/EM) da sacarose (A) e do metil-2-O- α -ramnopiranosil- β -glicosídeo (B).	75
Figura 29. Espectro de massas (EM/EM) da α -L-ramnopiranosil-(1→3)- α -D-galactopiranosil-(1→3)-L-fucose.	76
Figura 30. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do ácido <i>p</i> -cumárico.	77
Figura 31. Espectros de massas (EM/EM) do ácido cumaroilquínico no modo negativo (A) e no modo positivo (B).	77
Figura 32. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do ácido clorogênico.	78
Figura 33. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do glicosídeo do ácido cafeico.	79
Figura 34. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do dicafeoil-verbascoside.	80
Figura 35. Espectros de massas (EM/EM) e no UV da miricetina-galoil-glicosídeo.	81
Figura 36. Espectros de massas (EM/EM) de kaempferol-ramnose (A), kaempferol-glicose (B) e apigenina-glicuronídeo (C).	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de hemólise promovida pelo controle positivo (CP), controle negativo (CN), creme base (CB), extrato (E) e creme com extrato (CE) em diferentes concentrações. 37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Condições cromatográficas testadas em CLAE para as frações FA1, FD1, FD2, FD4 e FE2..... 31

Quadro 2. Substâncias identificadas na fração FE2 do extrato do resíduo da polpa do pequi por meio de CLUE-QTOF-EM em modos de ionização negativo e positivo. 74

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ε	Força de eluição
k	Fator de retenção
α	Seletividade
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% da viabilidade celular
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAC	Equivalente ao Ácido Gálico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
ELS	Extração Líquido-Sólido
EM	Espectrometria de Massas
EQ	Equivalente à Quercetina
ESI	<i>Eletrospray</i>
EtOH	Etanol
GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
MCP	Placa de microcanais
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADES	<i>Natural Deep Eutetic Solvents</i>
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OLE-LC	<i>Online Extraction Directly Coupled to High Performance Liquid Chromatography</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
PANC	Planta Alimentícia Não Convencional

PVDF	Floureto de polivinilideno
QTOF	<i>Quadropole Time Of Fligh</i>
Rs	Resolução
SFB	Soro Fetal Bovino
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1. <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. (Pequi)	17
3.1.1. Composição química do pequi e seu resíduo	18
3.1.2. Uso popular do pequi	19
3.2. Química Verde	19
3.2.1. A questão dos solventes	19
3.2.2. Química Analítica Verde	20
3.2.3. Resíduos agroindustriais	22
3.3. Fitocosméticos	23
4. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1. Obtenção do resíduo	25
5.2. Preparo do extrato do resíduo	25
5.3. Preparo do fitocosmético com incorporação do extrato do resíduo	26
5.4. Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i>	26
5.4.1. Teste da Atividade Hemolítica	26
5.4.2. Teste de Citotoxicidade pelo método MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)	27
5.5. Pré-tratamento por extração em fase sólida (EFS) para análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM)	28
5.5.1. EFS com o extrato do resíduo	28

5.5.2. EFS com o fitocosmético preparado	29
5.5.3. Preparo de soluções padrão	30
5.6. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM).....	30
5.7. Análise estatística	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1. Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i>	36
6.1.1. Teste da Atividade Hemolítica.....	36
6.1.2. Teste de Citotoxicidade pelo método MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)	38
6.2. Pré-tratamento por extração em fase sólida (EFS) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM)	42
6.2.1. Desenvolvimento de método por CLAE-DAD/UV	42
6.2.2. Identificação tentativa dos compostos.....	65
7. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS.....	93

1. INTRODUÇÃO

A geração de resíduos nas diversas atividades humanas tem sido tema central em discussões sobre sustentabilidade ambiental, com destaque para os resíduos agroindustriais, pois se estima que 140 bilhões de toneladas métricas de biomassa são geradas todos os anos pela agricultura (DIDASKALOU *et al.*, 2017). Nesta direção, desde 2009 a Organização das Nações Unidas (ONU) aponta a necessidade de se intensificar e aprofundar pesquisas de tecnologias para conversão destes resíduos em recursos úteis à sociedade (UNEP, 2009).

Sabe-se que a partir de tecnologias verdes os resíduos de biomassa, tais como folhas, cascas, bagaço e galhos de produtos agrícolas, apresentam grande potencial para impulsionar a produção sustentável e gerar produtos químicos de alto valor agregado (DIDASKALOU *et al.*, 2017). Desta forma, o desenvolvimento de novos compostos a partir de resíduos agroindustriais, por meio de tecnologias verdes, é visto como uma forma não só de preservar os recursos ambientais, mas também como uma estratégia para agregar valor comercial aos resíduos que seriam normalmente descartados (LUQUE; CLARK, 2013; PFALTZGRAFF *et al.*, 2013; TUCK *et al.*, 2012).

No Brasil, este tema merece ainda mais destaque, pois o país abriga a maior diversidade vegetal do planeta, além de ser um dos maiores produtores agrícolas do mundo, inclusive de resíduos agrícolas. Uma exploração eficiente do solo brasileiro pode trazer, de forma sustentável, o máximo de divisas ao país por hectare de área cultivada. Sendo possível estabelecer um equilíbrio seguro entre a produção agrícola e a proteção ambiental (BOLZANI, 2016; COSTA; GUILHOTO; IMORI, 2013; SACCARO JUNIOR, 2011).

Contudo, dados recentes mostram que este equilíbrio não está sendo efetivamente perseguido no Brasil. Um exemplo desta situação diz respeito ao Cerrado, um *hotspot* mundial, considerado o bioma mais ameaçado no Brasil e no mundo (ICMBio, 2018; SCARIOT; SOUSA-SILVA; FELFILI, 2005; MITTERMEIER *et al.*, 1999). O baixo valor de mercado do hectare em regiões ocupadas por este bioma, aliado à tecnologia agrícola que foi desenvolvida para possibilitar cultivos nestas regiões, levaram a uma expansão das fronteiras agrícolas em sua direção, com subsequentes perdas de coberturas vegetais nativas e de espécies. Entretanto, o Cerrado ainda hospeda 4600 espécies endêmicas, que merecem ser preservadas (STRASSBURG *et al.*, 2017).

A *Caryocar brasiliense* Camb. (pequizeiro) é a espécie nativa do Cerrado de maior interesse econômico, constituindo-se numa importante fonte de rendimentos para algumas comunidades, pois seu fruto é usado na culinária regional, no preparo de pratos típicos, licores, doces e, principalmente, na extração de seu óleo (ROESLER *et al.*, 2008; ROESLER

et al., 2007; MEDAETS *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2006; POZO, 1997). As colheitas de frutos do pequi no Brasil em 2007 e 2016 representaram 5.363 e 17.305 toneladas de frutas, respectivamente (IBGE, 2016; IBGE, 2007). Esses dados não somente evidenciam a grande importância socioeconômica do pequi, mas também um fato real: caso providências não sejam tomadas em tempo, o esgotamento desta planta está previsto para um futuro próximo, pois a exploração econômica do pequizeiro é pautada no extrativismo (SANTOS *et al.*, 2013).

Dentro desse contexto, a realização de estudos de prospecção química e farmacológica do resíduo da polpa do pequi, obtido a partir da extração de seu óleo, visando o desenvolvimento de fitoprodutos, abre a possibilidade de uso dessa matéria-prima na fabricação de produtos de alto valor agregado, permitindo que a valorização econômica dessa espécie resulte no equilíbrio entre a sua produção agrícola e a proteção do meio ambiente.

Pelo acima exposto, fica evidente a importância de se investigar por meio de metodologias verdes os resíduos de culturas agrícolas e de manejos florestais no Brasil, como os decorrentes da exploração do pequizeiro, com vistas à identificação de compostos bioativos e desenvolvimento de bioprodutos, que apresentem valor científico e sejam capazes de promover o incremento econômico e social.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver metodologias analíticas verdes para identificar os metabólitos secundários presentes no extrato hidroetanólico da torta (resíduo) da polpa de *Caryocar brasiliense* Camb., a partir do resíduo obtido no processo de extração de seu óleo, e também no fitocosmético à base deste extrato. Ademais, objetivou-se conhecer o nível de toxicidade *in vitro* deste extrato e do fitocosmético, a fim de avaliar sua segurança.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil químico do extrato obtido da torta (resíduo) da polpa de *Caryocar brasiliense* Camb., e do fitocosmético à base deste extrato por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-DAD/UV);
- Identificar os metabólitos secundários presentes no extrato por meio da cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas de alta resolução (CLUE-QTOF-EM);

- Avaliar a citotoxicidade do extrato e do fitocosmético por meio de ensaios de toxicidade *in vitro* (atividade hemolítica e citotoxicidade em fibroblastos normais murinos (linhagem NIH/3T3) pelo método MTT).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi)

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae) é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, podendo ser encontrado, em seus fragmentos, desde Amazonas até São Paulo (SANTOS *et al.*, 2013; RIBEIRO, 2000; ALMEIDA; SILVA, 1994; PEIXOTO, 1973).

Também é considerada uma das plantas de maior interesse econômico deste bioma, por ser uma importante fonte de rendimento para algumas comunidades locais (MEDAETS *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2006; POZO, 1997). Entretanto, a atividade extrativista do fruto do pequi (pequi) aliada ao avanço da fronteira agrícola na forma de grandes lavouras de monocultura (CARRAZZA; D'ÁVILA, 2010), deve levar ao esgotamento desta planta em um futuro bem próximo, caso não seja desenvolvida uma cadeia de agregação de valor ao pequi (SANTOS *et al.*, 2013). Entre 1990 e 2008, o custo social da diminuição da população de pequizeiros, causado pelo desmatamento do bioma, foi estimado em R\$ 922 mil por ano, o equivalente a 48% dos benefícios gerados pela comercialização do pequi nesse período (ANGELO *et al.*, 2012).

Na culinária regional, a porção consumida do pequi (mesocarpo interno ou polpa) corresponde a apenas 8,5% do fruto, enquanto que a amêndoa, apenas 2,1%. Portanto, aproximadamente 90% da massa do pequi são descartadas durante o processamento da fruta. Já o pericarpo, formado pelo epicarpo cinza-esverdeado (casca) e pelo mesocarpo externo carnososo-couro (não comestível), consiste em 76% do fruto integral (VERA *et al.*, 2007). Aproximadamente 5.000 toneladas anuais de casca de pequi são geradas no Brasil (LEÃO, 2013).

O óleo do pequi, obtido por meio da prensagem de sua polpa, ou por extração em água quente, apresenta um maior valor agregado que o fruto fresco. Além disso, durante o processo de prensagem é gerada a torta do pequi, um resíduo que normalmente é descartado, mas que tem grande potencial para ser empregado no desenvolvimento de vários bioprodutos (SANTOS, 2014; SOUZA *et al.*, 2009; COUTO, 2007).

O pequi também é considerado uma Planta Alimentícia Não Convencional (PANC). O termo PANC foi cunhado por Kinupp e Lorenzi (2014) e é definido como “plantas que possuem uma ou mais das categorias de uso alimentício mesmo que não sejam comuns, não

sejam corriqueiras, não sejam do dia a dia da grande maioria da população de uma região”. Mesmo sendo encontrado em feiras e mercados e, pelo fato de alguns autores já terem avaliado seus aspectos nutricionais e culinários, o pequi também é considerado uma PANC no Brasil.

3.1.1. Composição química do pequi e seu resíduo

A polpa do pequi é rica em lipídios (33,4%), constituindo-se também em uma fonte importante de fibra alimentar (10,02%), de proteínas (3%) e de carboidratos (11,45%), em base úmida (LIMA *et al.*, 2007). Além disso, a polpa do pequi tem fontes consideráveis de manganês, zinco, cobre, magnésio, fósforo (concentração de 1,21% que atinge a ingestão diária necessária), sódio, ferro e cálcio (ALMEIDA; SILVA, 1994). O teor de vitamina B1 é semelhante ao do abacate, morango e papaia e o de vitamina B2 equivalente ao da gema do ovo (POZO, 1997; CARVALHO; BURGER, 1960). Já o teor de vitamina C é de 78,72 mg/100 g, superior à laranja (40,9 mg/100 g) e ao limão (26,4 mg/100 g) (SOUSA *et al.*, 2012; MARIANO-DA-SILVA *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 1998). A pectina também é encontrada em sua polpa (2,23%), apenas na parte comestível, sendo equivalente ao teor da laranja (2,36%) (ALMEIDA *et al.*, 1998). Também é rica em fenóis com propriedades antioxidantes. Inclusive, a quantidade de compostos fenólicos presentes na polpa do pequi (209 mg/100 g) é superior à grande maioria das polpas de frutos consumidos no Brasil (LIMA *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 1998). Dentre os compostos fenólicos presentes na polpa do pequi, foram identificados catequina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido elágico, ácido gálico, (LIMA *et al.*, 2007; LIMA, 2008; TORRES; SILVA; LIMA, 2016; CHISTÉ; MERCADANTE, 2012), ácido cumaroilquínico, glicosídeo de ácido elágico, ramnosídeo de ácido elágico e xilosídeo de ácido elágico (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012).

A torta da polpa do pequi (mesocarpo interno ou polpa), resíduo resultante da prensagem mecânica para obtenção de óleo comercial, apresentou um teor de lipídios (18,8-26%), proteínas (5,8-8,1%) e carboidratos mais fibras (50,1-61,5%), em base seca. Além disso, a torta mostrou teores de fenóis em torno de 59,3 mg/100 g (MAYER *et al.*, 2016).

O extrato hidroetanólico preparado a partir da torta da polpa do pequi (resíduo), obtida após a extração do óleo, possui altos teores de fenóis e flavonoides totais, sendo que o extrato apresentou em torno de 247,75 mg/g de EAC (miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de amostra) e 58,82 mg/g de EQ (miligrama equivalente à quercetina por grama de amostra), respectivamente (PEGORIN, 2017).

3.1.2. Uso popular do pequi

O óleo da polpa do pequi é utilizado na medicina popular para combater diversos tipos de afecções do sistema respiratório (bronquites, gripes e resfriados), para tratar processos inflamatórios e tumorais da pele, problemas oftalmológicos relacionados à deficiência de vitamina A (ROESLER *et al.*, 2007; ALMEIDA; SILVA, 1994) e queimaduras (VIEIRA; MARTINS, 2000), além do uso como tonificante.

Já as folhas do pequi são usadas na forma de decocto, contra gripes, resfriados, doenças inflamatórias, cicatrização de feridas, lesões gástricas, disfunções menstruais, tratamento de afecções oftalmológicas, hepáticas e até mesmo no controle de tumores (ROESLER *et al.*, 2008; LIMA, 2008; ROESLER *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2002; ALMEIDA; SILVA, 1994).

3.2. Química Verde

A Química Verde é definida como “o planejamento de produtos químicos e de processos que reduzem ou eliminam o uso e a geração de substâncias perigosas” (ANASTAS; WARNER, 1998). A partir desta abordagem, os químicos e engenheiros começam a projetar produtos e processos para que eles sejam lucrativos e, ao mesmo tempo, que minimizem os impactos negativos ao meio ambiente, pois estas não são opções mutuamente excludentes (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

3.2.1. A questão dos solventes

A diminuição e a substituição do uso de solventes potencialmente danosos por solventes menos problemáticos ao meio ambiente têm sido talvez a área mais ativa da Química Verde. Por solvente verde, entende-se aquele que não promove riscos à saúde do analista, proporciona segurança no manuseio e biodegradabilidade, além de respeitar o meio ambiente (LESELLIER; WEST, 2015).

Dentro deste contexto, processos sem o uso de solventes ou, quando necessários, com água pura, solventes naturais eutéticos profundos (NADES, do inglês *Natural Deep Eutectic Solvents*) ou com fluidos supercríticos (dióxido de carbono) são alguns exemplos dos novos meios líquidos e tecnologias utilizadas como alternativas frente aos solventes tradicionalmente empregados (SUTTON *et al.*, 2018; SANDRA *et al.*, 2010; ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002). A importância do uso das novas tecnologias talvez fique evidente quando se considera que em um processo de produção de um princípio ativo farmacêutico, aproximadamente 50% da massa no processo corresponde a solventes. Grande parte destes

solventes é tóxica, inflamável e/ou corrosiva, colaborando para intensificar a poluição da água, do ar e do solo, além dos riscos de exposição dos trabalhadores (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

3.2.2. Química Analítica Verde

Inicialmente, as técnicas analíticas foram usadas apenas para determinar o impacto ambiental dos processos em escala industrial, com o intuito de aprimorá-los, em muitos casos, ironicamente, a partir de métodos analíticos poluentes (ANASTAS; EGHBALI, 2010). Contudo, através da percepção de que as atividades humanas trazem impactos que se somam e são cumulativos, foi sendo construído o entendimento de que a Química Verde poderia e deveria ser aplicada independentemente da escala empregada. A partir deste entendimento não reducionista, concluiu-se que as técnicas analíticas em si também seriam um alvo importante para a aplicação de princípios de sustentabilidade. Assim, a Química Verde Analítica (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*) surge como uma tendência importante dentro da Química Verde, sendo considerada uma abordagem chave para passar do paradigma químico para o paradigma ecológico em química analítica. Existem resultados convincentes de que o GAC será extremamente útil nos próximos anos, pois levará à aplicação de procedimentos que combinem eficiência, sustentabilidade ambiental e econômica para análise em diferentes áreas (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

Como o termo sugere, a GAC centra-se na redução do impacto ambiental das metodologias analíticas. A preparação de amostras, que geralmente envolve múltiplas etapas, vem merecendo especial atenção neste debate, pois é identificada como a parte mais ambientalmente impactante em procedimentos analíticos. Além disso, ela é, na maioria das vezes, fundamental para a qualidade da análise em termos dos dados obtidos, ou seja, é ponto chave tanto para o desempenho ambiental como para a qualidade dos dados obtidos em uma metodologia analítica (TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2012).

Recentemente, os procedimentos de extração clássica (extração líquido-sólido - ELS, extração líquido-líquido - ELL e extração em fase sólida - EFS), que empregam grandes quantidades de solventes e auxiliares, muitas vezes nocivos ao meio ambiente ao qual o próprio analista é parte integrante, vêm sendo substituídos por técnicas miniaturizadas que reduzem, dentre outras, as quantidades destes produtos consumíveis; o número e o tamanho da amostra; o dispêndio de energia e os custos com tratamento de resíduos gerados no processo (FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017).

No entanto, o que mais vem sendo perseguido atualmente é a busca por metodologias que dispensem ou reduzam as etapas de preparação da amostra. Não por acaso, o princípio número 1 da GAC diz que: “a análise direta da amostra deve ser aplicada para evitar o tratamento da mesma” (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Um método atual que tem sido empregado é a extração *online* diretamente acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (OLE-LC, do inglês *Online Extraction Directly Coupled to High Performance Liquid Chromatography*). A partir desta nova configuração analítica otimizada, a extração de uma amostra sólida é diretamente acoplada à sua análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), minimizando ou até mesmo eliminando os procedimentos de tratamento de amostra (FERREIRA *et al.*, 2016).

A CLAE, por ser a técnica de separação mais utilizada mundialmente e por empregar solventes orgânicos como componentes da fase móvel, recebe destaque nesta discussão. Estima-se que, em 2017, análises por CLAE ao redor do mundo geraram de 26 a 52 milhões de litros de efluentes, sendo que estes devem ser tratados como resíduos por utilizarem solventes nocivos (SUTTON *et al.*, 2018). O foco principal para torná-las menos impactante vem sendo a redução do consumo de solventes e a substituição de solventes potencialmente danosos, como acetonitrila e metanol, por outros melhores classificados em guias de seleção de solventes (PRAT *et al.*, 2016; FRANCO, 2015).

A primeira estratégia vem sendo aplicada principalmente por meio da redução do sistema de separação (PŁOTKA *et al.*, 2013; SANDRA *et al.*, 2010; WELCH *et al.*, 2010). Há uma nova geração de colunas empacotadas com partículas sub-2- μm totalmente porosas ou com partículas sub-3- μm , de núcleo fundido, com alturas de seus pratos teóricos, em torno de 3,4 a 3,5 μm . Isso permite reduções nas dimensões da coluna e, indiretamente, na vazão da fase móvel e no tempo de análise sem perda (ou com aumento) na resolução (R_s) cromatográfica (PŁOTKA *et al.*, 2013; GRITTI; GUIOCHON, 2012). Com relação à segunda estratégia, diversos estudos têm sido relatados, dentre eles aqueles que testaram etanol como substituinte para metanol e acetona para acetonitrila (FUNARI *et al.*, 2014; FUNARI *et al.*, 2013). Além de apresentarem impactos ambientais muito menores do que metanol e acetonitrila, etanol e acetona são biodegradáveis e podem ser obtidos de fontes renováveis por meio de processos fermentativos (SANDRA *et al.*, 2010; WELCH *et al.*, 2010). Contudo, sabe-se que pelo menos 10% de solventes orgânicos, como acetonitrila ou metanol, ainda são utilizados na maioria das separações analíticas relatadas na literatura (SUTTON *et al.*, 2018).

3.2.3. Resíduos agroindustriais

A geração crescente de resíduos tem sido outro tema central em Química Verde, juntamente com o conceito de bioeconomia. Anualmente, são geradas aproximadamente 140 bilhões de toneladas de biomassa pela agricultura, que podem ser convertidas em diversos produtos ou que podem causar problemas quando não destinados corretamente (UNEP, 2009).

O termo Bioeconomia é definido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) como “aquela parte das atividades econômicas que capturam valor a partir de processos biológicos e biorrecursos para produzir saúde, crescimento e desenvolvimento sustentável” (OCDE, 2005). A biotecnologia aplicada à economia forma a bioeconomia, ou seja, a utilização da biotecnologia pode ser aplicada na diminuição dos custos de produção, substituindo produtos sintéticos por organismos mais seletivos e por produtos biodegradáveis e renováveis, para a criação de produtos na agricultura e na indústria (SOUSA *et al.*, 2016).

No Brasil, o segundo maior produtor agrícola do mundo, foram geradas cerca de 898 milhões de toneladas de resíduos agrícolas, agroindustriais e da silvicultura no ano de 2015, com uma projeção de aumento para 1.402 milhões de toneladas em 2030 (DE MORAES *et al.*, 2017).

Se convertidas em energia, as 140 bilhões de toneladas de biomassa/ano produziriam o equivalente a cerca de 50 bilhões de toneladas de petróleo em energia, podendo substituir parcialmente os combustíveis fósseis (UNEP, 2009). Essa prática já vem sendo empregada na agroindústria, como a produtora de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar (GOLDEMBERG, 2017). Entretanto, este uso é considerado de baixo valor agregado, bem como a conversão de resíduos agroindustriais em rações animais ou na produção de adubo.

Por outro lado, estes resíduos poderiam ser utilizados em cadeias avançadas de agregação de valor, tais como, no desenvolvimento de produtos químicos finos, farmacêuticos e cosméticos (ADSUL *et al.*, 2011).

A maioria dos bioprodutos atualmente comercializados no Brasil possui baixa complexidade tecnológica como frutos *in natura*, ou apenas secos e descascados, além do óleo vegetal. Sendo assim, é necessário o incremento científico e tecnológico para agregar valor e garantir maior qualidade final aos produtos oriundos dos resíduos (SOUSA *et al.*, 2016).

Alguns autores vêm empregando os resíduos agroindustriais para diversas finalidades, com o propósito de minimizar os problemas causados pelo destino incorreto dos mesmos. Castro *et al.* (2018) concluíram que o extrato do resíduo de sementes verdes de *Coffea arabica* L. apresenta grande potencial para ser utilizado como matéria-prima para

suplementos dietéticos, produtos cosméticos e farmacêuticos ou como fonte de compostos antioxidantes bioativos. Além disso, os resíduos também têm sido utilizados como substratos para a produção de enzimas hidrolíticas (amilases, pectinases) e na produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar (GONÇALVES, 2016; LAMOUNIER, 2018).

3.3. Fitocosméticos

Os fitocosméticos são um grupo de cosméticos elaborados a partir de produtos de origem vegetal. A partir deste conceito, surge a fitocosmética. Esta tem como objetivo estudar e aplicar conhecimentos dos princípios ativos extraídos de plantas em proveito da higiene, estética, da correção e da manutenção da pele (BORGES; GARVIL; ROSA, 2013). Recentemente, os produtos oriundos de plantas vêm sendo destaque em pesquisas que buscam utilizar os recursos naturais e renováveis de forma sustentável.

Tais produtos são bem aceitos pelos consumidores devido ao apelo para a conscientização da preservação dos recursos naturais, bem como a saúde ambiental e humana (LYRIO *et al.*, 2011).

Deste modo, a indústria cosmética está atravessando uma transformação significativa, na qual o desenvolvimento de produtos ecologicamente corretos e o uso de recursos provenientes da biodiversidade brasileira, como forma de garantir sua preservação e existência, estão sendo preconizados pelo mercado consumidor (SOUZA, 2015).

Um estudo feito por Pegorin (2017) avaliou a atividade antioxidante, pelo método do DPPH, do extrato hidroetanólico da torta da polpa de *Caryocar brasiliense* Camb., obtida após a extração do óleo, bem como de um fitocosmético, no qual este extrato foi adicionado à sua formulação. Foram obtidos valores de CE₅₀ (Concentração Efetiva 50%) de 807 µg/mL e 182 µg/mL para o extrato e fitocosmético, respectivamente. Estes resultados, quando comparados àqueles previamente reportados na literatura no mesmo tipo de ensaio, mostraram-se da mesma ordem. Roesler *et al.* (2007) encontraram CE₅₀ 298,75 µg/mL para o extrato etanólico da polpa associada a semente do pequi. Já Lima (2008), obteve valores de CE₅₀ de 260,4 µg/mL, 820,7 µg/mL e 14,3 µg/mL para extratos aquoso, alcoólico e fração de ácidos fenólicos livres da polpa do pequi, respectivamente. Por fim, Perez (2004) atingiu um CE₅₀ de 553 µg/mL para o extrato cetônico do mesocarpo interno mais endocarpo de frutos de pequi.

Quanto ao desenvolvimento de fitocosméticos no Brasil, o mercado mostra-se ainda mais promissor. Isto porque o Brasil detém a maior diversidade genética do mundo com

aproximadamente 55 mil espécies catalogadas, de um total estimado entre 350 a 550 mil. Apesar desse valioso patrimônio natural, a maioria das espécies de plantas utilizadas com fins medicinais é pouco estudada em relação aos seus constituintes químicos e potenciais farmacológicos. Estima-se que cerca de 5 a 7% do potencial medicinal das plantas já foram estudados cientificamente. Em todo o mundo, esse número aumenta para 17% (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; FONSECA, 2012).

4. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA

A Figura 1 apresenta um fluxograma com o planejamento experimental adotado neste trabalho. Inicialmente foi preparado o extrato hidroetanólico da torta da polpa de *Caryocar brasiliense* Camb., a partir do resíduo obtido no processo de extração de seu óleo, além do preparo do fitocosmético com incorporação deste extrato.

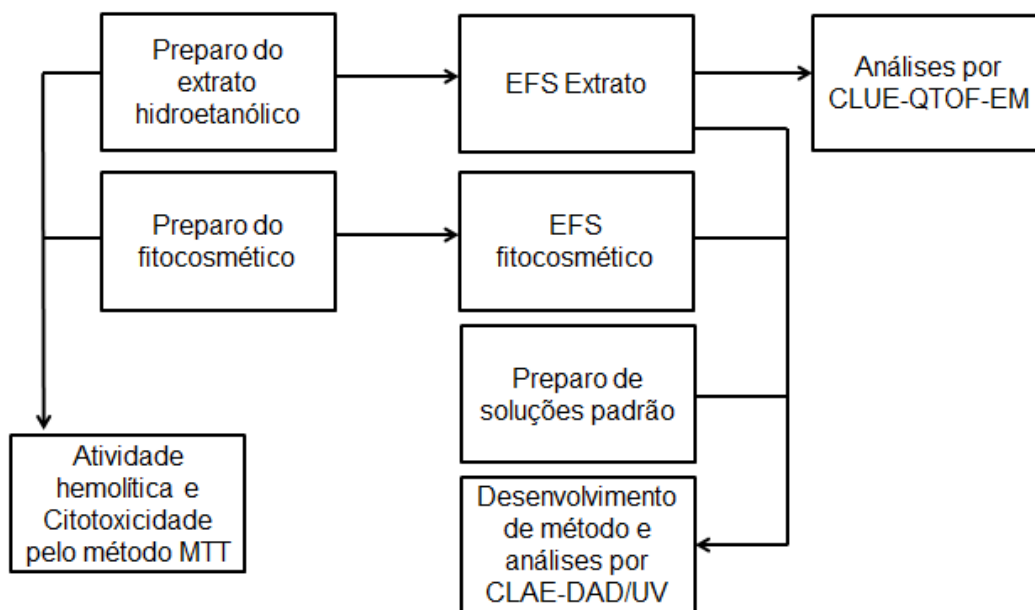
Em seguida, foi avaliada a toxicidade *in vitro* do extrato e do fitocosmético, empregando ensaios como atividade hemolítica e citotoxicidade em fibroblastos normais murinos (linhagem NIH/3T3) pelo método MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

Tanto o extrato quanto o fitocosmético foram submetidos a uma etapa de pré-tratamento por EFS com cartucho C18 (fase reversa). Soluções padrão foram preparadas a partir dos padrões analíticos ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido elágico na concentração de 0,5 mg/mL.

As frações do extrato foram empregadas no desenvolvimento de método cromatográfico em fase reversa utilizando CLAE-DAD (Detector de Arranjo de Diodos)/UV (Ultravioleta) para definição das condições cromatográficas e avaliação do perfil químico do extrato. Posteriormente, a fração do fitocosmético, bem como as soluções padrão foram analisadas a partir da melhor condição cromatográfica obtida.

Na etapa final, a condição cromatográfica em CLAE foi convertida em CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência) com detecção por EM (Espectrometria de Massas) de alta resolução para identificação dos metabólitos secundários presentes no extrato.

Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas.



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção do resíduo

Para o experimento de extração, foi utilizada a polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Os frutos foram obtidos no Município de Mirabela, Estado de Minas Gerais, com latitude 16° 15' 46" Sul, longitude 44° 09' 52" Oeste e altitude: 800 m.

O cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi realizado, cujo número é A23C398 (Anexo 1).

Estes foram lavados, descascados, embalados em sacos plásticos e estocados sob refrigeração (-18°C). Durante os experimentos, os frutos foram cortados manualmente, em pequenos pedaços de aproximadamente 2 x 2 cm. O processo de extração do óleo foi por prensagem da polpa a frio, utilizando uma mini prensa hidráulica (PH 10, Nowak, Brasil) sendo aplicada uma força de 0,5 ton/cm² durante 1 h. A torta resultante da prensagem da polpa, que era descartada, foi seca em estufa com circulação de ar a temperatura de 36°C até obtenção de massa constante.

5.2. Preparo do extrato do resíduo

O extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi foi preparado na proporção de 1:10 (p/v) (10 g em 100 mL) com etanol (EtOH): água (H₂O) destilada 7:3 (v/v). A mistura foi

submetida à agitação vigorosa por 30 min e depois permaneceu em maceração estática ao abrigo da luz por 3 dias. Após, o extrato resultante foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo e colocado na estufa durante 72 h a 36°C para eliminação completa dos solventes até obtenção de um peso constante.

5.3. Preparo do fitocosmético com incorporação do extrato do resíduo

Foi preparada uma emulsão não-iônica, cuja formulação foi desenvolvida anteriormente pela proponente, composta por duas fases, uma oleosa e outra aquosa. O extrato obtido foi inserido na fase aquosa da formulação numa concentração de 10% (p/p). Foram utilizados conservantes usualmente empregados no Brasil (IHA *et al.*, 2008), adequados para bases e ativos cosméticos. A composição de cada fase encontra-se descrita abaixo:

Fase A (Oleosa): Óleo mineral (agente emoliente) - 2%; Tween 80 (agente emulsificante) - 2,5%; Polawax 400 (agente emulsificante) - 10%; Parabenos (conservante) - 0,5%.

Fase B (Aquosa): Carbopol (agente viscoso) - 0,5%; Glicerina (umectante) - 4%; Água destilada (veículo) - 80,5% (quantidade para 100 g).

Para o preparo da formulação, os componentes das fases aquosa e oleosa foram pesados e aquecidos até 80°C. Em seguida, a fase aquosa foi vertida vagarosamente sobre a fase oleosa e a mistura foi emulsionada sob agitação na mesma temperatura por aproximadamente 10 min até arrefecimento (20-25°C) (RODRIGUES, 2013; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

5.4. Avaliação da toxicidade *in vitro*

5.4.1. Teste da Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi investigada de acordo com Onuma *et al.* (1999) e em conformidade com a norma da International Standard Organization 10993 parte 4 (ISO, 2017), através do contato direto utilizando-se 4 mL de sangue de carneiro comercial com EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante (tubo de EDTA VACUETTE® 4 ml EDTA Aprotinina 13x75 tampa rosa-anel preto, PREMIUM, Greiner Bio-One International).

Em seguida, esse sangue foi lavado 3 vezes com solução salina 0,9% (p/v), a 2500 rpm por 10 min, descartando-se o sobrenadante. A solução de hemácias foi ajustada para uma concentração de 4% (v/v).

Os microtubos contendo apenas solução salina 0,9% (p/v) foram usados como controle negativo zero de hemólise (0%). Para atingir 100% de hemólise (controle positivo), foi utilizada uma solução de Tween 80 a 2% (v/v) em solução salina 0,9% (p/v). Além disso, foram testadas diferentes concentração do extrato (15,6 a 250 µg/mL), do creme base (62,5 a 250 µg/mL) e do creme com extrato (fitocósmético) (62,5 a 250 µg/mL) diluídas em solução salina 0,9% (p/v).

O teste consistiu no contato direto de 500 µL das amostras (extrato, creme base e creme com extrato) com 500 µL da solução de hemácias a 4% (v/v) em solução salina 0,9% (p/v). Após a incubação dos microtubos a 37°C durante 1 h, estes foram centrifugados a 2500 rpm por 10 min. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram pipetadas para microplacas de 96 poços e a absorbância a 540 nm foi determinada usando um leitor de microplacas (PowerWave Epoch2, BioTek Instruments, EUA).

A taxa de hemólise foi calculada a partir da equação abaixo, sendo que até 5% de hemólise foi considerado como não hemolítico.

$$TH(\%) = \frac{(A_A - A_{CN})}{(A_{CP} - A_{CN})} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: TH é a taxa de hemólise das hemácias (%); A_A é a absorbância das amostras; A_{CN} é a absorbância do controle negativo; e A_{CP} é a absorbância do controle positivo, todos a 540 nm.

5.4.2. Teste de Citotoxicidade pelo método MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

Esse teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações (TSUBOY *et al.*, 2010).

As células de fibroblastos normais murinos (linhagem NIH/3T3) foram cultivadas em frascos de cultura estéreis em meio de cultivo DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 1% de antibiótico/antimicótico e 3 g/L de glicose, incubado a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Ao atingirem confluência de 60-80%, as células foram dissociadas com tripsina-EDTA, ressuspensas em meio completo e contadas em câmara de Neubauer.

Este ensaio consistiu no plaqueamento das células de fibroblastos normais murinos numa densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços. As placas de cultura foram então incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C com umidade de 85%. Após uma confluência de aproximadamente 75% (durante a noite), estas células foram expostas a concentrações

diferentes do extrato, do creme base e do creme com extrato (fitocosmético) por 24, 48 e 72 h, sendo 100 µL o volume final de cada poço.

Foram testadas concentrações diferentes do extrato (625 a 20000 µg/mL e 15,6 a 250 µg/mL) e do creme com extrato (15,6 a 250 µg/mL) diluído em meio de cultura completo, além do controle negativo (apenas meio de cultura), do positivo (Tween 80 2% (v/v)) e do controle da formulação com o creme base (creme sem adição do extrato). Os tempos de tratamento escolhidos foram de 24, 48 e 72 h.

Decorrido os tempos de tratamento, o meio foi retirado e foi adicionado 100 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL (CAS 298-93-1, Sigma Aldrich; 5 mg de MTT e 10 mL de meio de cultura sem soro) em cada um dos poços, sendo a placa incubada por 4 h a 37°C, 5% CO₂. Após este período, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada um dos poços para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (PowerWave Epoch2, BioTek Instruments, EUA) a 570 nm.

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (HUANG; SHANG; ZHEN, 2005):

$$VC (\%) = \frac{A_A}{A_{CN}} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: VC é viabilidade celular (%); A_A é a absorbância das amostras; A_{CN} é a absorbância do controle negativo, todos a 570 nm.

O valor de CI₅₀ (Concentração que inibe 50% da viabilidade celular) foi calculado através da regressão não linear utilizando o *software* Graphpad Prism® versão 8.

5.5. Pré-tratamento por extração em fase sólida (EFS) para análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM)

5.5.1. EFS com o extrato do resíduo

Condição 1: A fase estacionária, cartucho C18 500 mg/6 mL (Applied Separations Spe-ed®), foi inicialmente ativada com 8 mL de EtOH, seguida de equilíbrio com 8 mL da solução EtOH:H₂O 85:15 (v/v). Em seguida, foi carregada com 50 mg do extrato solubilizado em 1 mL da solução de equilíbrio. A eluição foi realizada com 4 mL de EtOH:H₂O 85:15 (v/v), permitindo a coleta da fração FA1. Para obtenção da fração FA2 foram eluídos 5 mL de EtOH.

Condição 2: A fase estacionária, cartucho C18 500 mg/6 mL (Applied Separations Spe-ed®), foi inicialmente ativada com 8 mL de MeOH (metanol), seguida de equilíbrio com 8 mL da solução MeOH:H₂O 5:95 (v/v). Em seguida, foi carregada com 50 mg do extrato solubilizado em 1 mL da solução de equilíbrio. A eluição foi realizada com 1 mL de MeOH:H₂O 5:95 (v/v), permitindo a coleta da fração FB1. Posteriormente, mais 3 mL de MeOH:H₂O 5:95 (v/v) foram utilizados para eluir e coletar a fração FB2. Para obtenção da fração FB3 foram eluídos 5 mL de MeOH:H₂O 95:5 (v/v) e para a fração FB4 5 mL de MeOH.

Condição 3: A fase estacionária, cartucho C18 500 mg/6 mL (Applied Separations Spe-ed®), foi inicialmente ativada com 8 mL de EtOH, seguida de equilíbrio com 8 mL de H₂O. Em seguida, foi carregada com 50 mg do extrato solubilizado em 0,5 mL da solução de equilíbrio. A eluição foi realizada com 0,5 mL de H₂O, permitindo a coleta da fração FD1. Posteriormente, mais 2 mL de H₂O foram utilizados para eluir e coletar as frações FD2 e FD3, 1 mL cada. Para obtenção da fração FD4 foram eluídos 3 mL de EtOH:H₂O 70:30 (v/v). A fração FD5 foi eluída com 3 mL de EtOH:H₂O 85:15 (v/v) e a fração FD6 com 3 mL de EtOH.

Condição 4: A fase estacionária, cartucho C18 500 mg/6 mL (Applied Separations Spe-ed®), foi inicialmente ativada com 8 mL de EtOH, seguida de equilíbrio com 8 mL de H₂O. Em seguida, foi carregada com 50 mg do extrato solubilizado em 0,5 mL da solução de equilíbrio. A eluição foi realizada com 0,5 mL de H₂O, permitindo a coleta da fração FE1. Posteriormente, 4 mL de EtOH:H₂O 70:30 (v/v) foram utilizados para eluir e coletar a fração FE2. E, por fim, foram eluídos 5 mL de EtOH, coletando a fração FE3.

Os eluatos (frações) coletados foram secos em capela sob vazão de ar. Depois de secas, as frações foram solubilizadas em 1 mL da proporção inicial da fase móvel utilizada e filtradas em membrana de Nylon de diâmetro 13 mm e diâmetro do poro 0,22 µm.

5.5.2. EFS com o fitocosmético preparado

Para o fitocosmético, pelo fato de apresentar substâncias de carácter lipofílico em sua composição, o pré-tratamento inadequado pode fazer com que as substâncias fiquem fortemente aderidas na coluna cromatográfica de sílica de fase reversa (C18), danificando a mesma. Sendo assim, a partir da condição 4 utilizada com o extrato, fez-se uma adaptação.

A fase estacionária, cartucho C18 500 mg/6 mL (Applied Separations Spe-ed®), foi inicialmente ativada com 8 mL de EtOH, seguida de equilíbrio com 8 mL de EtOH:H₂O 70:30 (v/v). Em seguida, foi carregada com 30 mg do fitocosmético solubilizado em 1 mL da

solução de equilíbrio. A eluição foi realizada com 4 mL de EtOH:H₂O 70:30 (v/v), permitindo a coleta da fração C1. Para obtenção da fração C2 foram eluídos 5 mL de EtOH.

As frações coletadas foram secas em capela sob vazão de ar. Depois de secas, a fração C1 foi solubilizada em 0,5 mL da proporção inicial da fase móvel utilizada e filtrada em membrana de Nylon de diâmetro 13 mm e diâmetro do poro 0,22 µm.

5.5.3. Preparo de soluções padrão

Os padrões analíticos ácido gálico, clorogênico, cafeico e elágico (grau cromatográfico) foram preparados na concentração de 0,5 mg/mL.

Os ácidos gálico, clorogênico e cafeico foram solubilizados em MeOH:H₂O 15:85 (v/v), enquanto que o ácido elágico foi solubilizado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M.

Todas as soluções padrão foram filtradas em membrana PVDF (floureto de polivinilideno) hidrofílico de diâmetro 13 mm e diâmetro do poro 0,22 µm.

5.6. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM)

A partir das frações preparadas, um método CLAE-DAD/UV foi desenvolvido através de várias análises empiricamente. Solventes para as fases móveis foram selecionados em guias para a seleção de solventes verdes (PRAT *et al.*, 2016).

Foi utilizada a abordagem recomendada para o desenvolvimento de método em fase reversa descrita por Snyder, Kirkland e Dolan (2010), realizando as seguintes modificações: 1) ajustar na % de solvente orgânico ou a força de eluição (ϵ) e, conseqüentemente o fator de retenção (k); 2) ajustar a seletividade (α), alterar o solvente orgânico, o tipo de coluna ou a temperatura; e 3) otimizar as condições da coluna (comprimento, tamanho de partícula e vazão). A ordem de prioridade utilizada foi de 1 para 3, seguindo uma sequência de otimização.

Foram utilizados três Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência (CLAE) e um de Ultra Eficiência (CLUE):

CLAE (1) Perkin Elmer Flexar®: bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne® de 6 pórticos com alça de amostragem de 20 µL, detector DAD, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromera® 4.1.0.6386;

CLAE (2) Thermo Scientific® Ultimate 3000: bomba binária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne de 6 pórticos com alça de amostragem de 20 µL, detector UV/Vis

de λ (comprimento de onda) variável UltiMate 3000 VWD, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromeleon® CDS 6x;

CLAE (3) Shimadzu® Nexera XR (LC-20AD XR): bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne® de 6 pórticos com alça de amostragem de 20 μ L, forno de coluna (CTO-20A), detector DAD (SPD-M20A), programa gerenciador do cromatógrafo e de dados LabSolutions.

CLUE Waters® Acquity (UPLC HCLASS): bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático FTN, detector DAD e G2XS QTOF (do inglês, *Quadruple Time of Flight*) (Xevo), fonte de ionização ESI (do inglês, *Eletrospray*) (Zspray™), programa gerenciador do cromatógrafo e de dados MassLynx® versão 4.1.

Inicialmente, foi empregada uma coluna C18 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis® Express) e como fase móvel, EtOH grau cromatográfico e H₂O ultrapura.

Depois, foi empregada a coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis®), com as mesmas propriedades da coluna anterior, mudando apenas o comprimento, e como fase móvel, EtOH ou MeOH e H₂O ultrapura.

Foi realizada uma análise por gradiente exploratório durante 30 min, variando a porcentagem do solvente orgânico (EtOH ou MeOH) de 5% até 100%, obtendo o perfil cromatográfico da amostra. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min e 1,0 mL/min para EtOH e MeOH, respectivamente e foram injetados 20 μ L da fração FA1 (48,2 mg/mL e 50,7 mg/mL) usando o CLAE 1 (Perkin), com detecção entre λ 230-300 nm.

Em seguida foram testadas várias condições cromatográficas (Quadro 1) utilizando o sistema CLAE-DAD/UV com o propósito de desenvolver um método cromatográfico que possibilitasse uma adequada Rs dos picos ($R_s > 1,25$), utilizando a fração FA1.

Quadro 1. Condições cromatográficas testadas em CLAE para as frações FA1, FD1, FD2, FD4 e FE2.

Fração	Condição	Ácido	Coluna ¹	Fase móvel	Vazão (mL/min)	λ (nm)	Volume de injeção (μ L)	Cromat. líquido
FA1	5	sem	A	EtOH 6% para 38% em 20 min; EtOH 38% para 82% em 10 min; EtOH 82% para 85% em 20 min; EtOH 85%	0,8	280	20 (48,2 mg/mL)	CLAE 2

				para 100% em 1 min; EtOH 100% em 10 min				
FA1	7	sem	A	EtOH 5% para 35% em 20 min; EtOH 35% para 82% em 10 min; EtOH 82% para 86% em 20 min; EtOH 86% para 100% em 1 min; EtOH 100% em 10 min	0,8	280	20 (48,2 mg/mL)	CLAE 2
FA1	8	sem	A	EtOH 3% para 35% em 20 min; EtOH 35% para 84% em 5 min; EtOH 84% em 15 min; EtOH 84% para 100% em 1 min; EtOH 100% em 4 min	0,8	280	20 (48,2 mg/mL)	CLAE 2
FA1	12	sem	A	MeOH 5% em 15 min; MeOH 5% para 17% em 10 min; MeOH 17% para 100% em 25 min	1,0	280	20 (50,7 mg/mL)	CLAE 2
FA1	15	sem	A	MeOH 5% em 15 min; MeOH 5% para 18% em 10 min; MeOH 18% para 98% em 25 min	1,0	280	20 (50,7 mg/mL)	CLAE 2
FA1	16	sem	A	MeOH 5% em 15 min; MeOH 5% para 19% em 10 min;	1,0	280	20 (50,7 mg/mL)	CLAE 1

				MeOH 19% para 96% em 25 min				
FD1, FD2, FD4	1	sem	B	MeOH 0% para 5% em 15 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min	1,0	254	20 (12,7; 10 e 9,6 mg/mL)	CLAE 2
FE2	2	sem	B	MeOH 0% em 10 min; MeOH 0% para 5% em 10 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min	1,0	254	20 (20 mg/mL)	CLAE 2
FE2	1	sem	C	MeOH 5% em 10 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min	1,0	254	20 (20 mg/mL)	CLAE 2
FE2	2	com 0,1% de ácido fórmico	B	MeOH 0% em 10 min; MeOH 0% para 5% em 10 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min	1,0	254	20 (20 mg/mL)	CLAE 2
FE2	5	com	B	MeOH 0%	1,0	254	20	CLAE 2

		0,1% de ácido fórmico		em 10 min; MeOH 0% para 3% em 10 min; MeOH 3% para 18% em 10 min; MeOH 18% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min			(20 mg/mL)	
FE2	6	com 0,1% de ácido fórmico	B	MeOH 0% em 10 min; MeOH 0% para 2% em 10 min; MeOH 2% para 17% em 10 min; MeOH 17% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min	1,0	254	20 (20 mg/mL)	CLAE 2
FE2	7	com 0,1% de ácido fórmico	B	MeOH 0% em 10 min; MeOH 0% para 3% em 10 min; MeOH 3% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min	1,0	254	20 (20 mg/mL)	CLAE 2 CLAE 4

Quadro 1. (final)

¹Colunas cromatográficas: **A:** Ascentis® C18 250 x 4,6 mm x 5 µm; **B:** Phenomenex® Synergi C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm; **C:** NST® fenil 250 x 4,0 mm x 5 µm.

Posteriormente, uma coluna de fase reversa C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®, Synergi) foi utilizada para aumentar o k dos picos iniciais, próximos ao tempo morto (t_M). A condição cromatográfica 16 já citada foi adaptada para utilizar a coluna C18 Hydro, empregando 100% de H₂O ultrapura como fase móvel inicial.

As frações FD1, FD2 e FD4 foram analisadas na coluna C18 Hydro a fim verificar o perfil químico destas frações obtidas na condição 3 de EFS.

A partir destas análises, a fração FE2 obtida na condição 4 de EFS foi utilizada para aperfeiçoar a condição cromatográfica 16 já desenvolvida anteriormente (Quadro 1).

A coluna fenil 250 x 4,0 mm x 5 μm (NST®) também foi empregada utilizando-se a fração FE2 (Condição 1) para verificar qual fase estacionária seria mais adequada para separação das substâncias presentes no extrato do resíduo da polpa do pequi (Quadro 1).

Por fim, a melhor condição obtida usando a coluna C18 Hydro com H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e MeOH foi a condição 7. Essa mesma condição foi testada no equipamento CLAE 4 (Shimadzu) para obtenção dos espectros no UV das substâncias.

O fitocosmético (creme contendo 10% do extrato) foi analisado a partir da fração C1 utilizando a condição cromatográfica 7, já empregada com a fração FE2.

As soluções padrão preparadas anteriormente também foram analisadas nesta mesma condição, sendo analisadas separadamente e em associação (coinjeção) com a fração FE2 (100 μL da fração: 10 μL do padrão). O volume de injeção foi de 20 μL .

Por fim, a melhor condição usando a coluna C18 Hydro foi convertida para um sistema CLUE usando o *software* LCAP desenvolvido por Guillaume, Nguyen, Rudaz e Veuthey (Universidade de Geneva). A coluna CLUE C18 100 x 2,1 mm x 1,8 μm (Acquity Waters®) foi utilizada para a conversão, obtendo-se a seguinte condição com MeOH e H₂O acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico: MeOH 5% em 4,5 min, MeOH 5% para 20% em 1,8 min, MeOH 20% para 100% em 5,4 min e MeOH 100% em 1 min, vazão 0,4 mL/min e volume de injeção 1 μL . Esta condição foi testada no sistema CLUE-QTOF (Waters®) nos modos positivo e negativo, na faixa de 50 a 1200 Da. As condições do ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 3000 V, tensão do cone 30 V, temperatura da fonte 100°C, temperatura de desolvatação 650°C, vazão de gás cone 50 L/h, vazão de gás de desolvatação 800 L/h, e tensão do detector MCP (Placa de microcanais) 2275 V. Os dados foram processados usando o programa MassLynx®, versão 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA).

Todas as fórmulas moleculares possíveis foram extraídas (elementos C, H, N, O, tolerância de 15 ppm, pelo menos 2 carbonos) com a ferramenta de Composição Elemental de MassLynx®. As fórmulas extraídas foram corrigidas pela adição de um hidrogênio (no modo negativo) e pela subtração de um hidrogênio (no modo positivo). As massas dos íons

moleculares e as respectivas fórmulas moleculares extraídas foram utilizadas para identificação tentativa das substâncias.

5.7. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados dos ensaios de toxicidade foram realizadas por meio do *software* estatístico BioEstat 5.3 usando análise de variância (ANOVA) um critério, seguido de pós-teste de Tukey e o *software* Graphpad Prism® versão 8, para cálculo do valor de CI₅₀. Foi considerado nível de significância de 5% (*p*-valor menor que 0,05).

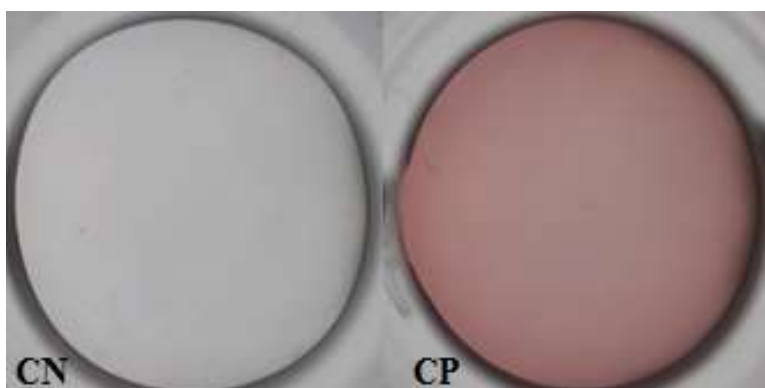
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação da toxicidade *in vitro*

6.1.1. Teste da Atividade Hemolítica

Por meio deste teste é possível avaliar a capacidade da amostra que está sendo analisada em romper a membrana das células sanguíneas de carneiro, e assim, estabelecer uma relação direta entre o dano promovido na membrana celular das hemácias com a atividade citotóxica. Desta forma, a fim de validar o método, inicialmente foi confirmada a capacidade dos controles negativo (solução salina 0,9%, p/v) e positivo (Tween 80 2%, v/v) de promoverem 0% e 100% de hemólise, respectivamente, após leitura da absorbância e cálculo da taxa de hemólise (Fig. 2).

Figura 2. Poços de microplacas representando o controle negativo (CN) com 0% de hemólise e o controle positivo (CP) com 100% de hemólise.



Após a validação do método, a atividade citotóxica do extrato e do fitocosmético (creme com extrato) foi determinada. A solução salina 0,9% e o Tween 80 2% foram usados

respectivamente como controles negativo e positivo para o ensaio. Como controle da formulação foi utilizado o creme base.

A Tabela 1 mostra que para o extrato, apenas a concentração de 250 µg/mL foi considerada tóxica (99% hemólise), pois esta causou lise das hemácias de carneiro, tal qual foi promovida pelo controle positivo (100% hemólise). Já o creme base e o fitocosmético, em todas as concentrações analisadas, não causaram hemólise.

Tabela 1. Taxa de hemólise promovida pelo controle positivo (CP), controle negativo (CN), creme base (CB), extrato (E) e creme com extrato (CE) em diferentes concentrações.

Tratamentos (µg/mL)	Taxa de hemólise (%)
CP	100 *
CN	0
CB1 - Creme base 250 µg/mL	0
CB2 - Creme base 125 µg/mL	0
CB3 - Creme base 62,5 µg/mL	0
E1 - Extrato 250 µg/mL	99 *
E2 - Extrato 125 µg/mL	0
E3 - Extrato 62,5 µg/mL	0
E4 - Extrato 31,2 µg/mL	0
E5 - Extrato 15,6 µg/mL	0
CE1 - Creme com Extrato 250 µg/mL	0
CE 2- Creme com Extrato 125 µg/mL	0
CE3 - Creme com Extrato 62,5 µg/mL	0

ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey. O asterisco (*) indica se existiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

O teste da atividade hemolítica tem sido empregado com o propósito de avaliar o efeito tóxico dos extratos vegetais sobre as células do sangue (hemácias), mais precisamente analisar se houve algum dano (rompimento) na membrana celular. Desta forma, existem muitos estudos descritos na literatura que se utilizaram deste ensaio para demonstrar a toxicidade dos extratos vegetais. Carvalho, Oliveira e Valério (2012) não constatou atividade hemolítica do extrato metanólico de aroeira-preta (*Myracrodrun urundeuva*) nas concentrações de 1,56 a 50 mg/mL. Horst (2018) verificou altas taxas de hemólise (acima de 23%) no extrato bruto e nas frações com hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas de *Chusquea pinifolia* (bambuzinho) nas concentrações de 500, 800 e 100 µg/mL. Dalgê (2014) mostrou que extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) nas concentrações de 56,6, 113 e 566 µg/mL não foi capaz de induzir a hemólise. Da Costa (2015) demonstrou que o extrato etanólico de barbatimão (*Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.) em concentrações entre 100 a 500 mg/mL causam uma taxa de hemólise entre 10 a 15%. Comparando com os resultados obtidos, o extrato hidroetanólico da torta do pequi pode ser considerado não

citotóxico a partir de concentrações iguais ou inferiores a 125 µg/mL, mostrando-se mais seguro que alguns extratos vegetais citados (*Chusquea pinifolia* e *Ouratea hexasperma*). Com relação ao creme base e creme com extrato, estes se mostraram não citotóxicos em nenhuma das concentrações analisadas, sugerindo que a formulação a base do extrato pode ser empregada como um fitocosmético (CHORILLI *et al.*, 2007).

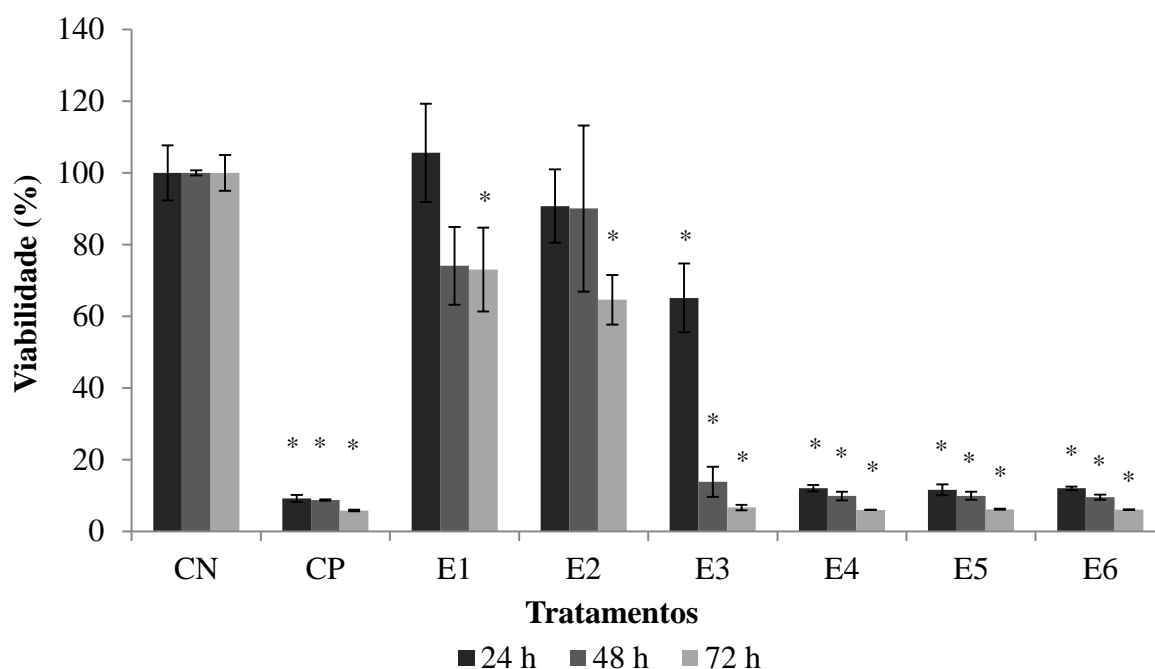
6.1.2. Teste de Citotoxicidade pelo método MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

O teste de citotoxicidade pelo método MTT foi realizado para avaliar a capacidade do extrato, bem como da formulação à base deste extrato, em reduzir a viabilidade da linhagem celular de fibroblastos (3T3). Para isso, inicialmente, a fim de avaliar a citotoxicidade do extrato e calcular o valor de CI_{50} , foram analisadas as concentrações de 625 a 20000 µg/mL sobre a viabilidade celular e o efeito do extrato foi comparado aos do controle negativo (apenas meio de cultura) e do controle positivo (Tween 80 2% (v/v)) em cada um dos tempos de tratamento.

Na Figura 3 fica evidente que, em 24 h de tratamento, as concentrações de 2500 a 20000 µg/mL foram tóxicas para os fibroblastos, pois a viabilidade celular foi estatisticamente menor que o controle negativo. Apenas as concentrações de 625 e 1250 µg/mL em 24 h foram semelhantes ao controle negativo. Em 48 h, as mesmas concentrações, de 2500 a 20000 µg/mL, apresentaram uma viabilidade celular abaixo de 14%, semelhante ao controle positivo. Entretanto, em 72 h, todas as concentrações analisadas apresentaram uma viabilidade inferior ao controle negativo.

A partir desta análise foi possível estabelecer os valores de CI_{50} para os três tempos de tratamento. Os valores obtidos foram 2,741 mg/mL (24 h), 2,237 mg/mL (48 h) e 1,427 mg/mL (72 h). De acordo com os parâmetros utilizados por Amaral (2014, p. 96) para classificar o grau de toxicidade, em todos os tempos de tratamento (24, 48 e 72 h), o extrato apresentou uma citotoxicidade considerada pouco importante, pois os valores de CI_{50} obtidos confirmaram que as concentrações analisadas foram capazes de reduzir a viabilidade celular em 50%.

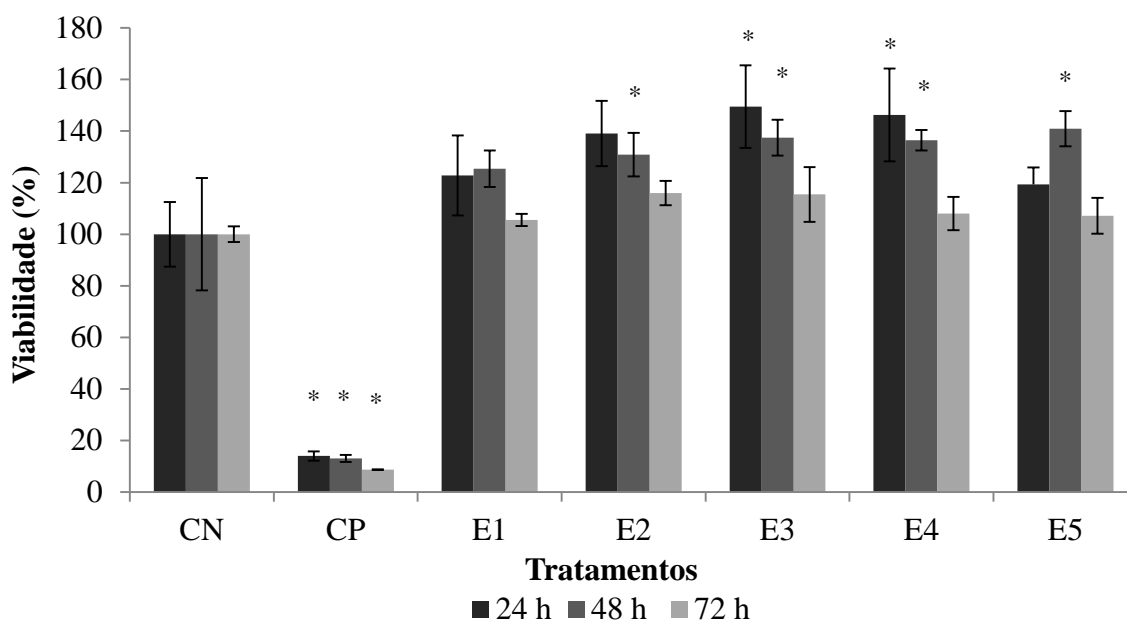
Figura 3. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com controle negativo (CN), controle positivo (CP) e extrato (E) por 24, 48 e 72 h nas diferentes concentrações (1- 625 µg/mL; 2- 1250 µg/mL; 3- 2500 µg/mL; 4- 5000 µg/mL; 5- 10000 µg/mL; 6- 20000 µg/mL).



ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey. O asterisco (*) indica se existiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

Posteriormente, menores concentrações com o extrato foram avaliadas (15,6 a 250 µg/mL). Como resultado, por meio da Figura 4, pode-se observar que, em 24 h de tratamento, as concentrações de 125 e 62,5 µg/mL (E4 e E3) do extrato apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo, aumentando a taxa de viabilidade dos fibroblastos. Em 48 h, apenas a primeira concentração (E1 - 15,6 µg/mL) não aumentou de forma significativa a viabilidade celular, e em 72 h, todas as concentrações do extrato promoveram uma viabilidade celular estatisticamente semelhante ao do controle negativo. De forma contrária, o grupo controle positivo prejudicou de forma significativa a viabilidade celular dos fibroblastos em relação ao grupo controle negativo. Os resultados obtidos nesta análise permitiram determinar que o extrato apresentou uma citotoxicidade a ser desconsiderada, uma vez que o valor de CI_{50} , determinada por extrapolação linear, foi superior a 50%, mostrando que nenhuma das concentrações analisadas foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%.

Figura 4. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com controle negativo (CN), controle positivo (CP) e extrato (E) por 24, 48 e 72 h nas diferentes concentrações (1 - 15,6 µg/mL; 2 - 31,2 µg/mL; 3 - 62,5 µg/mL; 4 - 125 µg/mL; 5 - 250 µg/mL).



ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey. O asterisco (*) indica se existiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

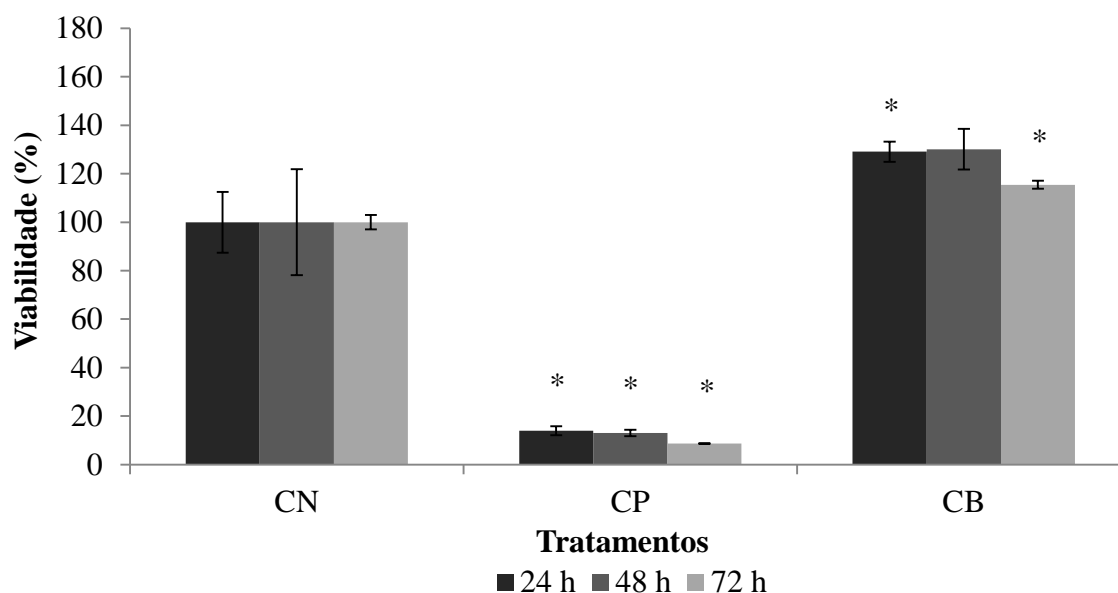
Por meio da literatura, é possível observar que o teste de citotoxicidade pelo método MTT também tem sido amplamente empregado na avaliação da toxicidade de extratos vegetais. Nesta direção, Moreira (2013) analisou a ação citotóxica do extrato etanólico da folha de *Eugenia dysenterica* DC. (cagaita) em fibroblastos (3T3) nas concentrações de 12,5 a 300 µg/mL durante 48 h, sendo que as concentrações de 50, 100, 150 e 300 µg/mL foram tóxicas (viabilidade em torno de 98, 73, 55 e 15%, respectivamente). De Lima (2016) constatou que o extrato bruto cetônico e a fração com clorofórmio de folhas de *Myrciaria ferruginea* O. Berg (cambuí-vermelho ou cambucá) apresentaram viabilidade inferior a 65% nas concentrações de 15,625 a 500 µg/mL em 24 h. Já para a fração com hexano, a viabilidade variou de 80 a 20% nas concentrações de 15,625 a 500 µg/mL, enquanto que a fração hidroalcoólica teve um valor de viabilidade em torno de 80% nas concentrações de 31,25 a 500 µg/mL e 100% em 15,625 µg/mL também em 24 h. De Assis (2015) avaliou o efeito tóxico do extrato hidroetanólico dos frutos de *Genipa americana* L. (jenipapo) em fibroblastos (3T3) nas concentrações de 1 a 10000 µg/mL durante 24 h. Notou-se que houve um crescimento celular somente nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL (67%, 65% e 73%, respectivamente). Relacionando os resultados obtidos neste estudo com os relatados na

literatura, o uso do extrato do pequi pode ser indicado em uma formulação cosmética, uma vez que é necessária uma concentração elevada para promover a toxicidade.

Sabe-se que os componentes utilizados na formulação cosmética já tem seu uso aprovado por uma agência regulamentadora como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Mesmo assim, em uma etapa posterior, a toxicidade do creme base, formulação sem adição do extrato, foi analisada. Para isso, o efeito do creme base sobre a viabilidade celular foi comparado aos promovidos pelos controles negativo e positivo. Na Figura 5, pode-se observar que, em 24 h de tratamento, o creme base apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, mostrando um valor maior de viabilidade dos fibroblastos. Em 48 h, a viabilidade mostrou-se estatisticamente igual ao controle negativo, e em 72 h, teve um valor maior de viabilidade. Por outro lado, o grupo controle positivo prejudicou de forma significativa a viabilidade celular dos fibroblastos em relação ao grupo controle negativo.

Os resultados obtidos comprovam que a formulação base do ficosmético não é citotóxica para esta linhagem de fibroblastos, confirmando a não toxicidade dos componentes da formulação cosmética.

Figura 5. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com controle negativo (CN), controle positivo (CP) e creme base (CB) por 24, 48 e 72 h.

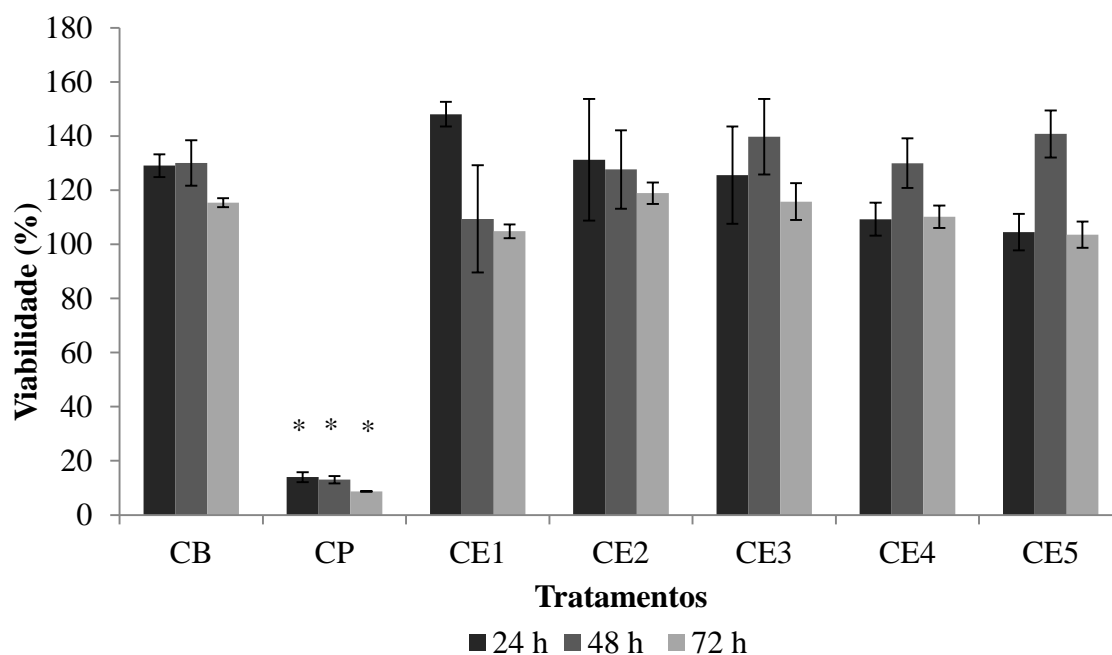


ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey. O asterisco (*) indica se existiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

A partir da constatação da ausência de toxicidade do creme base, este foi utilizado como um parâmetro de comparação para a compreensão do efeito tóxico do extrato na formulação.

Na Figura 6, pode-se observar que, em 24, 48 e 72 h de tratamento, todas as concentrações do creme com extrato apresentaram uma viabilidade estatisticamente igual ao creme base. Em contrapartida, o grupo controle positivo prejudicou de forma significativa a viabilidade celular dos fibroblastos em relação ao grupo controle negativo. Sendo assim, o uso do extrato do resíduo da polpa do pequi pode ser proposto no desenvolvimento de um novo fitocosmético.

Figura 6. Taxa de viabilidade dos fibroblastos tratados com creme base (CB), controle positivo (CP) e creme com extrato (CE) por 24, 48 e 72 h nas diferentes concentrações (1 - 15,6 µg/mL; 2 - 31,2 µg/mL; 3 - 62,5 µg/mL; 4 - 125 µg/mL; 5 - 250 µg/mL).



ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey. O asterisco (*) indica se existiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.

6.2. Pré-tratamento por extração em fase sólida (EFS) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM)

6.2.1. Desenvolvimento de método por CLAE-DAD/UV

Para o pré-tratamento foram testadas quatro condições para o extrato e uma para o fitocosmético.

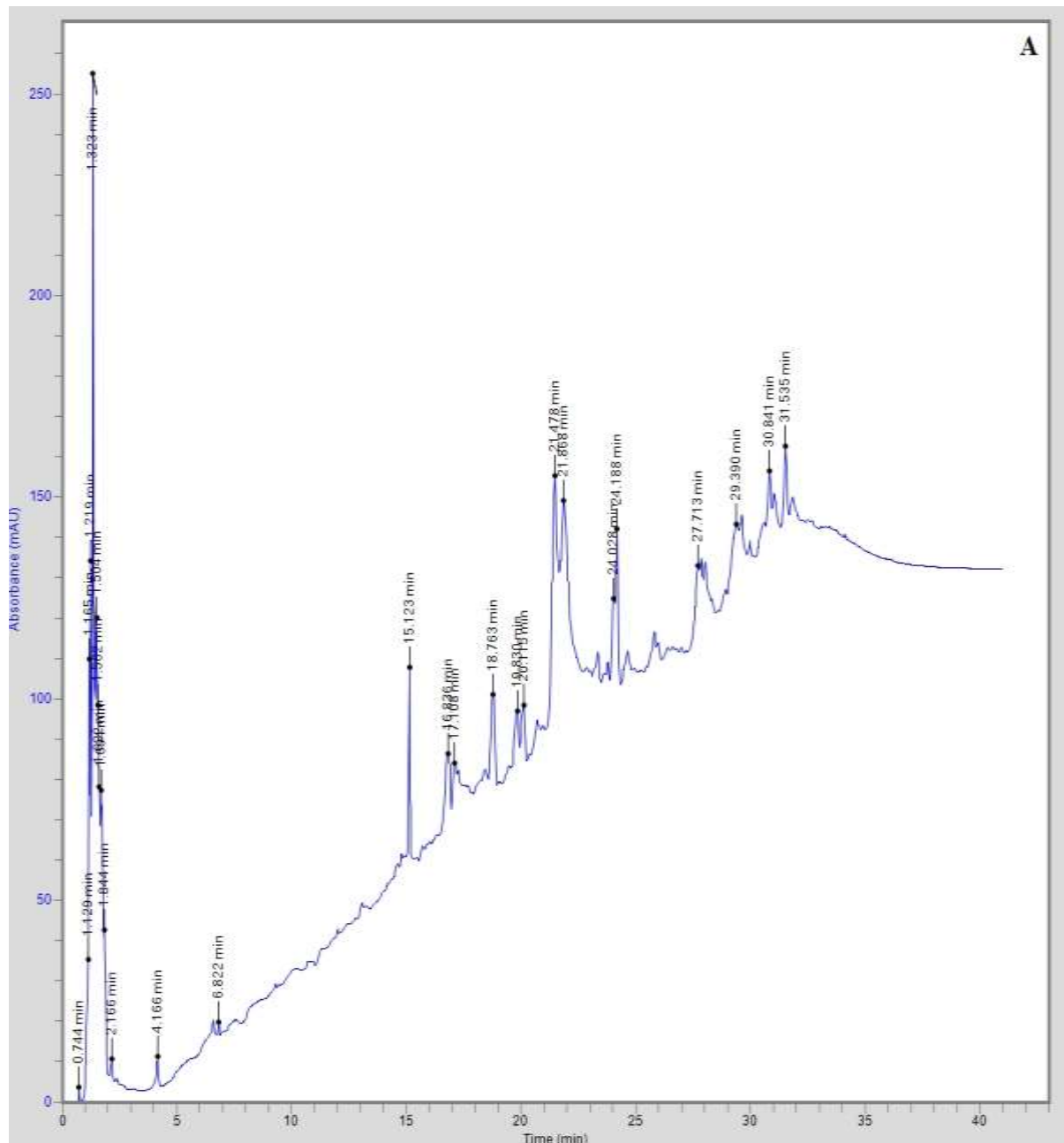
Na fração FA1, a proporção EtOH:H₂O 85:15 (v/v) utilizada favoreceu a eluição de substâncias de alta a média polaridade (k baixo), pois essas substâncias possuem mais afinidade com essa fase móvel do que com a fase estacionária (cartucho C18), possibilitando sua eluição, enquanto que as substâncias pouco polares (lipofílicas), que tem maior afinidade pela fase estacionária, ficaram retidas. Em seguida, para a fração FA2, foi usado 100% de EtOH (fase móvel com alta ϵ) para eluição das substâncias pouco polares (lipofílicas) que ainda estavam retidas no cartucho (eliminação de interferentes lipofílicos). No entanto, como a matriz analisada trata-se de um resíduo da polpa de um fruto (pequi) com altos teores de açúcares, estes compostos de alta polaridade geraram uma grande interferência na concentração dos metabólitos secundários de interesse.

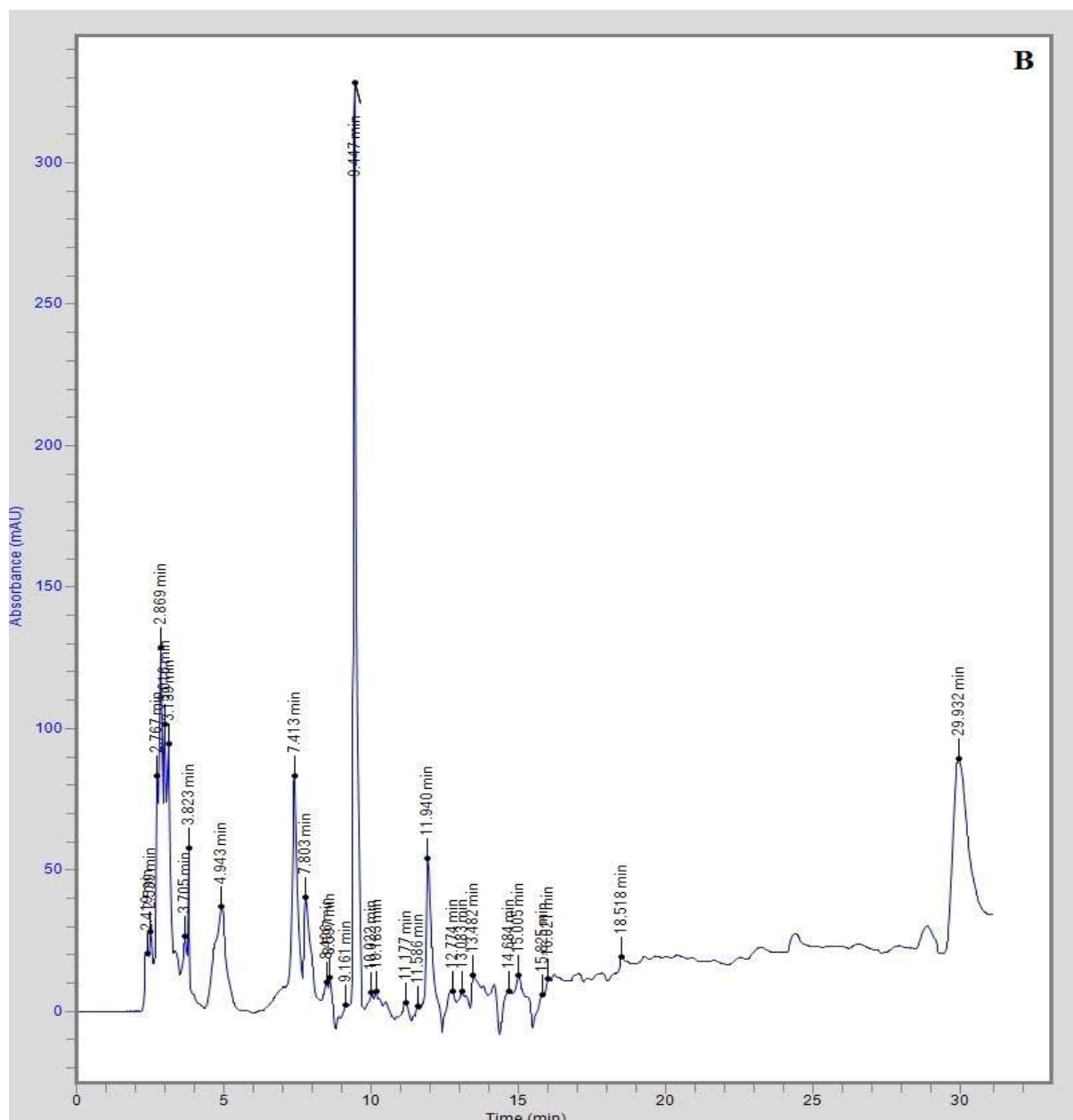
Primeiramente foi utilizada a coluna C18 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis® Express) através do gradiente exploratório com a fração FA1. A escolha desta coluna foi baseada nos princípios da GAC, nos quais é preferível o uso de colunas de menor comprimento a outras de maior comprimento, que proporcionam uma redução no consumo de solventes e no tempo da análise por CLAE. Porém, esta coluna não resultou numa Rs adequada dos picos, pois mesmo com 5% de MeOH não houve retenção de vários componentes da amostra, os quais foram eluídos no t_M .

Sendo assim, esta foi substituída pela coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis®) de maior comprimento, com as mesmas propriedades (natureza química e tamanho de partícula). A partir desta, foi obtido um cromatograma com maior número de picos e Rs mais adequada, como pode ser visto na Figura 7. Sabe-se que com um aumento do comprimento da coluna consequentemente aumenta-se o número de pratos teóricos (segmento da coluna onde se atinge um equilíbrio termodinâmico entre fase móvel, fase estacionária e analito). Logo, um aumento no número de pratos teóricos aumenta a eficiência da coluna. Porém, uma das desvantagens mais visíveis é o acréscimo do tempo de análise.

Seguindo os fundamentos da Química Verde, a substituição da coluna foi mais apropriada a fim de que o uso do EtOH como fase móvel fosse mantido nas análises, não havendo a necessidade de utilizar um solvente potencialmente danoso, como MeOH.

Figura 7. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e EtOH em 250 nm. Colunas: (A) C18 150 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis® Express) e (B) C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®). 5 a 100% EtOH em 30 min, vazão 0,8 mL/min, 20 µL, no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).

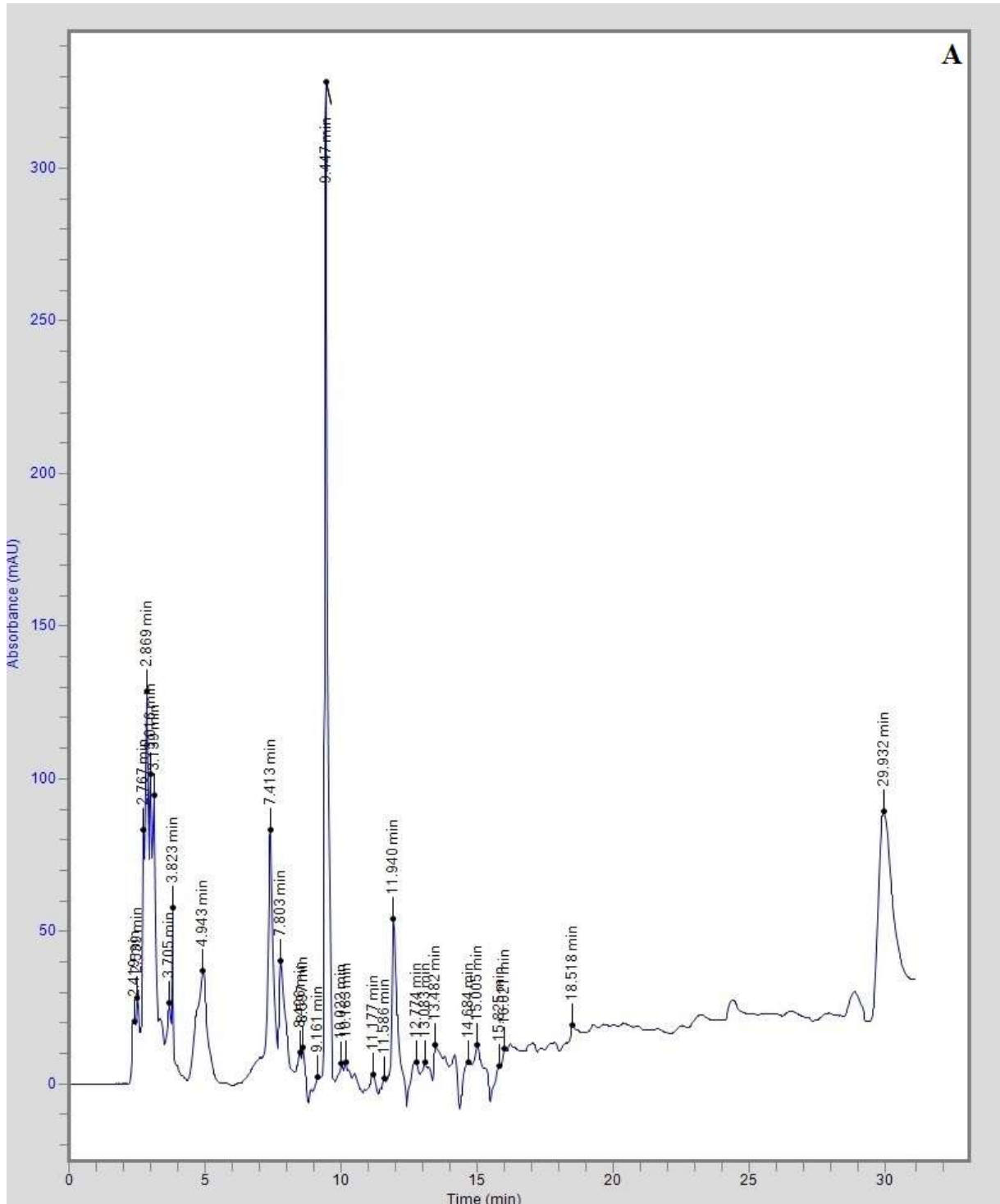


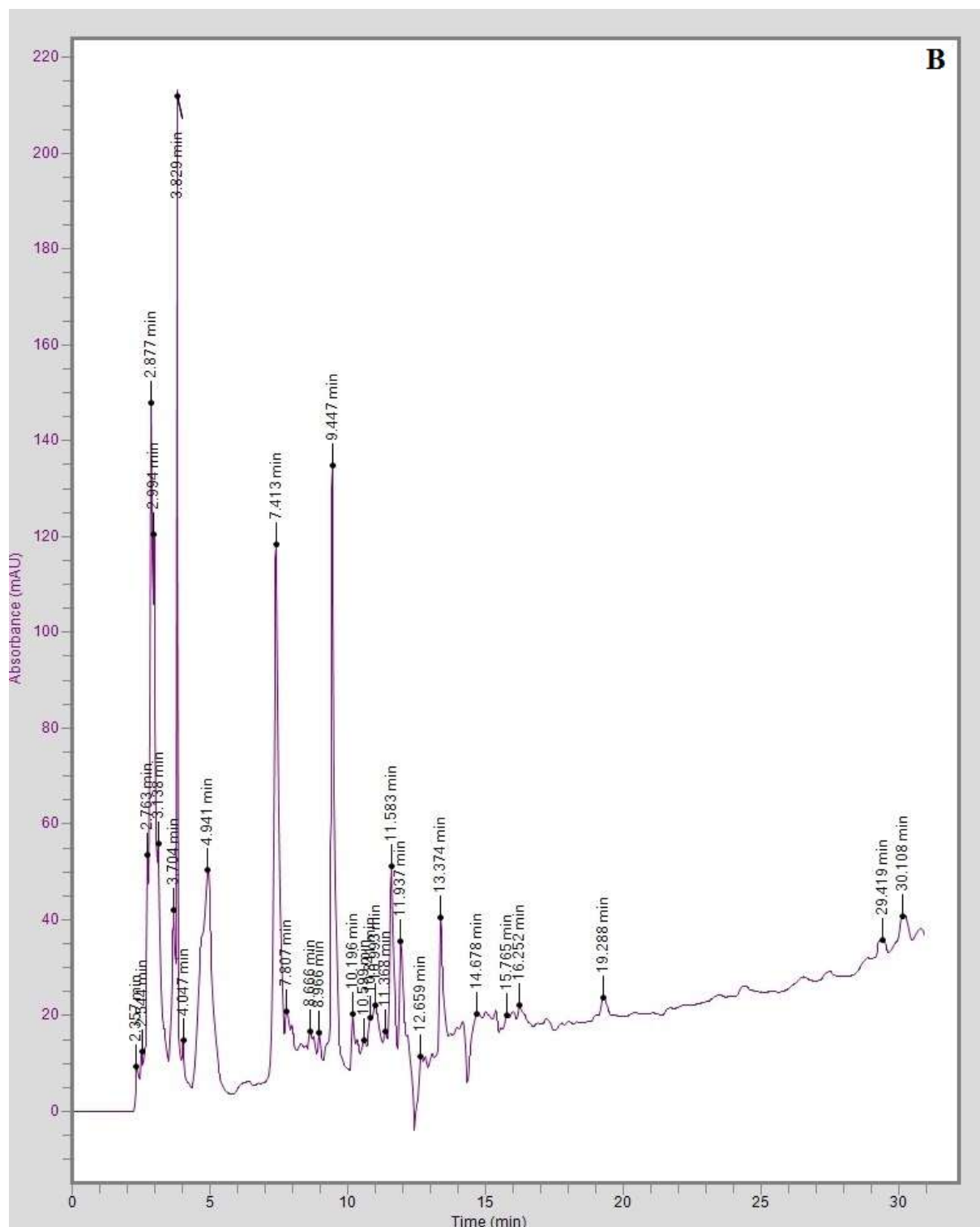


Posteriormente, foi feito um gradiente exploratório da fração FA1 utilizando EtOH e H₂O. O cromatograma pode ser visto na Figura 8. Pode-se observar nos comprimentos de onda de 250 e 280 nm vários picos muito próximos ao t_M (tempo necessário para que as substâncias que não interagem com a coluna sejam eluídas). Isso gera certo problema, pois essas substâncias por serem mais polares, com pouca afinidade pela fase estacionária C18, ou seja, com k baixo, não conseguem ser separadas com uma boa R_s , não possibilitando a visualização de um espectro no UV de uma substância pura/única, ou seja, cada pico pode corresponder a mais de uma substância (coeluição). Já os picos com tempo de retenção (t_R) entre 5 e 15 min são as substâncias de média polaridade, que possuem mais afinidade com a fase estacionária e eluem entre 21-53% de EtOH, enquanto que os outros picos relativos às

substâncias com t_R maiores (entre 15 a 30 min) são as substâncias lipofílicas (k alto), com maior afinidade com fase estacionária C18, por isso só eluem entre 53-100% de EtOH.

Figura 8. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e EtOH em 250 (A) e 280 (B) nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis®), 5 a 100% EtOH em 30 min, vazão 0,8 mL/min, 20 μ L (48,2 mg/mL), no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).



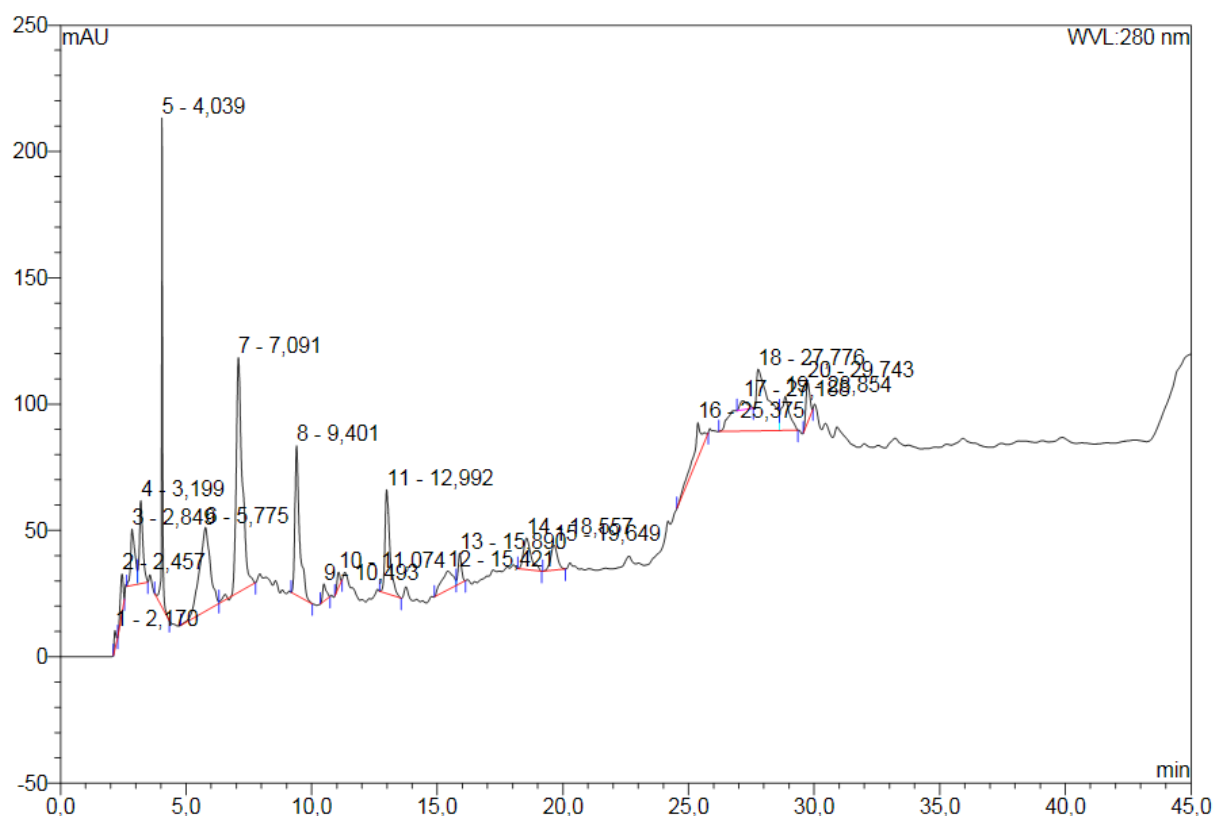


As frações FB1 e FB2 cuja fase móvel foi MeOH:H₂O 5:95 (v/v) favoreceu a eluição das substâncias mais polares, citadas anteriormente como interferentes polares da matriz. Na fração FB3, as substâncias com *k* intermediário foram eluídas, pois possuem mais afinidade com a fase móvel do que com a fase estacionária, enquanto que as substâncias lipofílicas ficaram retidas e foram eluídas utilizando 100% de MeOH (fase móvel com ϵ alta).

As frações FB2 e FB3 também foram analisadas. Quando comparadas a fração FA1, ficou evidente que as frações FB2 e FB3 juntas resultavam nas mesmas substâncias encontradas na fração FA1. Logo, a fração FA1 foi a que apresentou melhor separação das substâncias a serem analisadas. Deste modo, esta (fração FA1) foi usada no desenvolvimento de método por CLAE-DAD/UV.

Sendo assim, a partir do gradiente exploratório com EtOH, foram testadas diferentes possibilidades para melhorar a separação dos picos com t_R baixo, alterando a proporção de EtOH (%) na fase móvel (Quadro 1). A condição cromatográfica 8 (Fig. 9) foi a mais adequada

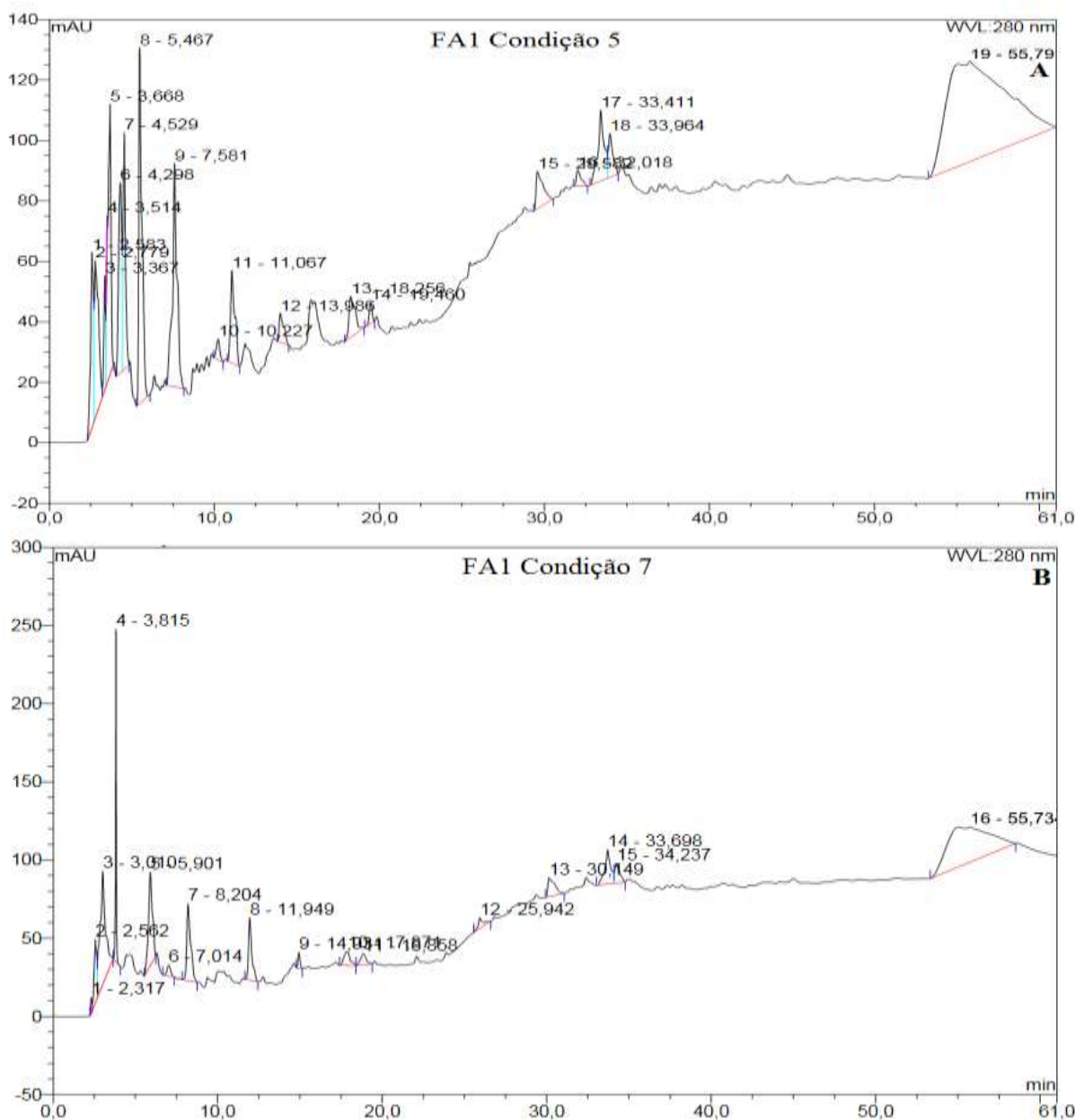
Figura 9. Cromatograma representativo da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e EtOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis®), EtOH 3% para 35% em 20 min; EtOH 35% para 84% em 5 min; EtOH 84% em 15 min; EtOH 84% para 100% em 1 min; EtOH 100% em 4 min (Condição 8), vazão 0,8 mL/min, 20 μ L (48,2 mg/mL), no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).

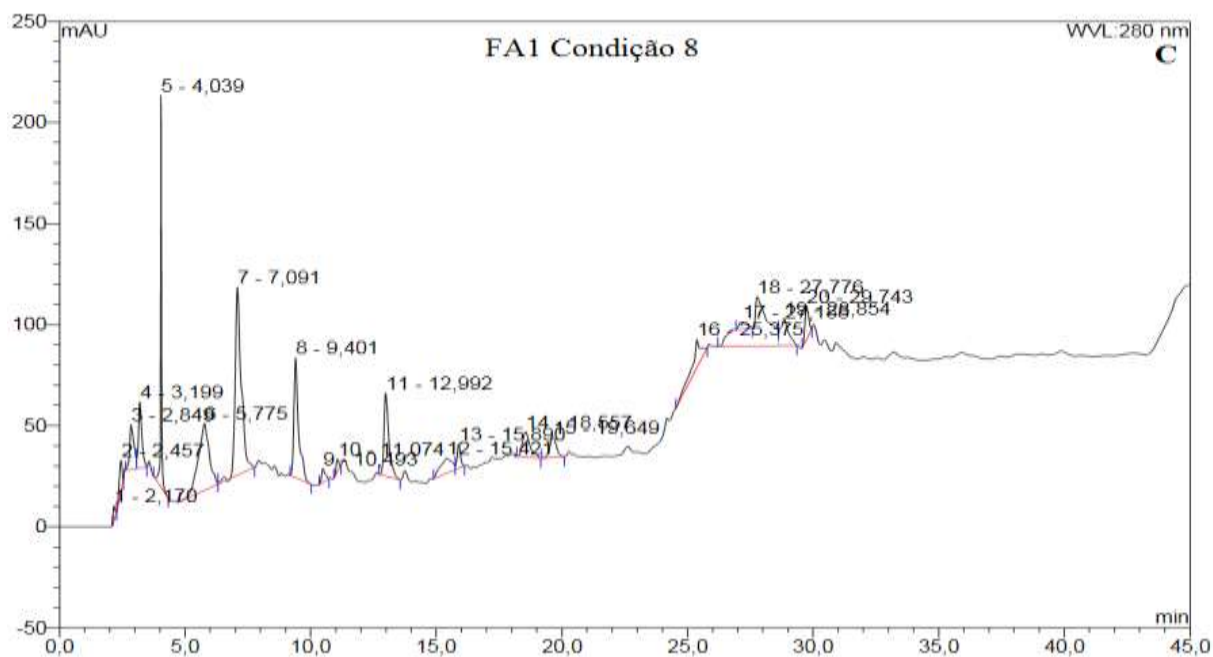


Comparando as três condições cromatográficas testadas com EtOH:H₂O (Fig. 10), pode-se verificar que as condições 5 e 8 apresentaram um número de picos maior (15) que a condição 7 (12). Porém, na condição 8, iniciando a análise com 3% de EtOH, possibilitou uma Rs melhor dos picos com t_R baixo, pois reduzindo de 6% para 5% e depois para 3%

(redução na ϵ), aumentou-se o com t_R destes picos (ficaram mais tempo retidos na fase estacionária). Além disso, nas condições 5 e 7, havia um intervalo de 20-30 min no qual nenhuma substância era eluída. Assim, esse intervalo foi reduzido de 10 para 5 min (condição 8). A proporção de 84% de EtOH modo isocrático por 15 min aumentou o número de picos de 3 para 5, pois utilizando um gradiente de 82-85% (ϵ maior) não se tinha uma separação total dos picos.

Figura 10. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e EtOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis®), condições 5 (A), 7 (B) e 8 (C), fluxo 0,8 mL/min, 20 μ L (48,2 mg/mL), no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).

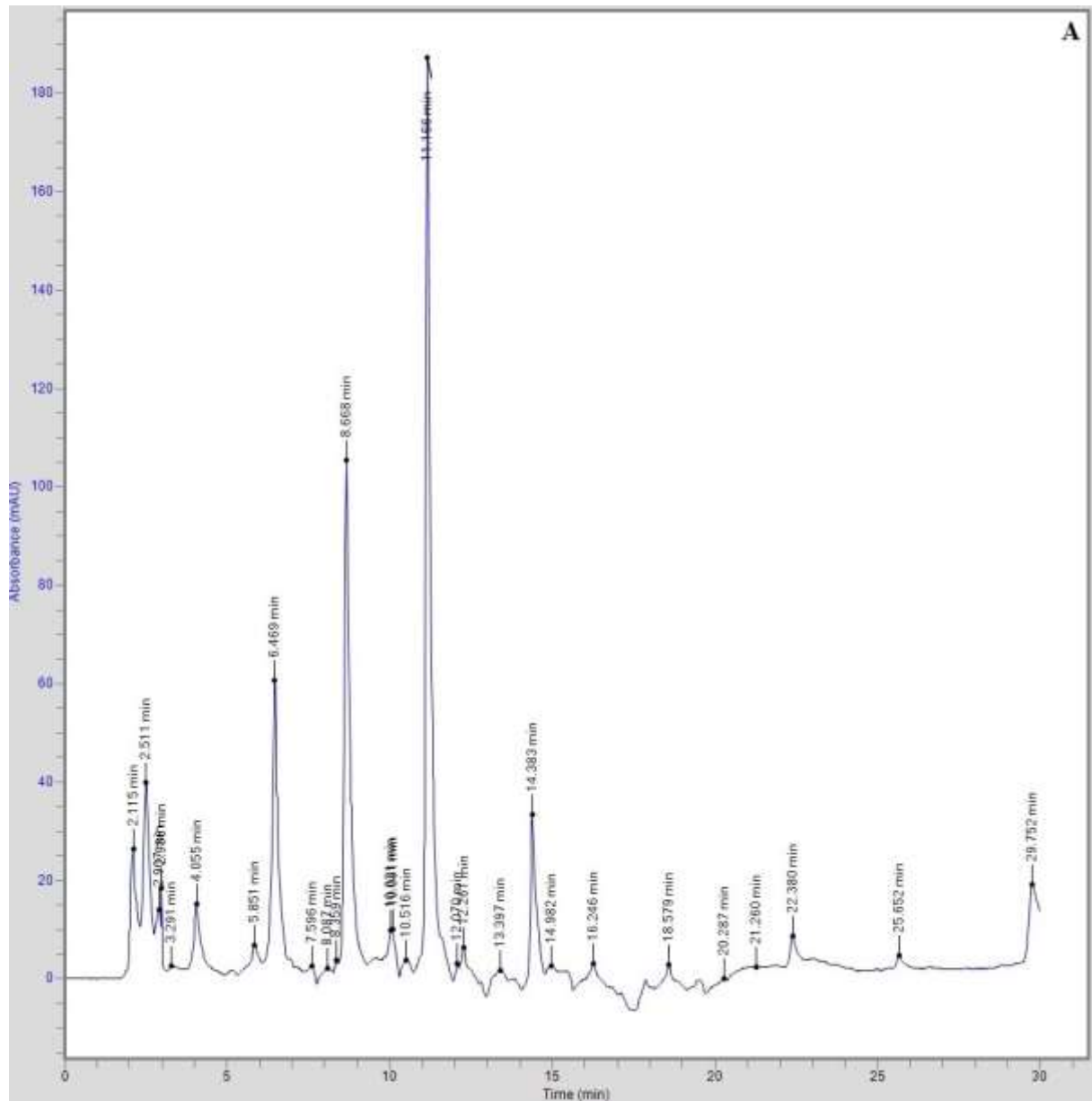


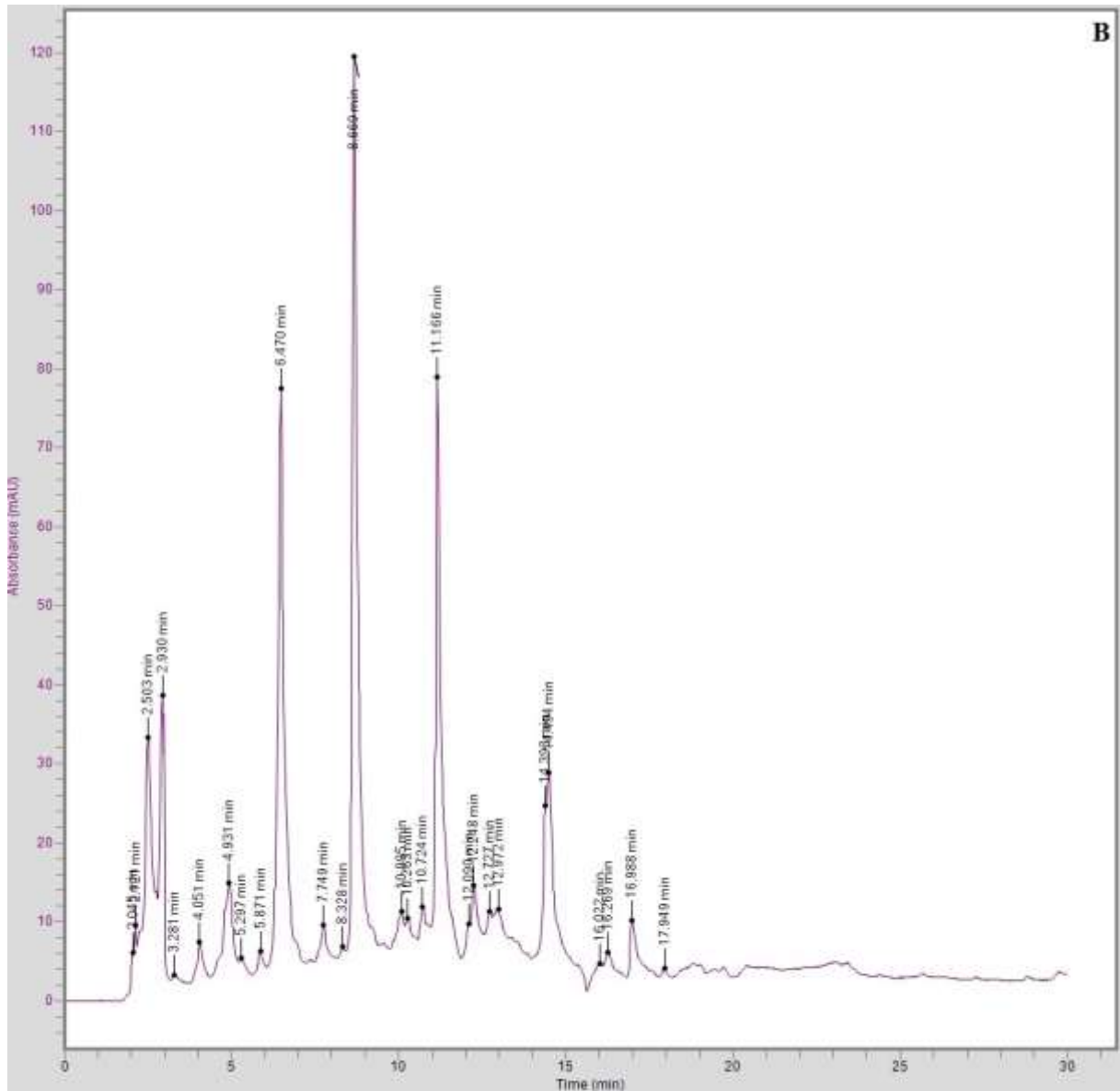


Posteriormente, devido às dificuldades de separação das substâncias com o uso do EtOH ($\epsilon \approx 3,1$ em C18) como fase móvel, pois sendo um solvente com ϵ alta, faz com que as substâncias sejam eluídas em um t_R menor, ou seja, ficam pouco tempo retidas na coluna. Deste modo, foi testado o MeOH ($\epsilon \approx 1,0$ em C18). Como o MeOH é um solvente com ϵ menor, as mesmas substâncias foram eluídas em um t_R maior nas mesmas condições, ou seja, ficaram mais tempo retidas da coluna (k maior), possibilitando uma melhor Rs.

No gradiente exploratório com MeOH e H₂O (Fig. 11), pode-se observar nos comprimentos de onda de 250 e 280 nm ainda alguns picos muito próximos do t_M . Porém, uma boa melhora no cromatograma é constatada. As substâncias de alta polaridade que eram eluídas próximas do t_M , agora o são em t_R até 5 min (aumento no k). Os picos que representam as substâncias com valor de k intermediário eluíram entre 5 a 20 min, pois têm maior afinidade com a fase estacionária e eluem entre 21-68% de MeOH, enquanto que os outros picos relativos às substâncias com t_R maiores, entre 20 a 30 min (k alto) são as substâncias lipofílicas, com maior afinidade pela fase estacionária C18, por isto só eluem entre 68-100% de MeOH.

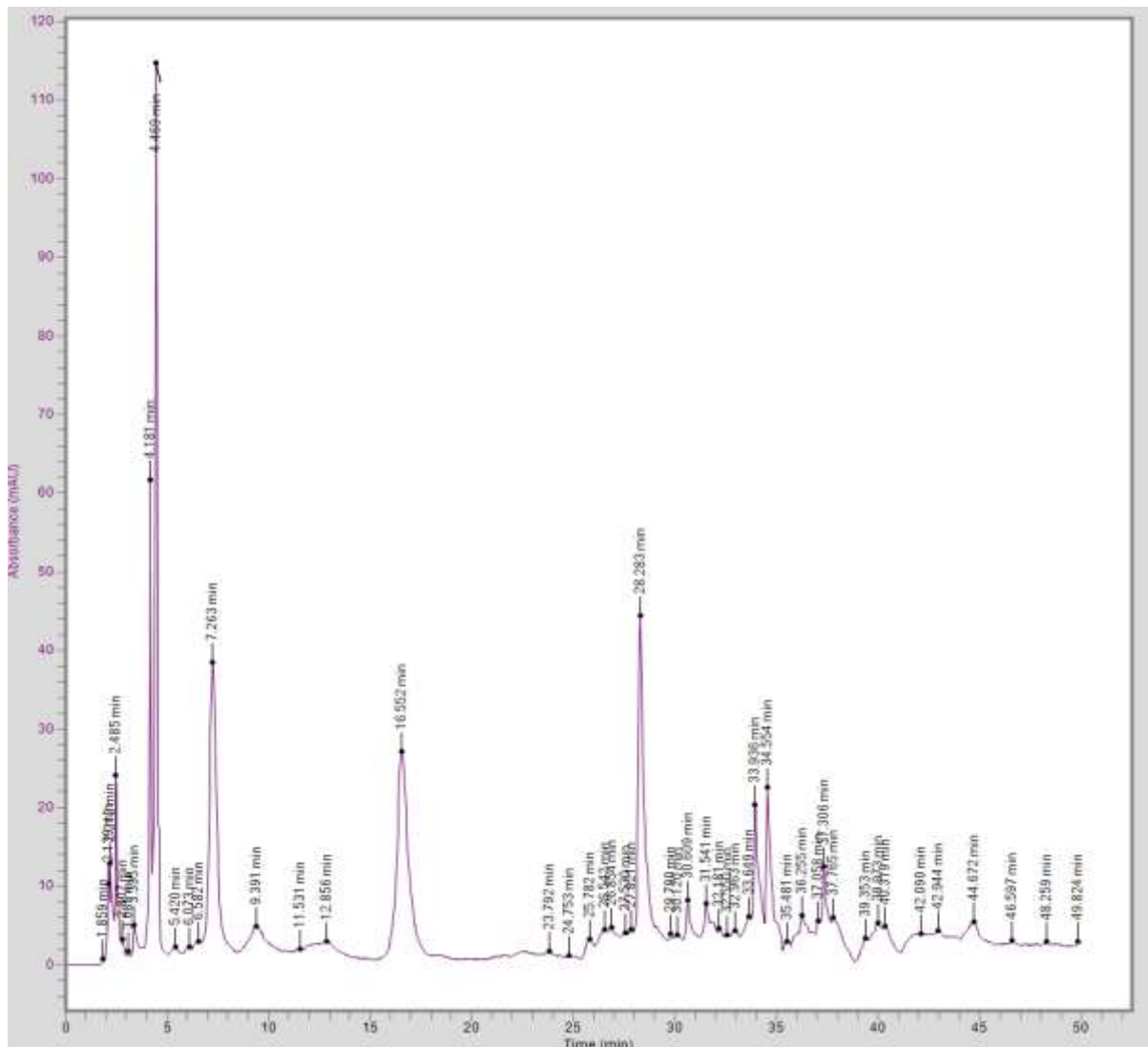
Figura 11. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e MeOH em 250 (A) e 280 (B) nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), 5 a 100% MeOH em 30 min, fluxo 1 mL/min, 20 µL (50,7 mg/mL), no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).





A partir do gradiente exploratório com MeOH, foram testadas diferentes condições de fase móvel para melhorar a separação dos picos com t_R baixo (k baixo) (Quadro 1). A condição mais eficiente na separação das substâncias foi a 16 (Fig. 12).

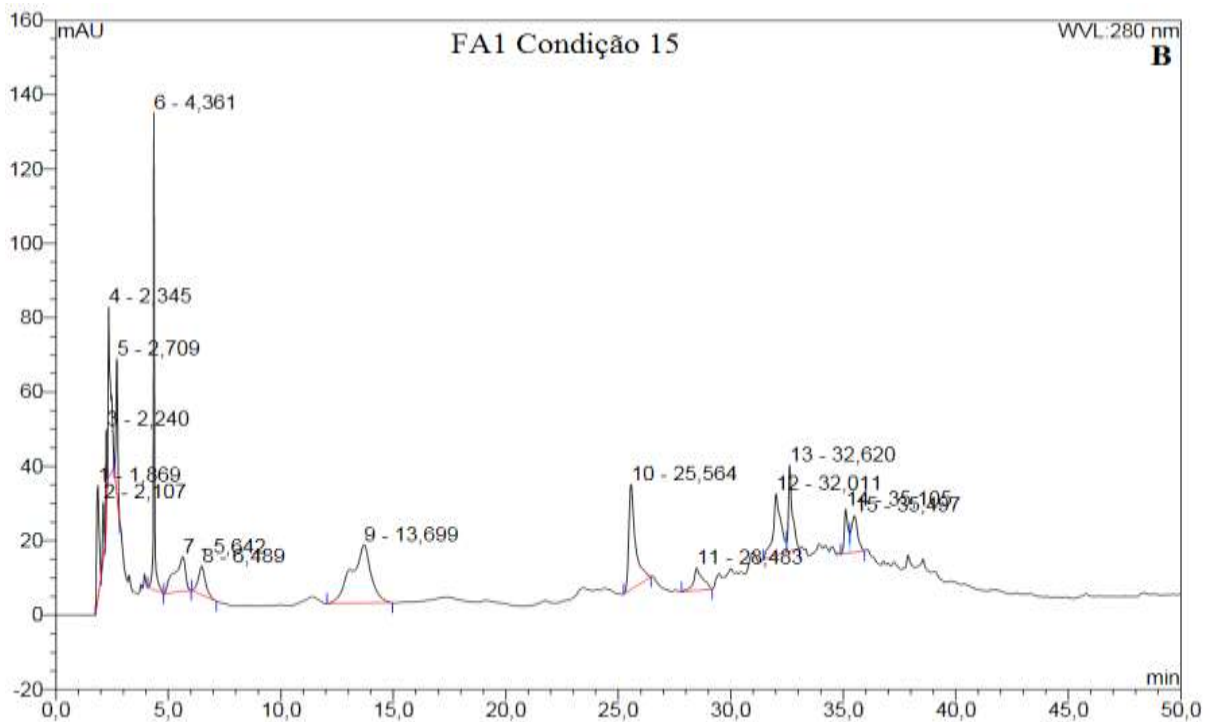
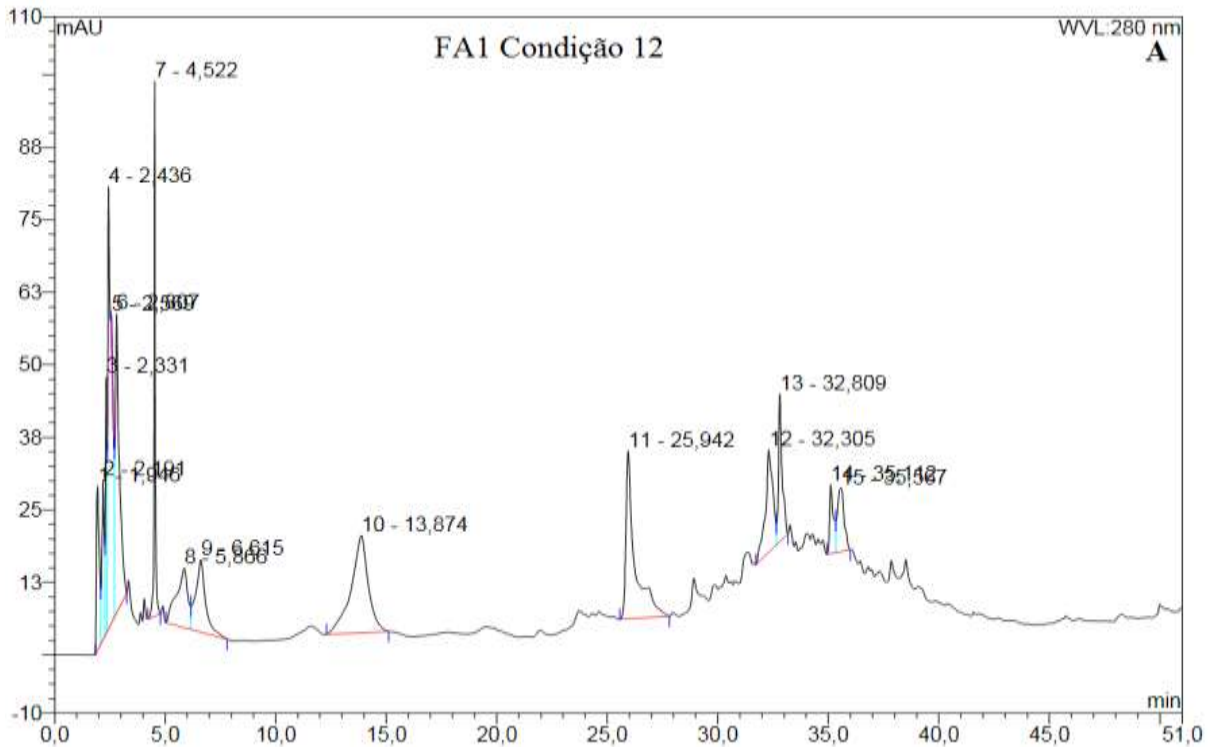
Figura 12. Cromatograma representativo da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e MeOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 µm (Ascentis®), MeOH 5% em 15 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min (Condição 16), vazão 1 mL/min, 20 µL (50,7 mg/mL), no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).

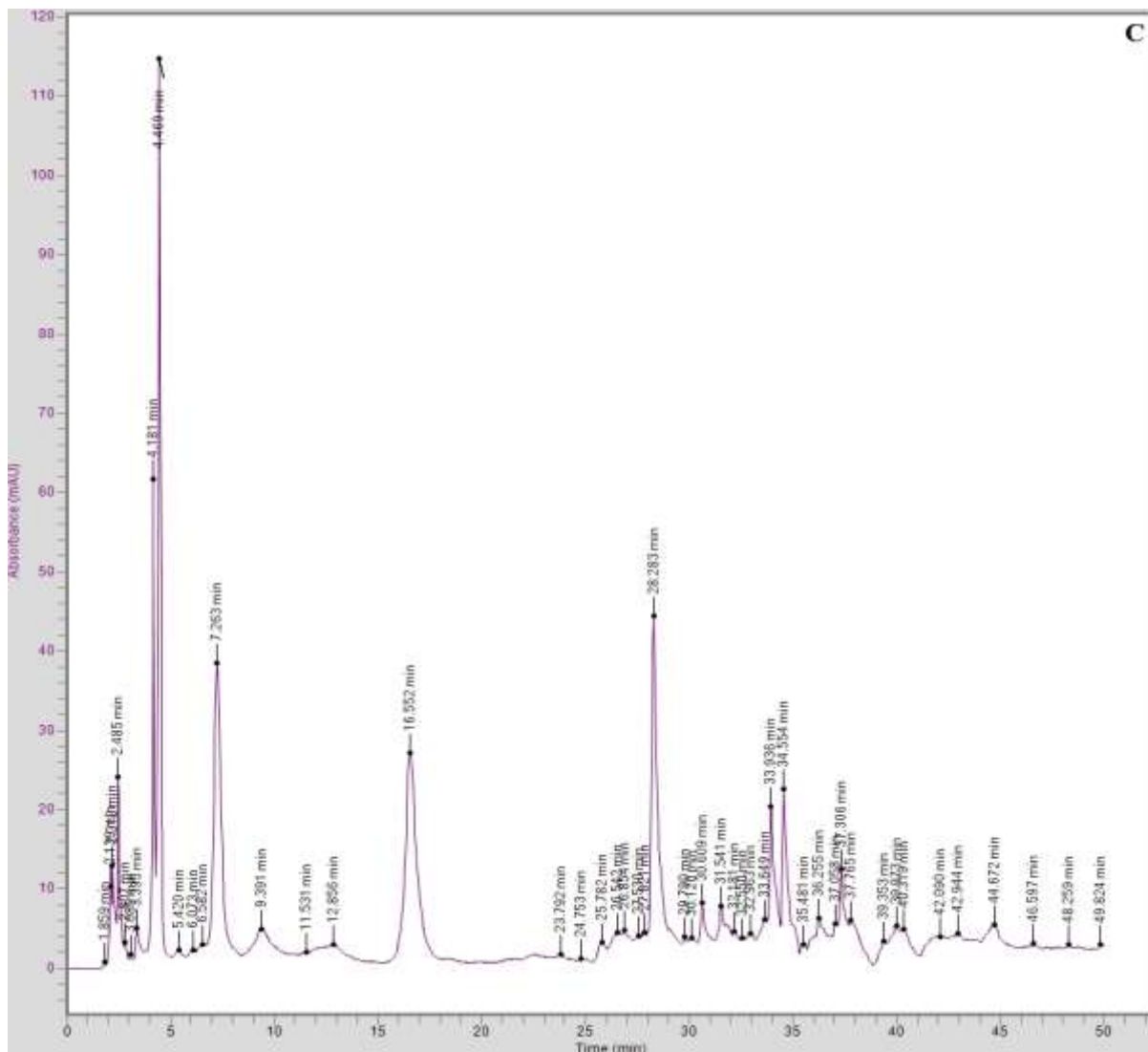


Comparando as três condições cromatográficas testadas com MeOH:H₂O (Fig. 13), pode-se verificar que todas as condições apresentaram número de picos semelhantes, pois a condição inicial da fase móvel foi a mesma (5% MeOH em 15 min) e o tempo de análise (50 min) também. Além disso, na condição 16, o aumento na proporção de MeOH de 17% (condição 12), para 18% (condição 15) e depois para 19% em 10 min, provocou um aumento na ϵ , reduzindo o t_R dos picos no intervalo de 15-25 min, fazendo com que estes fossem eluídos em um tempo menor, melhorando a separação. No final da análise, nas condições 12 e 15, ficou evidente que a proporção de 100% e 98% de MeOH não era necessária para a separação dos picos finais (k alto). Sendo assim, na condição 16, utilizou-se 96% de MeOH,

reduzindo a ϵ e aumentando o t_R dos picos finais, obtendo-se uma R_s mais adequada do par de picos no t_R próximo a 35 min.

Figura 13. Cromatogramas representativos da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e MeOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 μ m (Ascentis®), condições 12 (A), 15 (B) e 16 (C), vazão 1 mL/min, 20 μ L (50,7 mg/mL), nos cromatógrafos Thermo Scientific (CLAE 2) e Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).



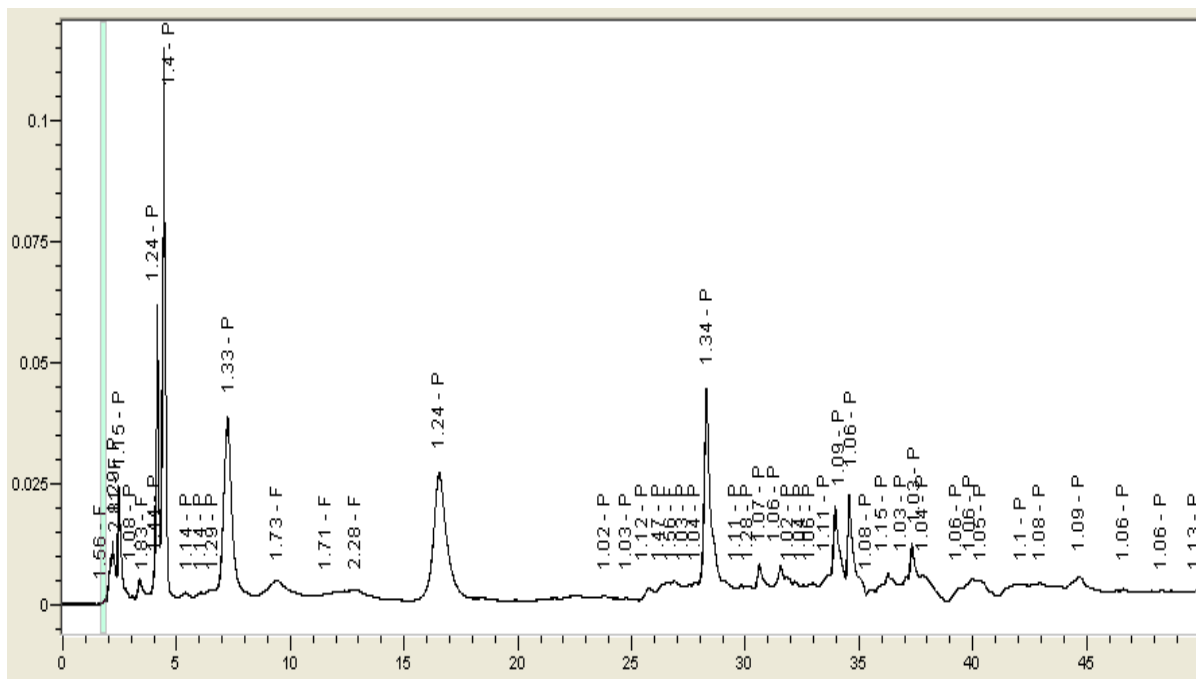


A partir desses resultados, a melhor condição encontrada foi a 16 utilizando MeOH e H₂O ultrapura como fase móvel.

Deste modo, foram obtidos através do *software* Chromera os comprimentos de onda de máxima absorção correspondente para cada pico (Fig. 14) e os valores de pureza dos picos em 280 nm (Fig. 15).

O valor do comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) obtido é um indicativo da classe de compostos e das faixas (bandas) de absorção. Na Figura 14, pode-se observar que os picos das substâncias entre 0 a 30 min apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ em torno de 250-280 nm. Por outro lado, as substâncias pouco polares (lipofílicas) apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ por volta de 260 nm. A partir destes dados, observou-se claramente o predomínio de picos com $\lambda_{\text{máx}}$ entre 254 a 280 nm, adotando-se os valores de 254, 270, 280 e 300 nm para detecção.

Figura 15. Pureza dos picos do cromatograma representativo da fração FA1 eluída com fase móvel composta por H_2O ultrapura e MeOH em 280 nm, coluna C18 250 x 4,6 mm x 5 μm (Ascentis®), Condição 16, no cromatógrafo Perkin Elmer Flexar (CLAE 1).

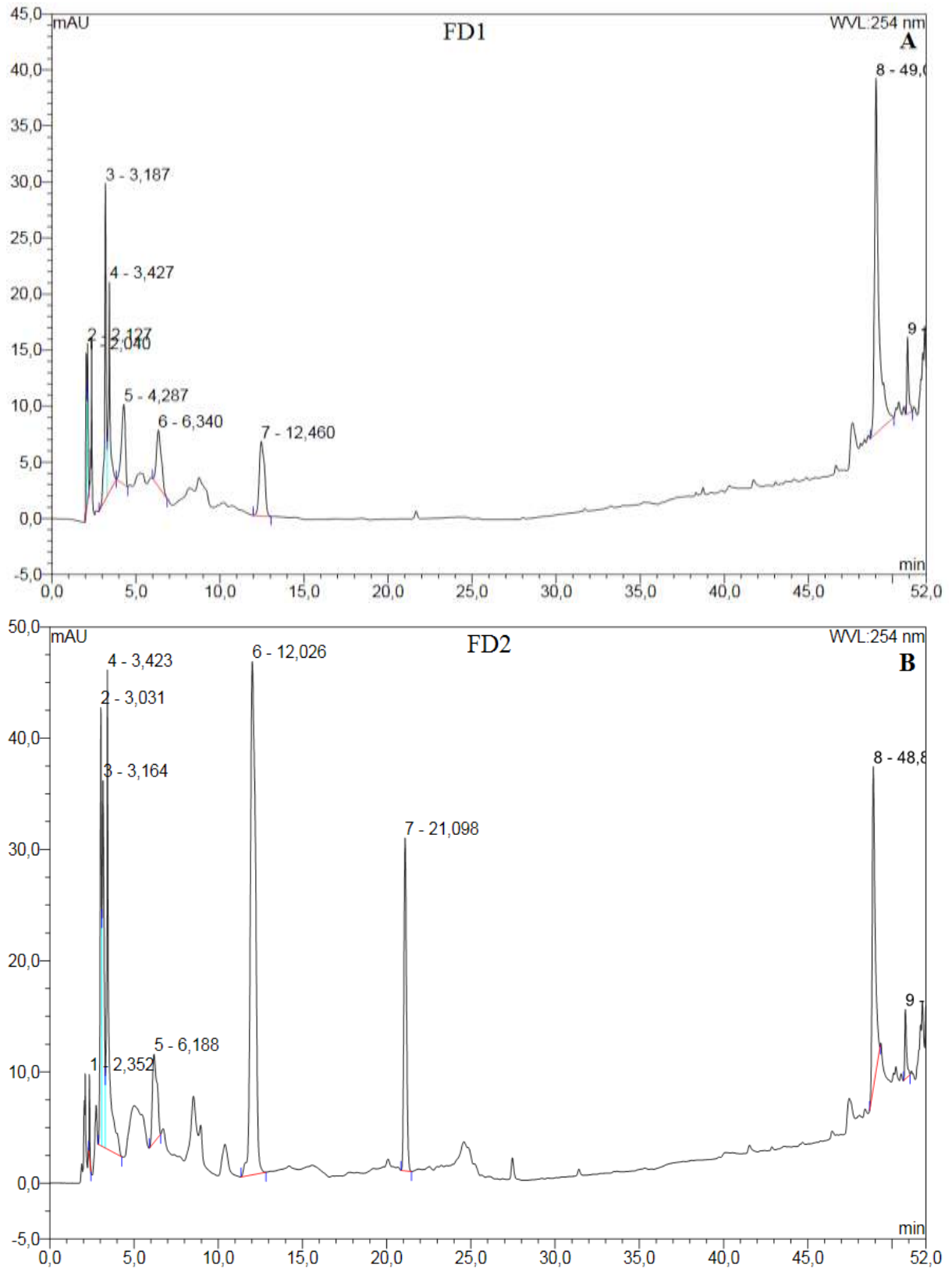


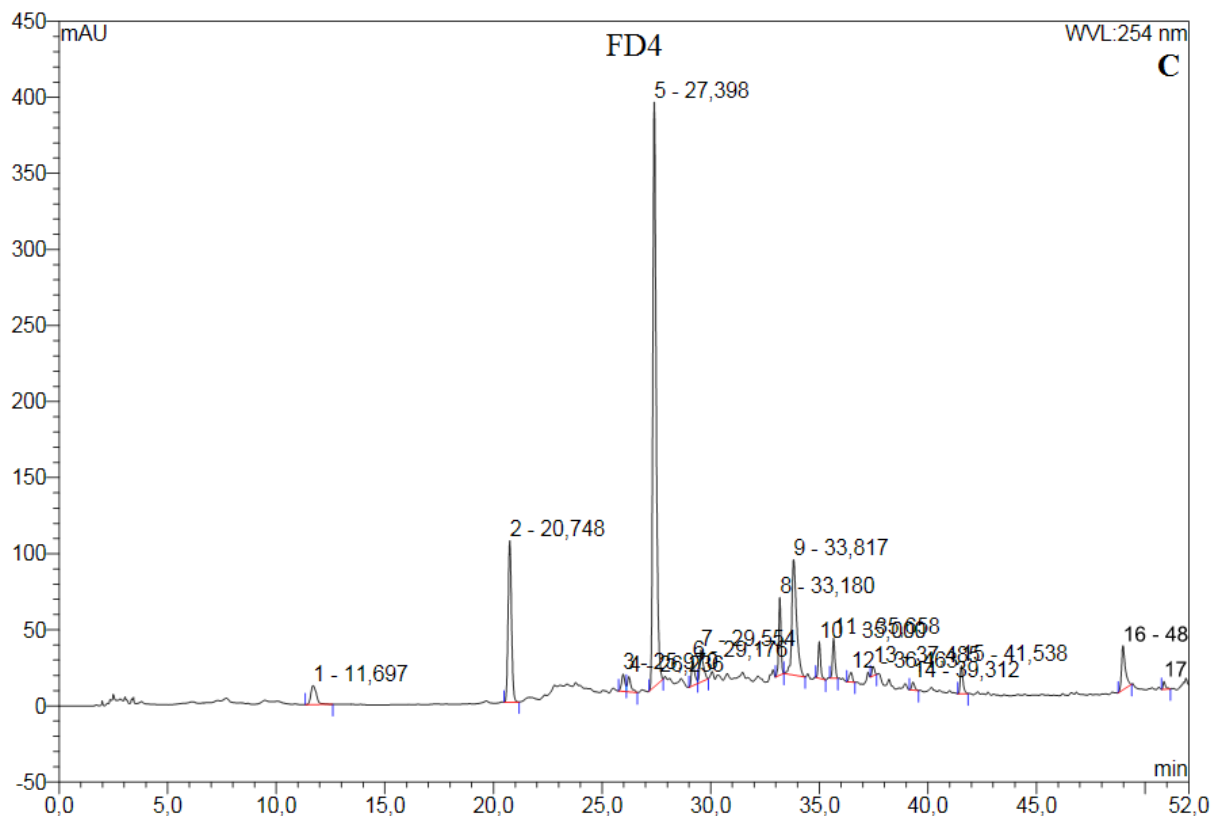
A condição 3 de EFS permitiu a eluição das frações FD1, FD2 e FD3 com 100% de H_2O ultrapura, nas quais estavam presentes as substâncias polares, sugeridas como interferentes polares da matriz. Sendo assim, a fração FD4, eluída EtOH: H_2O 70:30 (ϵ maior) mostrou que os interferentes polares (frações FD1, FD2 e FD3) e lipofílicos (frações FD5 e FD6) eluídas com fase móvel com ϵ maior) tinham sido removidos, concentrando os metabólitos secundários e favorecendo a detecção destes.

Em seguida, a fim de aumentar o k e de R_s das substâncias que estavam sendo eluídas no início da análise e avaliar a eliminação dos interferentes polares, as frações FD1, 2 e 4 foram analisadas na coluna C18 Hydro, utilizando a condição 1 (Quadro 1). A coluna C18 Hydro foi empregada com o intuito de melhorar a R_s , além de reduzir o consumo de solventes mais danosos ao ambiente (como o MeOH) e aumentar o uso de solventes mais verdes, como a H_2O ultrapura, atendendo aos princípios da GAC.

A Figura 16 mostra o perfil obtido a partir da análise destas frações. Diante do perfil observado nas frações FD1, 2 e 4 (Fig. 16), ficou evidente que as frações FD1 e FD2 têm um perfil químico muito semelhante, exceto pelo pico com t_R igual a 21 min e que, a partir da fração FD2, alguns prováveis compostos de interesse já estavam sendo eluídos (pico 7 na fração FD2 e pico 2 na fração FD4). Além disso, na fração FD4 entre 27 a 40 min, houve um fracionamento que separou os possíveis picos de interesse nas 3 frações analisadas.

Figura 16. Cromatogramas representativos das frações FD1 (A), FD2 (B) e FD4 (C) eluídas com fase móvel composta por H₂O ultrapura e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% para 5% em 15 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min (Condição 1), vazão 1 mL/min, 20 µL (10 mg/mL), no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).





Por fim, a condição 4 de EFS foi otimizada, descartando-se o primeiro mL de H₂O ultrapura, a fim de concentrar os metabólitos presentes nas frações FD2 e 4, obtendo-se a fração FE2. Descartando-se o primeiro mL de H₂O ultrapura (fração FE1), houve a perda em termos quantitativos dos mesmos metabólitos detectados na fração FD1 (Fig. 16), substâncias correspondentes aos picos entre 0 a 13 min. Porém, como estes mesmos picos também foram observados na fração FD2, em termos qualitativos não houve perda de informações.

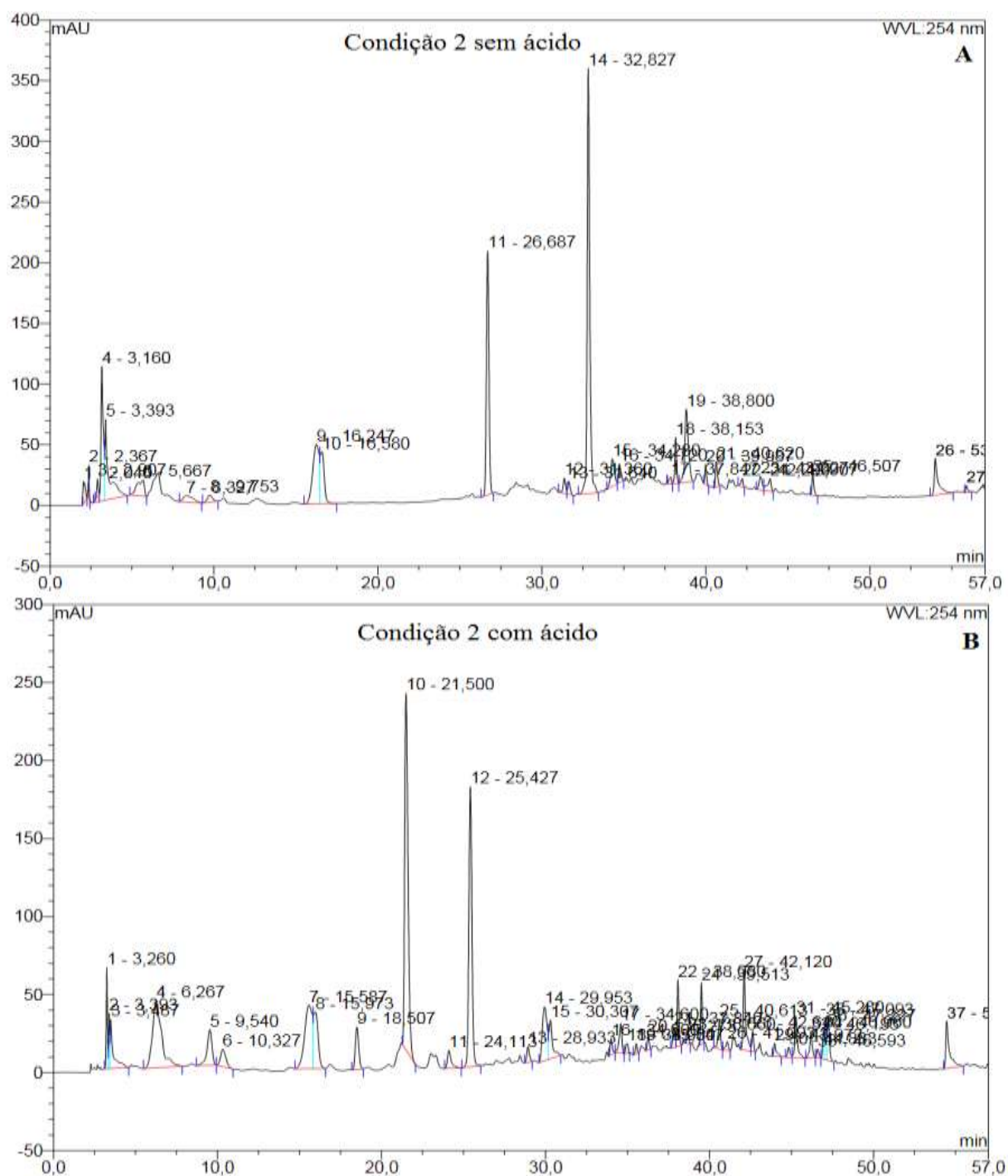
A fração FE2, eluída com EtOH:H₂O 70:30, exibiu um perfil químico adequado da matriz, com os metabólitos bem concentrados e quase a totalidade dos interferentes polares (fração FE1) e lipofílicos (FE3) tinha sido eliminada.

A partir da fração FE2 foram testadas diferentes condições (Quadro 1) até se obter uma adequada Rs dos picos.

A primeira condição testada foi similar àquela utilizada com as frações FD, exceto o início da análise que foi alterado, iniciando com 100% de H₂O ultrapura durante 10 min (Fig. 17A). Os picos após 33 min de análise ainda não estavam bem separados, bem como sua altura e intensidade estavam baixas. A partir disso, a mesma condição foi avaliada acidificando a fase móvel (H₂O ultrapura) com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (Fig. 17B). Pode-se observar que houve uma melhora na Rs dos picos, bem como no número de picos detectados e no k (redução, t_R menor) dos picos. O ácido fórmico (modificador) tem a

capacidade de suprimir o processo de ionização de compostos fenólicos, fazendo com que o deslocamento do equilíbrio químico favoreça a estrutura química neutra da substância, melhorando a Rs (picos sem caudas).

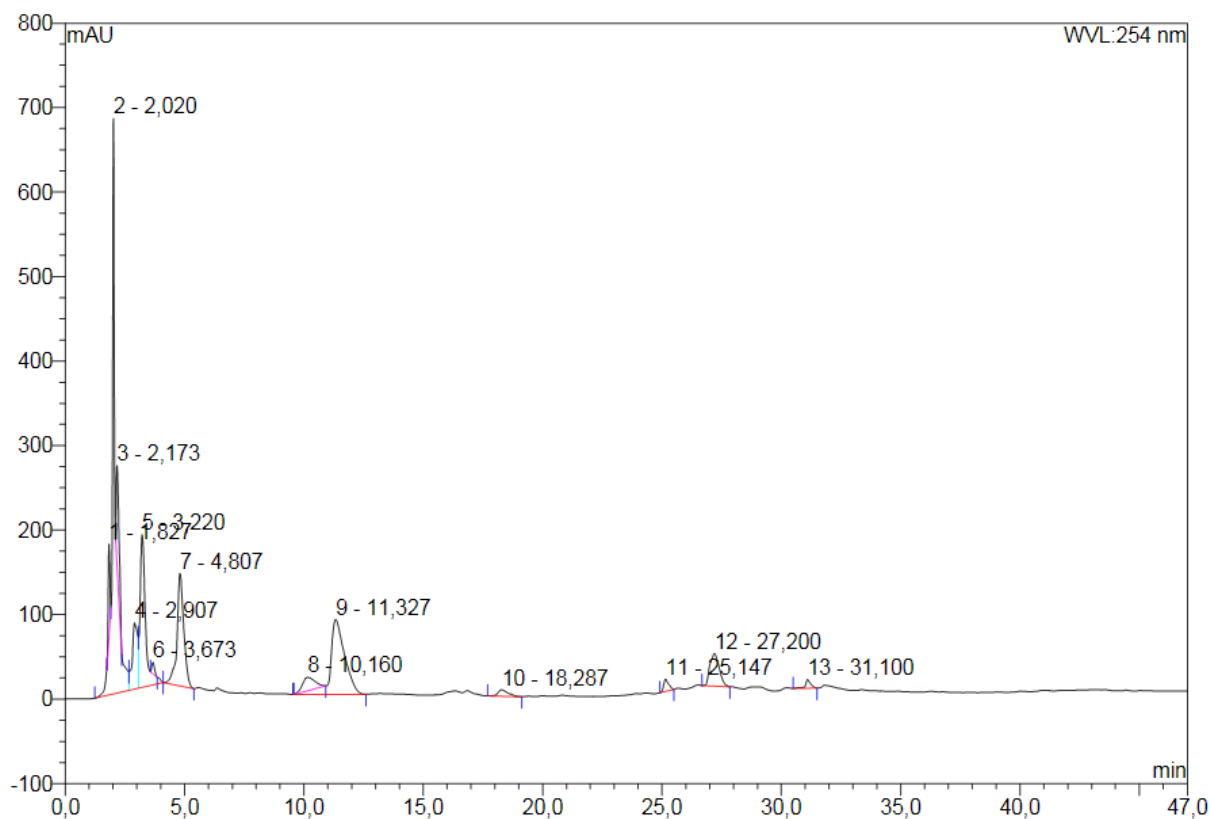
Figura 17. Cromatogramas representativos da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura sem (A) e com (B) 0,1% de ácido fórmico e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min; MeOH 0% para 5% em 10 min; MeOH 5% para 19% em 10 min; MeOH 19% para 96% em 25 min; MeOH 96% para 100% em 1 min (Condição 2), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (20 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).



A coluna fenil 250 x 4,0 mm x 5 μm (NST®) também foi utilizada, obtendo-se uma Rs não adequada dos picos, pois, mesmo iniciando a análise com 5% de MeOH, não houve retenção de vários componentes da amostra.

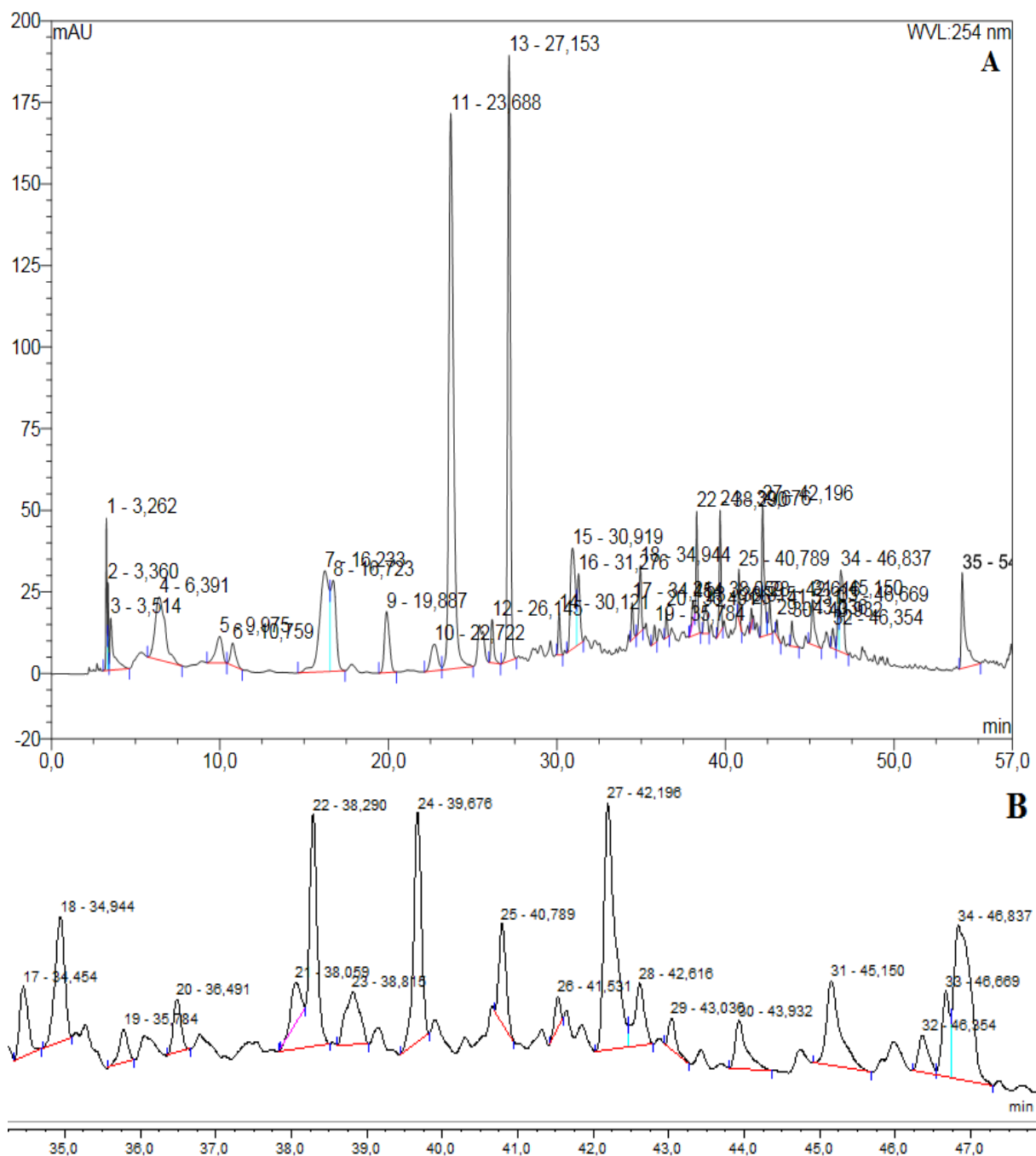
A partir da Figura 18, pode-se observar que a maioria das substâncias foram eluídas próxima ao t_M desta coluna, pois o valor de k baixo destas substâncias fez com que estas interagissem menos com a fase estacionária, sendo eluídas rapidamente e, conseqüentemente, não favorecendo a Rs.

Figura 18. Cromatograma representativo da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura e MeOH em 254 nm, coluna fenil 250 x 4,0 mm x 5 μm (NST®), MeOH 5% em 10 min, MeOH 5% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 1), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 μL (20 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).



Posteriormente, foram avaliadas outras condições, alterando a proporção de MeOH em duas etapas de gradiente linear, até obter-se a melhor condição, a 7 (Fig. 19), na qual obteve-se uma boa Rs dos picos, empregando-se novamente a coluna C18 Hydro.

Figura 19. Cromatograma representativo da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (20 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2) (A) e ampliação do cromatograma entre os picos 17 a 34 (B).



A partir do pré-tratamento do fitocosmético foram obtidas as frações C1 e C2. A fração C1 (EtOH:H₂O 70:30) apresentou uma coloração fracamente amarela, semelhante a

fração FE2, contendo as substâncias com k baixo (polares), incluindo os componentes do extrato bem como os da formulação cosmética. Já a fração C2, apresentou um aspecto oleoso, contendo os componentes mais lipofílicos (k alto) da formulação.

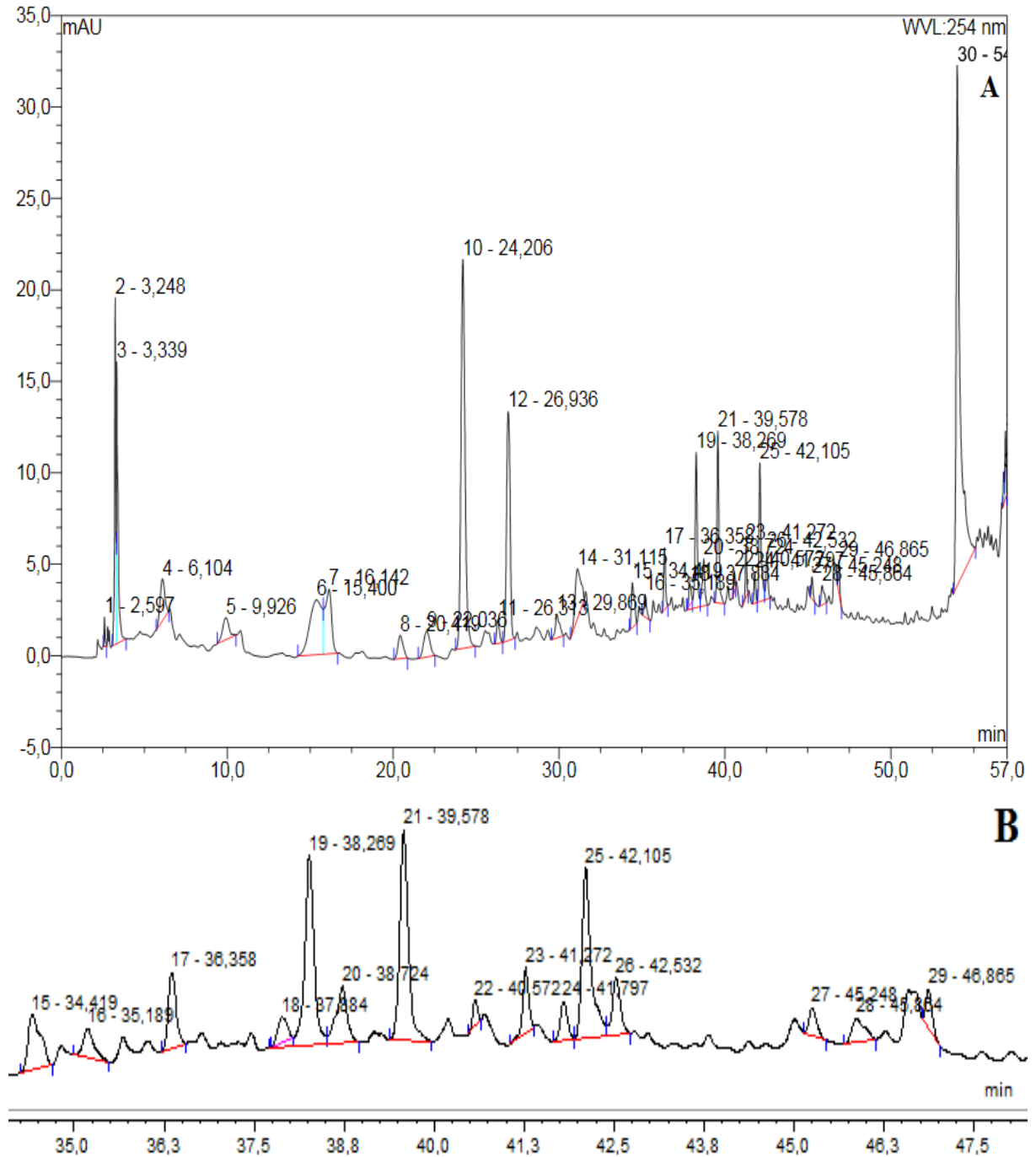
Sendo assim, apenas a fração C1 foi analisada por CLAE-UV utilizando a condição cromatográfica 7 (Fig. 20), com o propósito de averiguar se o perfil qualitativo do fitocosmético era o mesmo da fração FE2.

A partir das Figuras 19 e 20, fica evidente que o extrato incorporado na formulação apresentou o mesmo perfil químico qualitativo do extrato (fração FE2), corroborando para sua estabilidade pós-formulação, ou seja, não houve degradação do extrato após sua incorporação na formulação cosmética. Sabe-se que presença de extratos vegetais em formulações cosméticas pode afetar a estabilidade das mesmas devido às variações de solubilidade e estabilidade apresentadas pelos extratos (EPSTEIN, 2009).

Com relação ao número de picos, o total de picos mostrou-se semelhante, 35 para a fração FE2 do extrato e 30 para a fração C1 do fitocosmético. Na análise do t_R dos picos foi constatada uma pequena variação, em torno de 0,02 a 0,52 min.

Já na comparação das áreas relativas (%) dos picos principais da fração C1 do fitocosmético (t_R igual 24,21; 26,94; 38,27; 39,58 e 42,11 min) e da fração FE2 do extrato (t_R igual a 23,69; 27,15; 38,29; 39,68 e 42,20 min), valores obtidos no cromatograma com auxílio do programa Chromeleon®, ficou evidente que a área relativa dos picos das duas frações tem valores bem próximos, confirmando que a adição de 10% do extrato na formulação cosmética não promoveu a modificação do perfil químico. Além disso, mostra que a incorporação do extrato foi eficiente e que este se manteve estável (sem sinal de degradação).

Figura 20. Cromatograma representativo da fração C1 (fitocsmético) eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (6 mg/mL) no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2) (A) e ampliação do cromatograma entre os picos 15 a 29 (B).



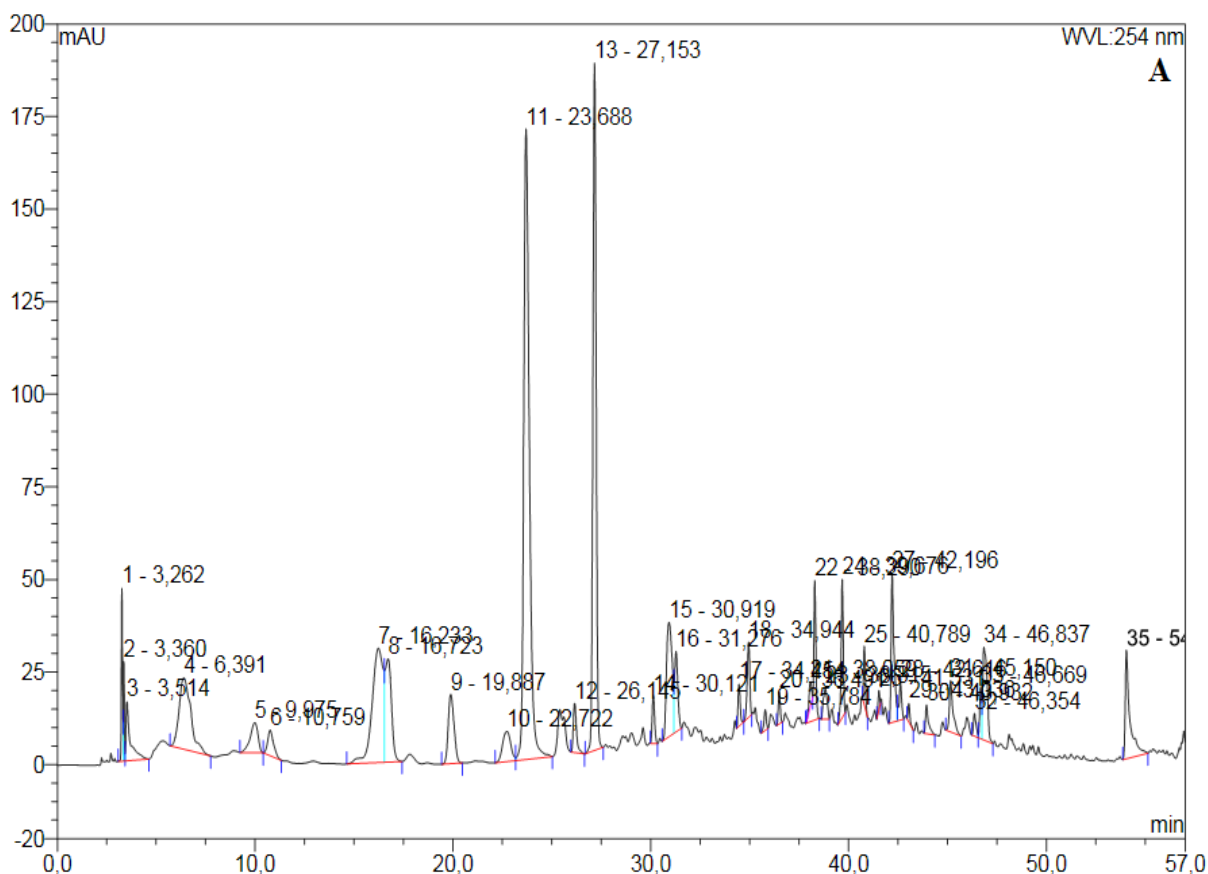
6.2.2. Identificação tentativa dos compostos

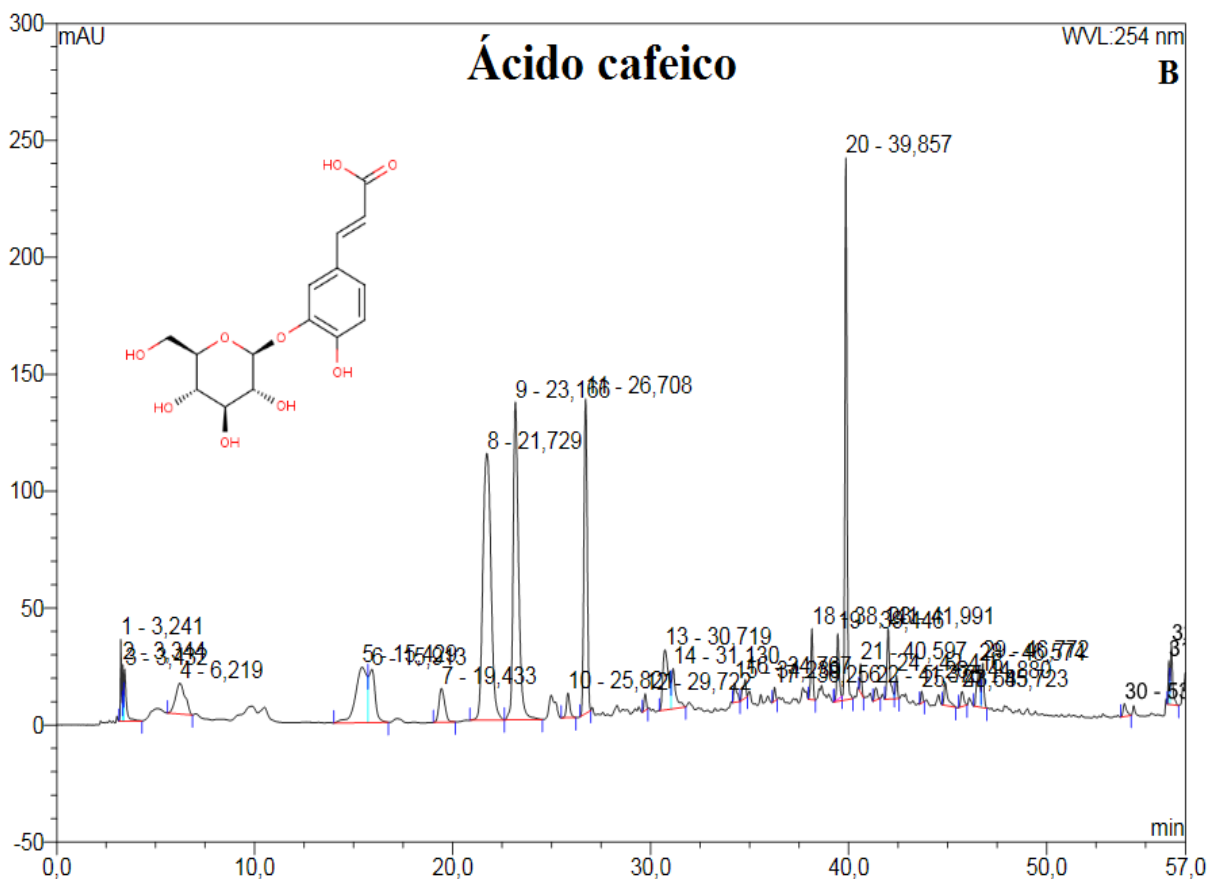
Padrões de compostos fenólicos também foram injetados na mesma condição 7, separadamente e coinjetados com a fração FE2 com o propósito de identificação de substâncias (Fig. 21 e 22).

A partir dos valores de área relativa da injeção da fração FE2 e da coinjeção (FE2 e padrão), obtidos a partir dos cromatogramas com auxílio do programa Chromeleon®, foi calculado o aumento (incremento) da área relativa do pico correspondente àquela substância. O t_R também foi um parâmetro analisado na comparação, além da observação do aparecimento de picos adjacentes.

Na Figura 21, a coinjeção da fração FE2 com ácido cafeico mostrou um t_R bem próximo ao t_R da fração FE2 (39,86 min e 39,68 min). Além disso, a área relativa do pico t_R igual a 39,68 min houve um incremento de 9,68% (11,63% da coinjeção subtraindo 1,95% da fração FE2), identificando o ácido cafeico na fração FE2.

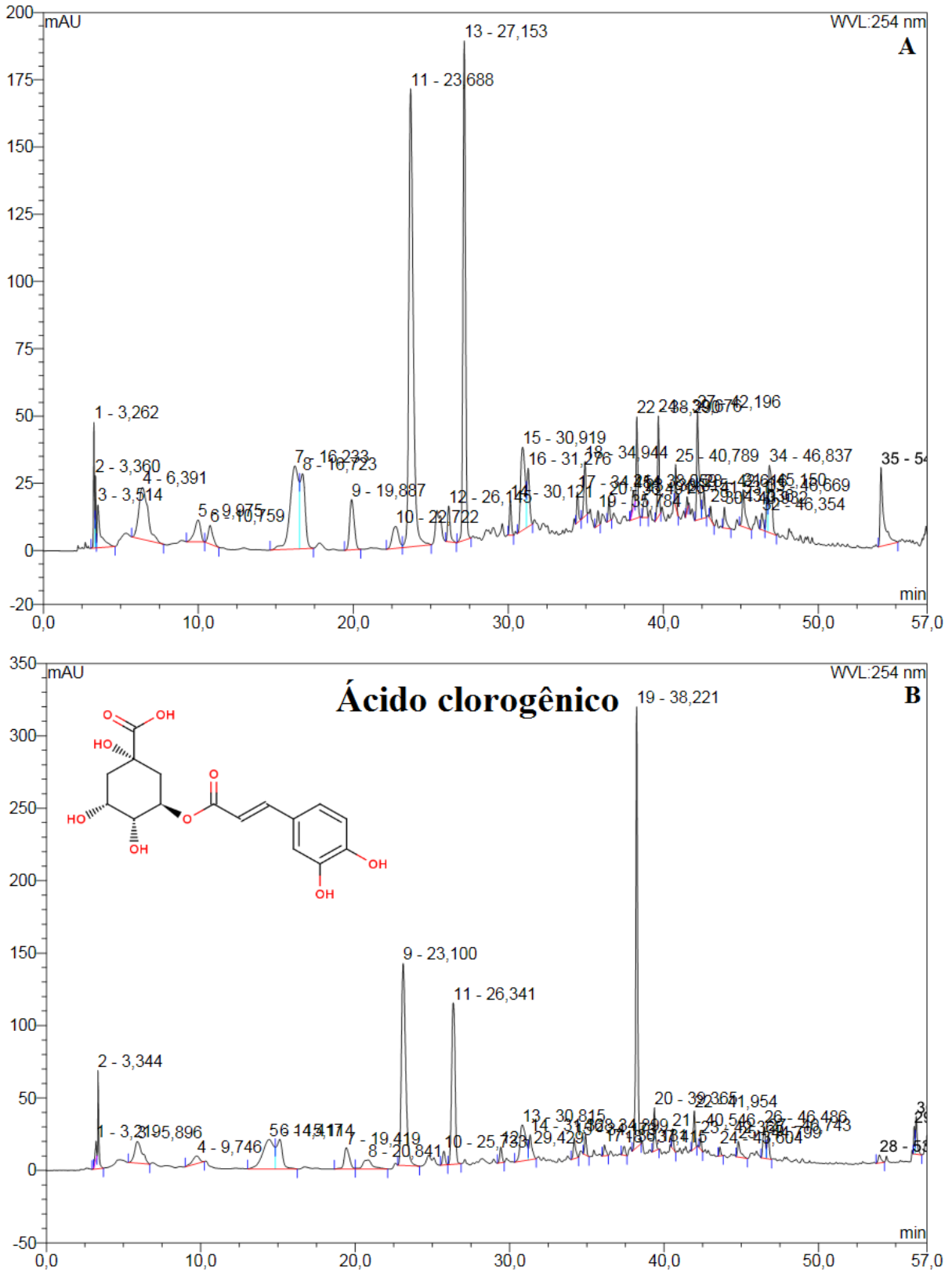
Figura 21. Cromatogramas representativos da fração FE2 (A) e da coinjeção com ácido cafeico (B) eluídos com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH, em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 μm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 μL, no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).





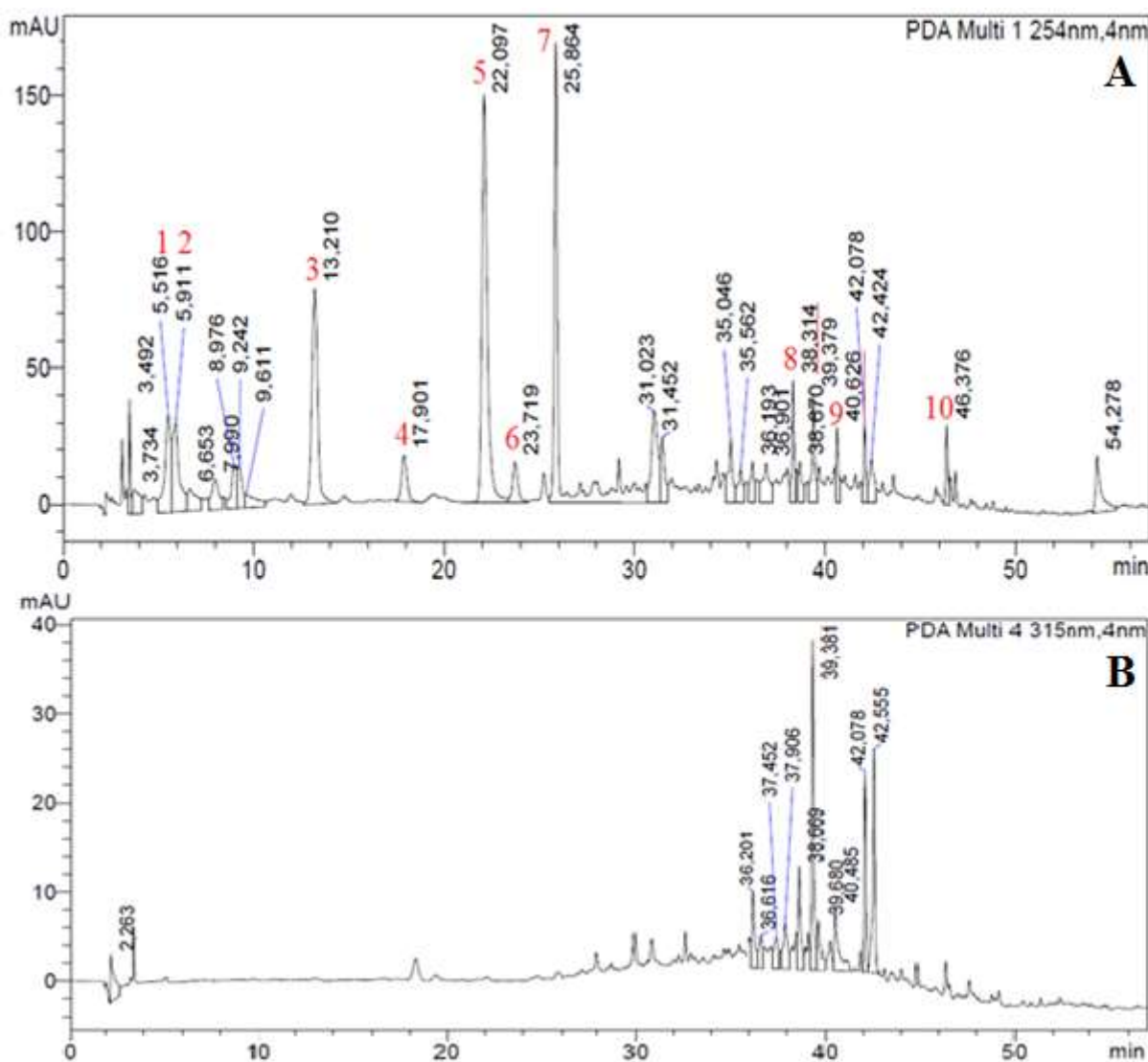
Na Figura 22, a coinjeção da fração FE2 com ácido clorogênico mostrou um t_R bem próximo ao t_R da fração FE2 (38,22 min e 38,29 min). Além disso, a área relativa do pico t_R igual a 38,29 min houve um incremento de 16,04% (18,48% da coinjeção subtraindo 2,44% da fração FE2), identificando o ácido clorogênico na fração FE2.

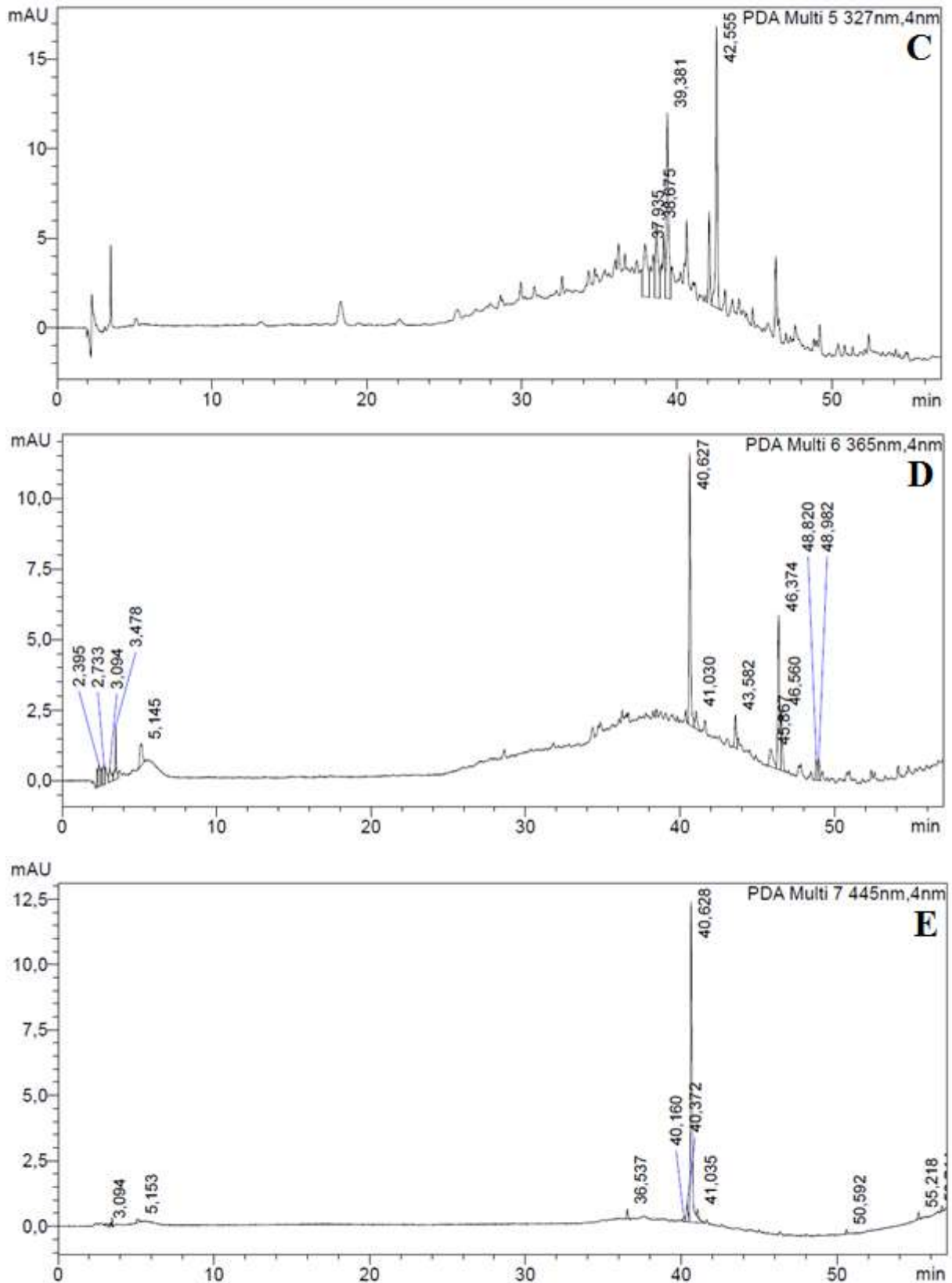
Figura 22. Cromatogramas representativos da fração FE2 (A) e da coinjeção com ácido clorogênico (B) eluídos com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH, em 254 nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL, no cromatógrafo Thermo Scientific (CLAE 2).



Essa mesma condição 7 foi empregada no CLAE 4 (Shimadzu, detector DAD). Foi utilizada a mesma coluna C18 Hydro, mesma fase móvel (H₂O ultrapura e MeOH), mesmo volume de injeção (20 µL) e vazão (1 mL/min). A única variável que foi adicionada foi o forno de coluna a 30°C. Foram obtidos os cromatogramas em diferentes comprimentos de onda (254, 315, 327, 365 e 445 nm - Fig. 23), além dos espectros no UV dos picos.

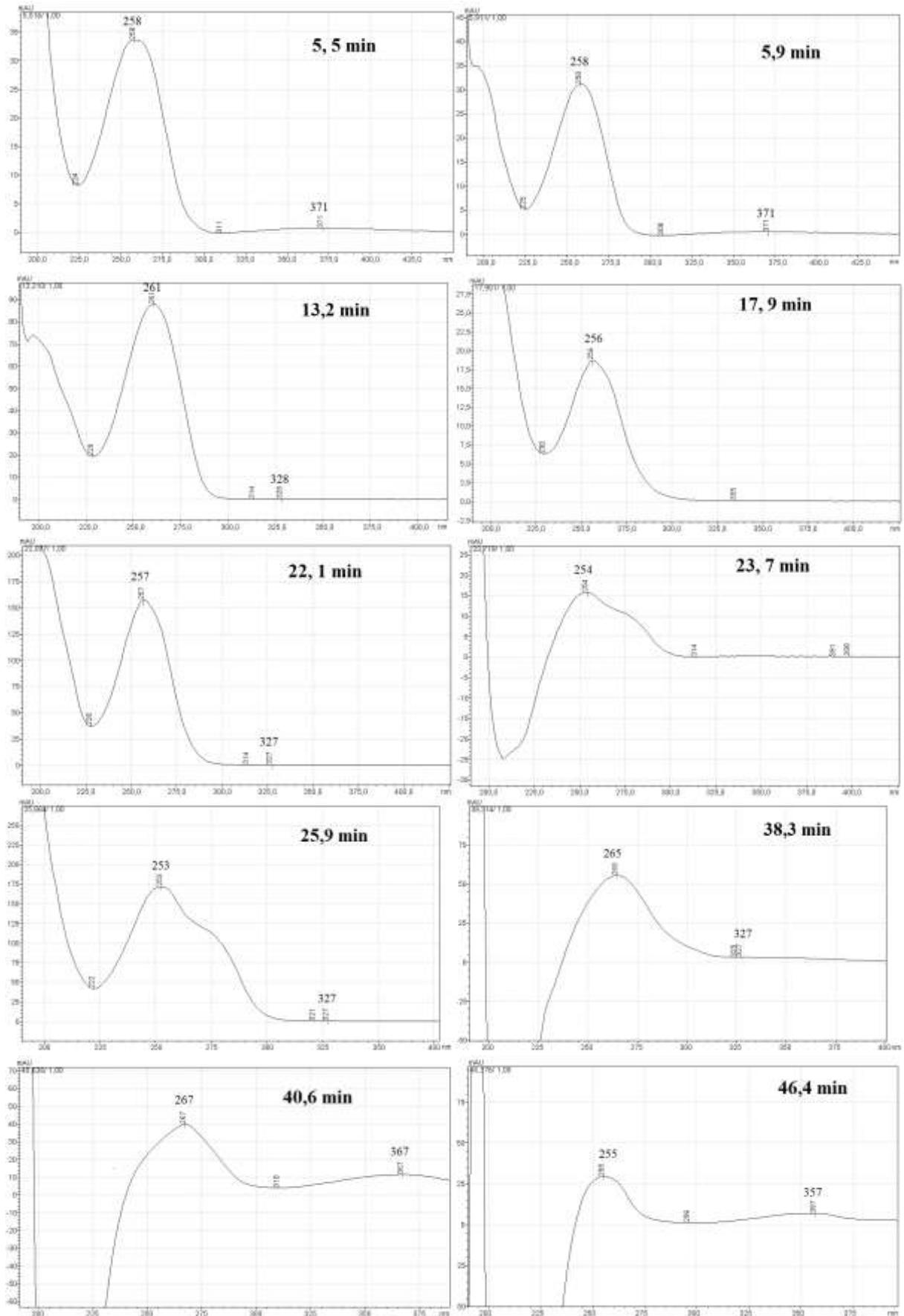
Figura 23. Cromatogramas representativos da fração FE2 eluída com fase móvel composta por H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e MeOH, monitorado em 254 (A), 315 (B), 327 (C), 365 (D) e 445 (E) nm, coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®), MeOH 0% em 10 min, MeOH 0% para 3% em 10 min, MeOH 3% para 19% em 10 min, MeOH 19% para 96% em 25 min e MeOH 96% para 100% em 1 min, (Condição 7), vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL (20 mg/mL), forno de coluna 30°C no cromatógrafo Shimadzu (CLAE 4).





Em seguida, apenas os espectros no UV dos principais picos (t_R igual 5,5; 5,9; 13,2; 17,9; 22,1; 23,7; 25,9; 38,3; 40,6 e 46,4 min) observados no cromatograma em 254 nm (total de 28 picos) foram obtidos (Fig. 24).

Figura 24. Espectros no UV obtidos *online* a partir da fração FE2 do extrato.

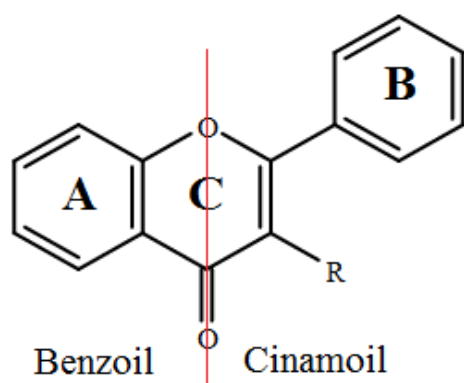


A partir dos espectros no UV obtidos da fração FE2 do extrato, estes foram comparados com espectros no UV de substâncias padrões conhecidas, como, por exemplo, compostos fenólicos.

Sabe-se que os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático, ao qual está unida uma ou mais hidroxila(s). Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os flavonoides são formados por dois anéis aromáticos unidos por heterociclo oxigenado (Fig. 25). Dependendo do grau de hidrogenação e da substituição do heterociclo, são classificados como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas (flavanol), antocianinas, isoflavonas e chalconas. Os flavonoides possuem espectro de absorção característico no UV, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 300-380 nm (banda I) e outro entre 240-280 nm (banda II). Em geral, a banda II pode ser considerada como devido à existência do anel A (benzoil) e a banda I devido ao anel B (cinamoil) (DA COSTA, 2018; JOSÉ-CHAGAS *et al.*, 2014).

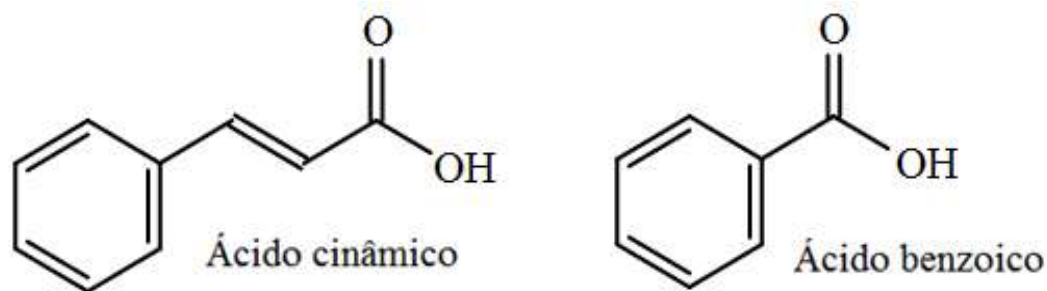
Figura 25. Estrutura de um flavonoide.



Os espectros no UV da catequina, epicatequina e de seus oligômeros (procianidinas) se distinguem do espectro das substâncias anteriores por apresentarem a banda II na faixa de 275-285 nm e não possuírem a banda I, pois não há conjugação entre os anéis A e B, ou seja, a estrutura da catequina não apresenta a carbonila no anel C na posição C4 (DA COSTA, 2018; JOSÉ-CHAGAS *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos chamados de ácidos fenólicos incluem os derivados do ácido cinâmico (C6-C3) e do ácido benzoico (C6-C1) (Fig. 26).

Figura 26. Estruturas do ácido cinâmico e do ácido benzoico.



Os derivados do ácido benzoico incluem o ácido salicílico, ácido gentísico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatequínico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido elágico e ácido siríngico e apresentam espectro de absorção máxima na região UV no λ de 270-280 nm. Já os derivados do ácido cinâmico, que incluem o ácido cinâmico, ácidos *o*-, *m*-, *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico, além das cumarinas, absorvem no UV em duas bandas: ácidos (banda I: 305-330 nm; banda II: 290-300 nm) e cumarinas (banda I: 310-350 nm; banda II: 220-230 nm) (JOSÉ-CHAGAS *et al.*, 2014; SANTANA, 2014; ROBARDS *et al.*, 1999).

Sendo assim, a partir da Figura 24, fica evidente que a maioria dos picos do cromatograma apresenta dois $\lambda_{\text{máx}}$, entre 250-270 nm e entre 320-370 nm, podendo afirmar que são $\lambda_{\text{máx}}$ característicos de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides.

Em seguida, a melhor condição usando a coluna C18 Hydro (Condição 7) foi convertida para um sistema CLUE (coluna CLUE C18 100 x 2,1 mm x 1,8 μm) usando o *software* LCAP, obtendo-se assim uma condição cromatográfica a ser testada no sistema CLUE-QTOF (Waters®) no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-), a fim de identificar as possíveis substâncias encontradas na fração FE2 proveniente do extrato do resíduo da polpa do pequi.

As substâncias foram identificadas a partir dos cromatogramas obtidos no modo negativo e positivo (Fig. 27 e Quadro 2).

Quadro 2. Substâncias identificadas na fração FE2 do extrato do resíduo da polpa do pequi por meio de CLUE-QTOF-EM em modos de ionização negativo e positivo.

t_R (min)	[M-H]⁻ (m/z)	[M+H]⁺ (m/z)	[M+Na]⁺ (m/z)	EM/EM (m/z)	Substância identificada	Erro (ppm)
0,75	341,1109			179/163/101	Dissacarídeo (sacarose)	7,3
3,74	339,1291			180/146	Metil-ramnose- glicose	0,0
5,26	353,1453			179/174	Ácido clorogênico	1,4
5,82	471,1715			308/145	Ramnose- galactose-fucose	0,2
7,46	163,0604			119	Ácido <i>p</i> - cumárico	3,6
8,56	337,1504			175/157	Ácido cumaroilquínico	1,7
9,26	341,1079			323/175	Ácido cafeico- glicose	1,4
11,58	631,2996			471/329	Miricetina- galoil-glicose	0,9
7,5		433,1689		287	Kaempferol- ramnose	1,3
8,54			361,1486	199	Ácido cumaroilquínico- sódio	8,0
8,73		449,1633		287/269	Kaempferol- glicose	1,3
9,78		463,1802		317	Dicafeoil- verbascoside	3,0
9,85		447,1850		289/287	Apigenina- glicuronídeo	1,1

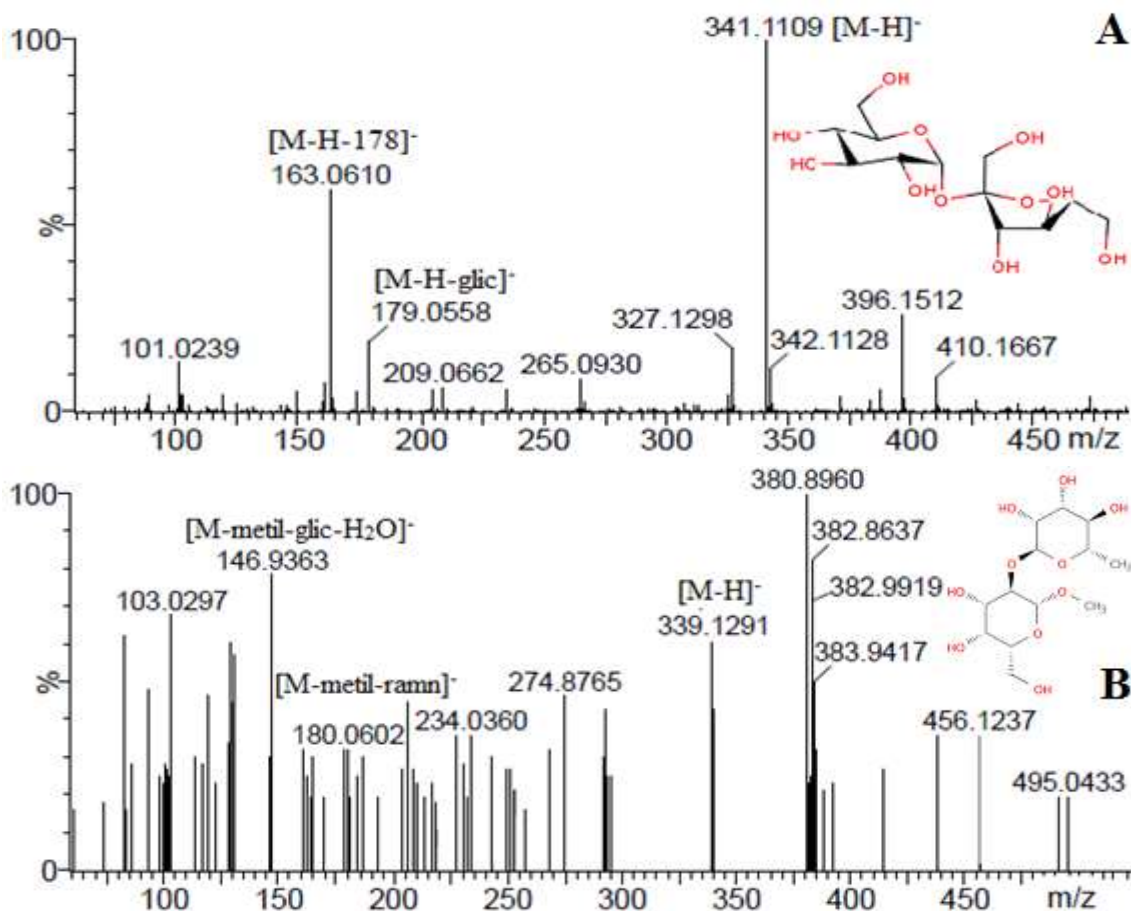
Já foram identificadas substâncias como o ácido gálico (LIMA, 2008; TORRES; SILVA; LIMA, 2016; ROESLER *et al.*, 2008; CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; BREDÁ, 2015; ARARUNA *et al.*, 2013), o ácido *p*-hidroxibenzoico (LIMA, 2008; TORRES; SILVA; LIMA, 2016; ROESLER *et al.*, 2008), o ácido *p*-cumárico (LIMA, 2008; TORRES; SILVA; LIMA, 2016), o ácido elágico e glicosídeos de ácido elágico (LIMA, 2008; TORRES; SILVA; LIMA, 2016; CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; BREDÁ, 2015), o ácido sinápico (LIMA, 2008; TORRES; SILVA; LIMA, 2016), a catequina (LIMA, 2008; TORRES; SILVA; LIMA, 2016), a quercetina e quercetina-3-O-arabinose (ROESLER *et al.*, 2008; ARARUNA *et al.*, 2013), o ácido quínico (ROESLER *et al.*, 2008), o ácido cumaroilquínico (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012; BREDÁ, 2015) e o ácido clorogênico (cafeoilquínico), ácido cafeico e rutina (ARARUNA *et al.*, 2013) na polpa e na casca do pequi.

A partir do Quadro 2 e dos estudos relatos na literatura, a presença de açúcares livres e compostos fenólicos, como derivados de ácidos fenólicos e de flavonoides glicosilados ou não, pode ser confirmada no extrato do resíduo da polpa do pequi. Estas substâncias, exceto os açúcares, tem uma faixa de absorção no UV entre 250-280 nm (banda I) e entre 320-370 nm (banda II).

Diante disso, os espectros no UV obtidos na análise realizada por CLAE-DAD/UV foram comparados aos das substâncias identificadas no sistema CLUE-QTOF-EM.

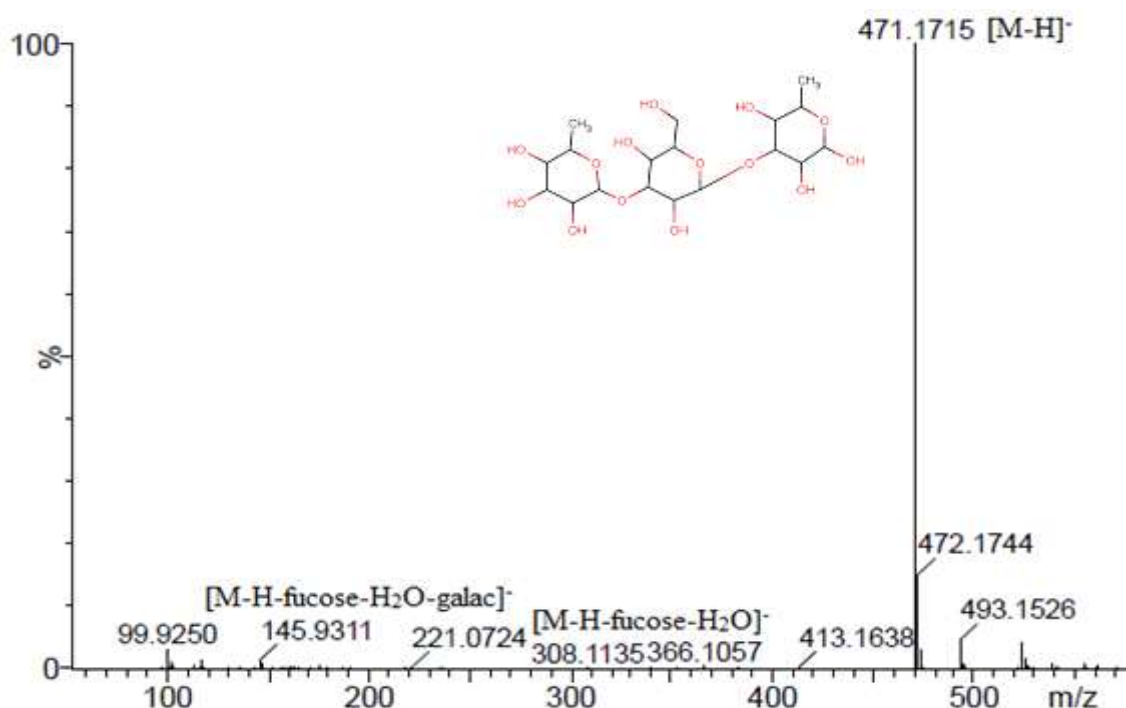
Assim, pode-se afirmar que os picos 1 e 2 (t_R igual a 5,5 e 5,9 min CLAE-DAD/UV) tratam-se da mesma classe de substância, como demonstrado pela sacarose (dissacarídeo) m/z 341,1109 $[M-H]^-$ e pelo metil-2-O- α -ramnopiranosil- β -glicosídeo (metil-ramnose-glicose) m/z 339,1291 $[M-H]^-$ através dos resultados dos espectros de massa e seus fragmentos (m/z 179/163/101 e m/z 180/146, respectivamente) (Fig. 28). No espectro EM/EM, os fragmentos m/z 179/180 referem-se à perda de uma molécula de glicose ou frutose, enquanto o fragmento m/z 146, a perda de ramnose (GEORGELIS; FENCIL; RICHAEEL, 2018). No espectro EM/EM, o fragmento m/z 163 representa uma molécula de frutose.

Figura 28. Espectros de massas (EM/EM) da sacarose (A) e do metil-2-O- α -ramnopiranosil- β -glicosídeo (B).



O íon m/z 471,1715 $[M-H]^-$ (fragmentos m/z 308 e m/z 145) corresponde a substância α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-L-fucose, pico 5, com t_R igual a 22,1 min (CLAE-DAD/UV) (Fig. 29). No espectro EM/EM, o fragmento m/z 308 refere-se à perda de uma molécula de fucose e de água, enquanto o fragmento m/z 145, a perda de fucose, água e galactose.

Figura 29. Espectro de massas (EM/EM) da α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-L-fucose.



O ácido *p*-cumárico, m/z 163,0604 $[M-H]^-$ (fragmento m/z 119) (ABU-REIDAH *et al.*, 2015), e o ácido cumaroilquínico, m/z 337,1504 $[M-H]^-$ (fragmentos m/z 175 e m/z 157), foram identificados no t_R igual a 39,38 min (CLAE-DAD/UV), cujo espectro no UV apresenta $\lambda_{m\acute{a}x}$ em torno de 300 nm. Um aduto com sódio do ácido cumaroilquínico, m/z 361,1486 $[M+Na]^+$ (fragmento m/z 199 $[M+Na-162]^+$), também foi detectado no modo positivo (Fig. 30 e 31). No espectro EM/EM, o fragmento m/z 119 refere-se à perda de uma molécula de gás carbônico, enquanto os fragmentos m/z 175 e m/z 199, a perda do ácido cumárico (PLAZONIC *et al.*, 2009).

Figura 30. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do ácido *p*-cumárico.

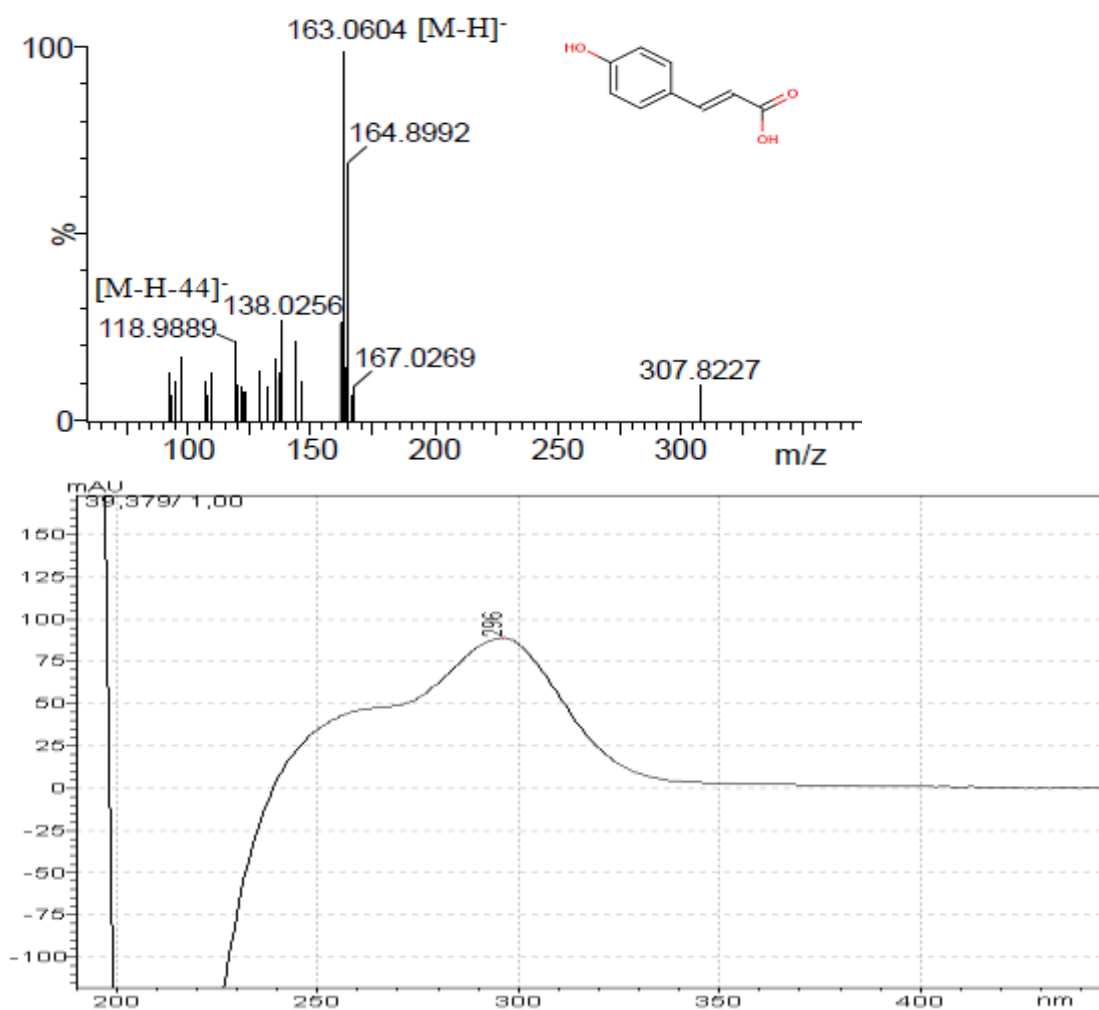
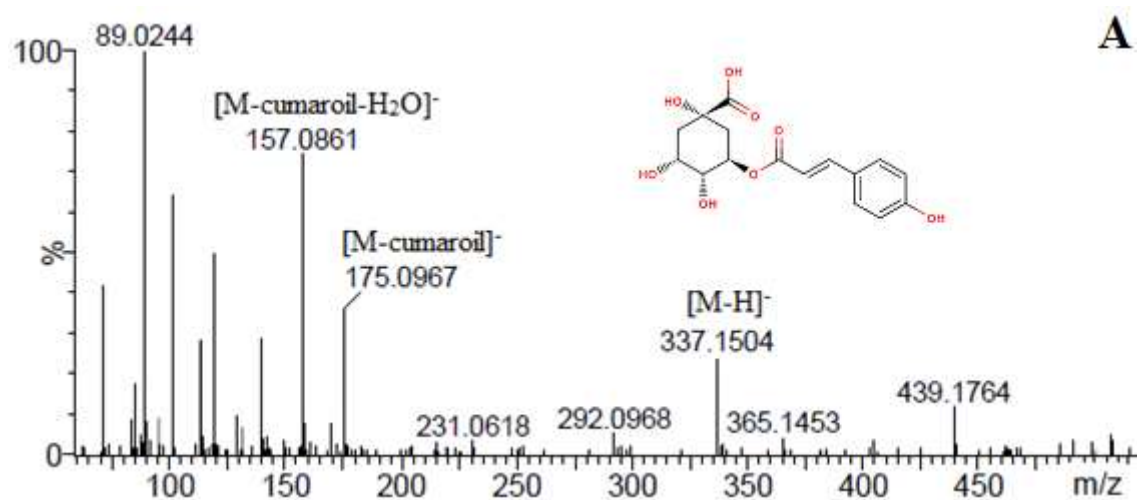
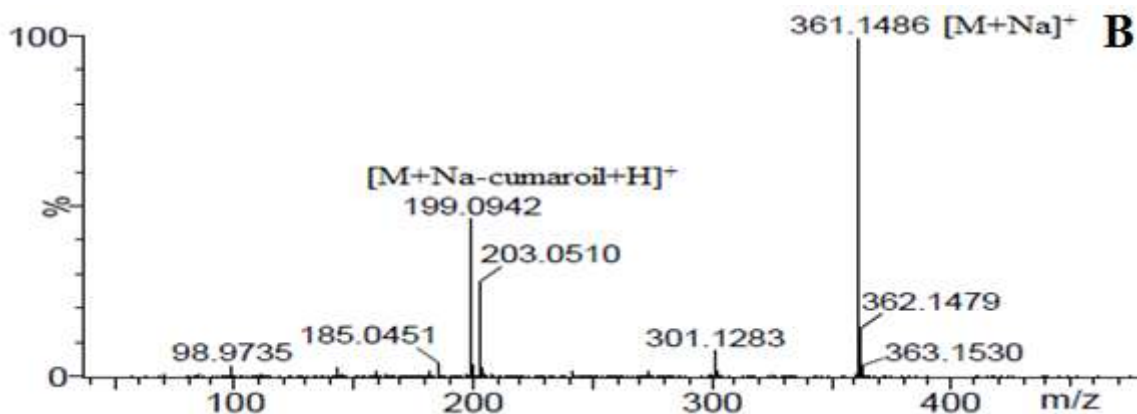


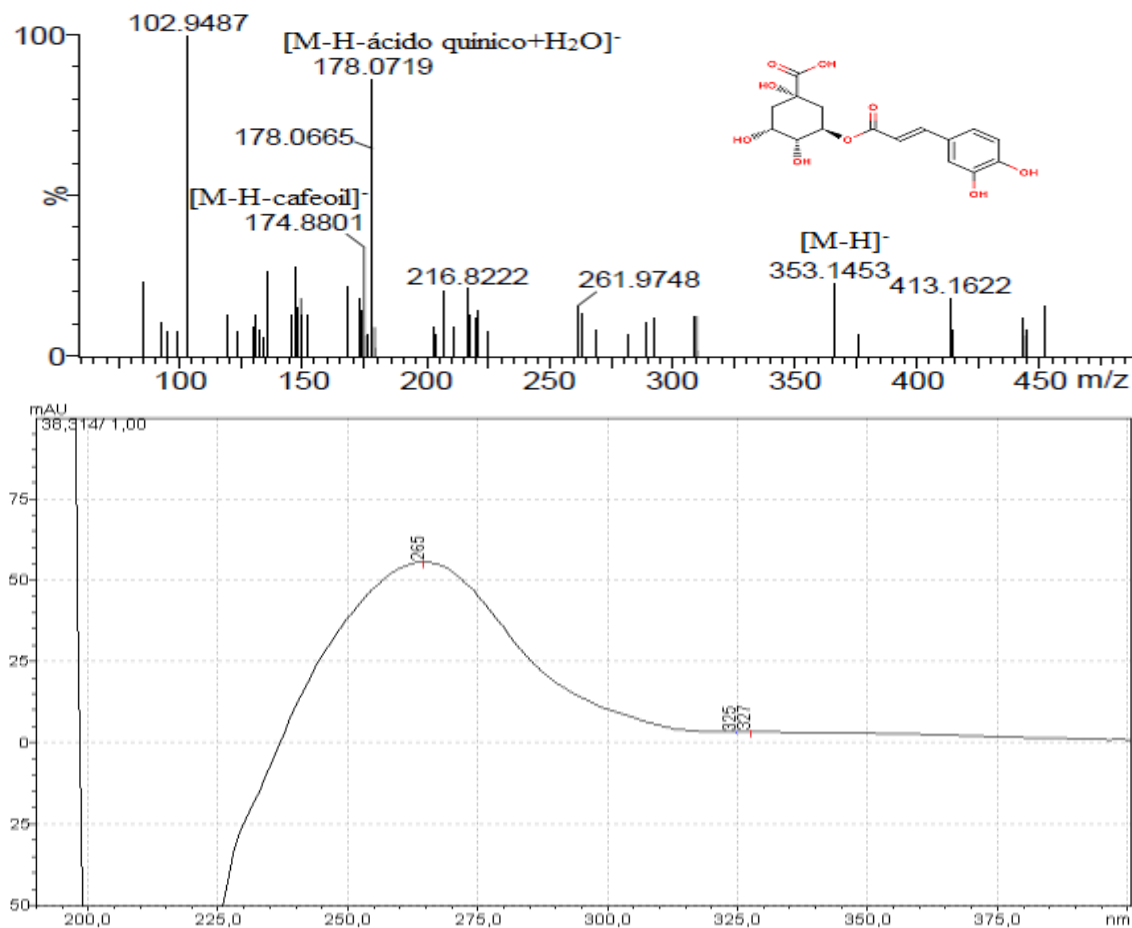
Figura 31. Espectros de massas (EM/EM) do ácido cumaroilquínico no modo negativo (A) e no modo positivo (B).





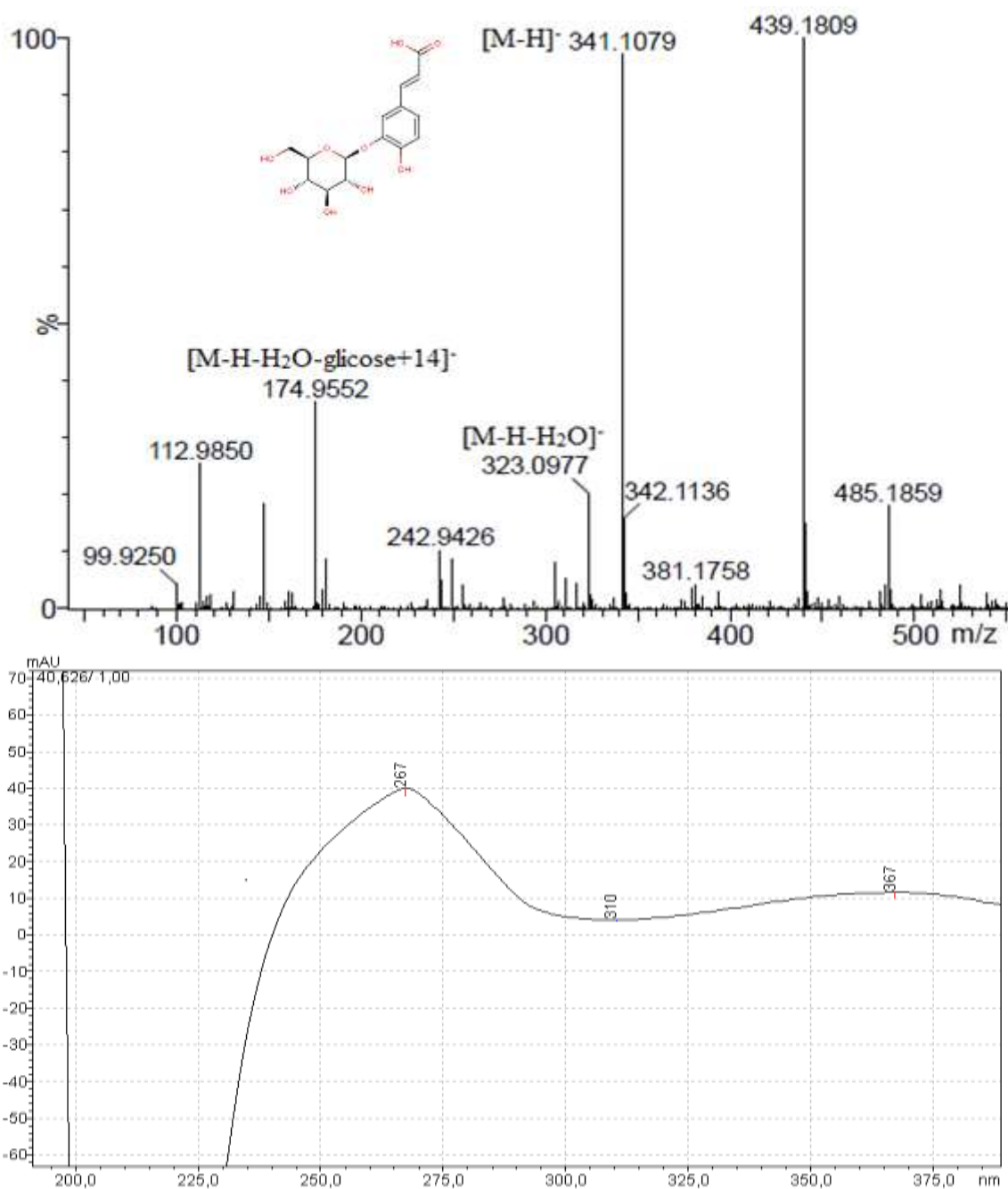
O ácido clorogênico (m/z 353,1453) $[M-H]^-$, cujos fragmentos são m/z 179 e m/z 174, já havia sido sugerido anteriormente pela comparação do t_R da coinjeção. Assim, os espectros de massas e no UV (Fig. 32) confirmam a presença desta substância como sendo o pico 8, t_R 38,3 min (CLAE-DAD/UV), cujo espectro no UV apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ em torno de 327 nm (DE MARIA; MOREIRA, 2004). No espectro EM/EM, os fragmentos m/z 179 e m/z 174 referem-se às perdas das moléculas de ácido quínico e cafeico, respectivamente (CASTRO *et al.*, 2018).

Figura 32. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do ácido clorogênico.



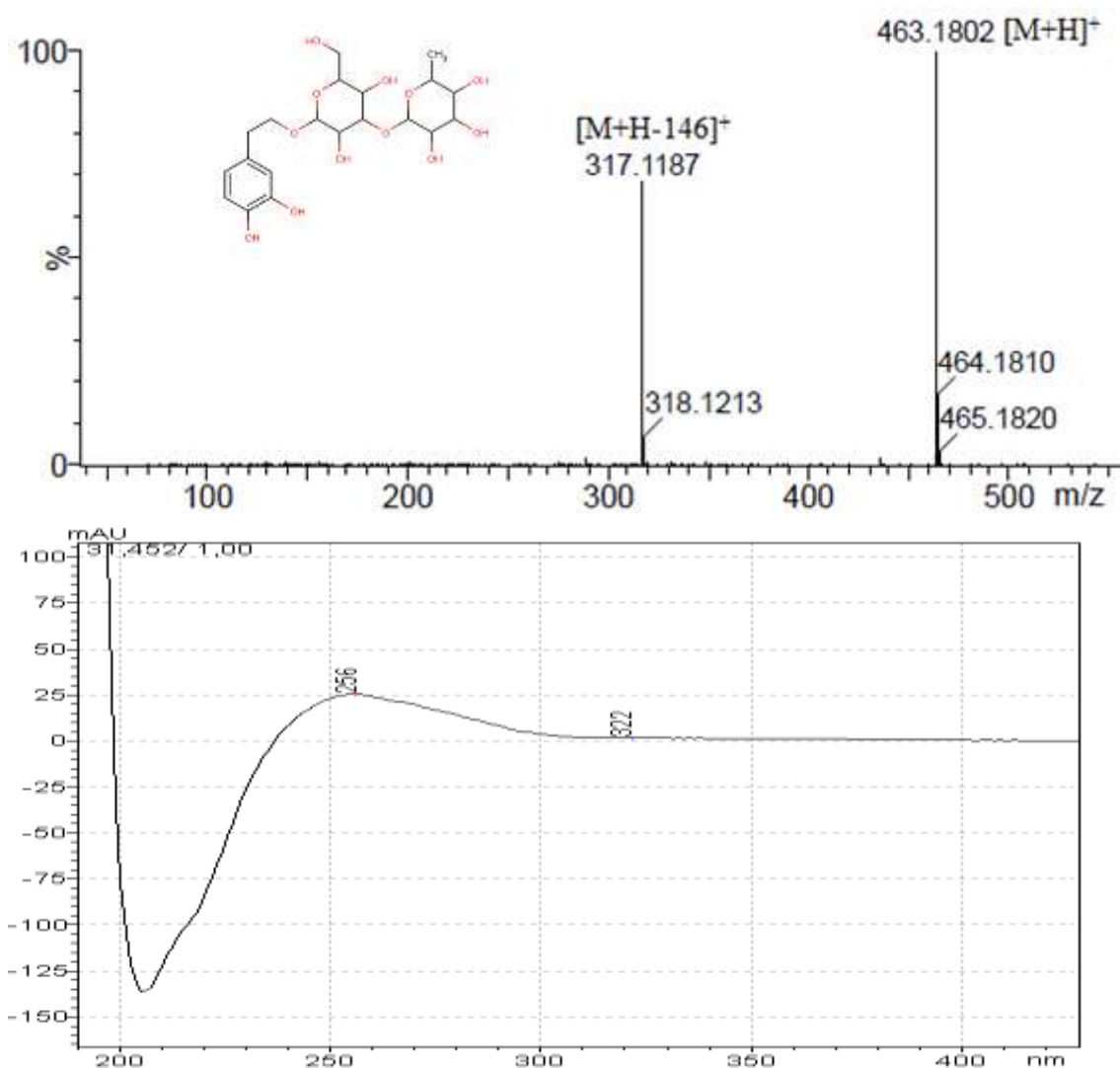
O glicosídeo do ácido cafeico, m/z 341,1079 $[M-H]^-$ (fragmentos m/z 323 e m/z 175) (BIAZOTTO *et al.*, 2019), também já tinha sido sugerido anteriormente pela comparação do t_R da coinjeção. Assim, os espectros de massas e no UV (Fig. 33) confirmam a presença desta substância como sendo o pico 9, t_R 40,6 min (CLAE-DAD/UV). No espectro EM/EM, o fragmento m/z 323 refere-se à perda da molécula de água, enquanto o fragmento m/z 175, a perda de água e glicose, mais 14 unidades.

Figura 33. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do glicosídeo do ácido cafeico.



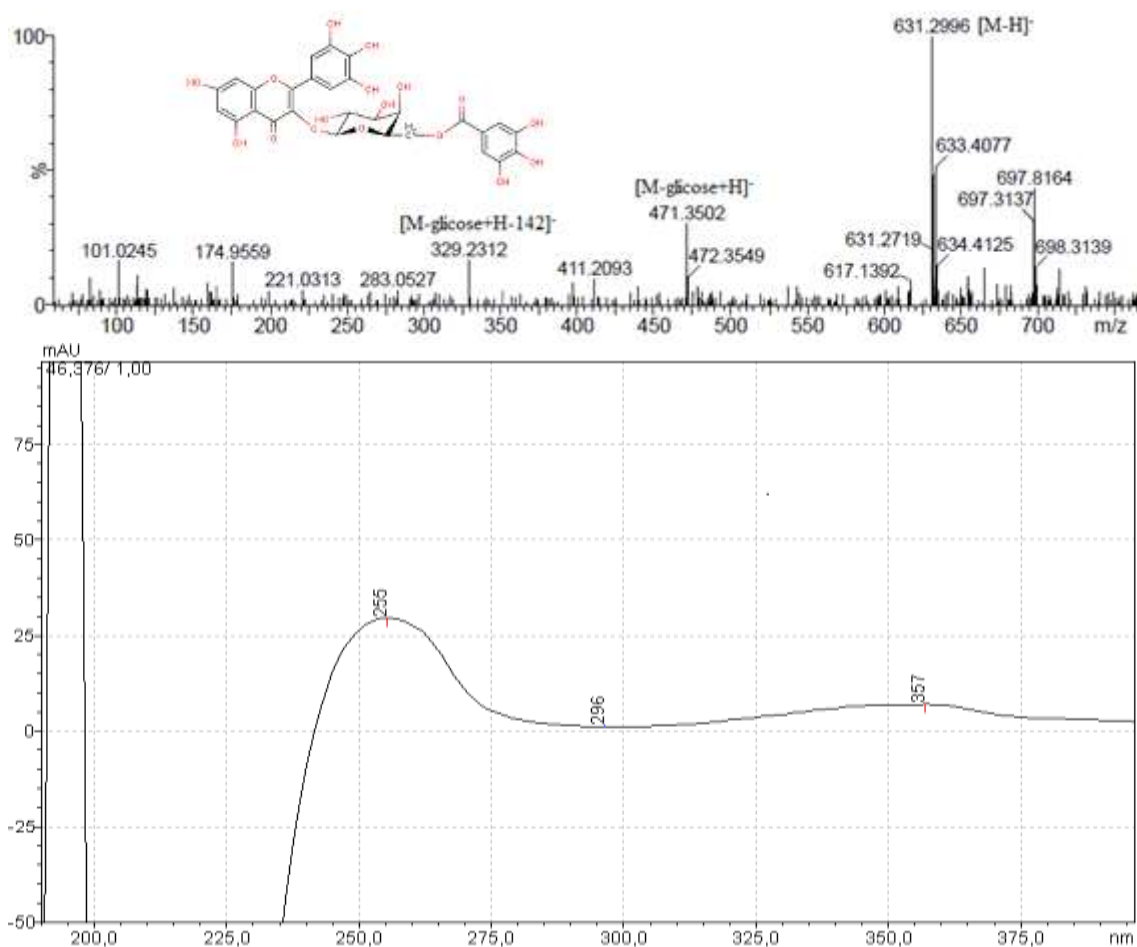
No t_R igual a 31,45 min (CLAE-DAD/UV), foi verificada a substância dicafeoil-verbascoside m/z 463,1802 $[M+H]^+$ (fragmento m/z 317), cujo espectro no UV apresenta duas banda de absorção, com $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 256 e 322 nm (Fig. 34). No espectro EM/EM, o fragmento m/z 317 indica a perda característica de um resíduo de ramnose.

Figura 34. Espectros de massas (EM/EM) e no UV do dicafeoil-verbascoside.



Ainda no modo negativo, no t_R igual a 46,4 min, pico 10 (CLAE-DAD/UV), foi detectada uma substância cujo espectro no UV tem $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 255 e 357 nm. Tal substância pode ser sugerida como miricetina-galoil-glicosídeo m/z 631,2996 $[M-H]^-$ (fragmentos m/z 471 e m/z 329) (ABU-REIDAH *et al.*, 2015) (Fig. 35). No espectro EM/EM, este composto gerou o fragmento m/z 471, que se refere à perda de uma molécula de glicose, seguida pela perda de 142 unidades no fragmento m/z 329.

Figura 35. Espectros de massas (EM/EM) e no UV da miricetina-galoil-glicosídeo.



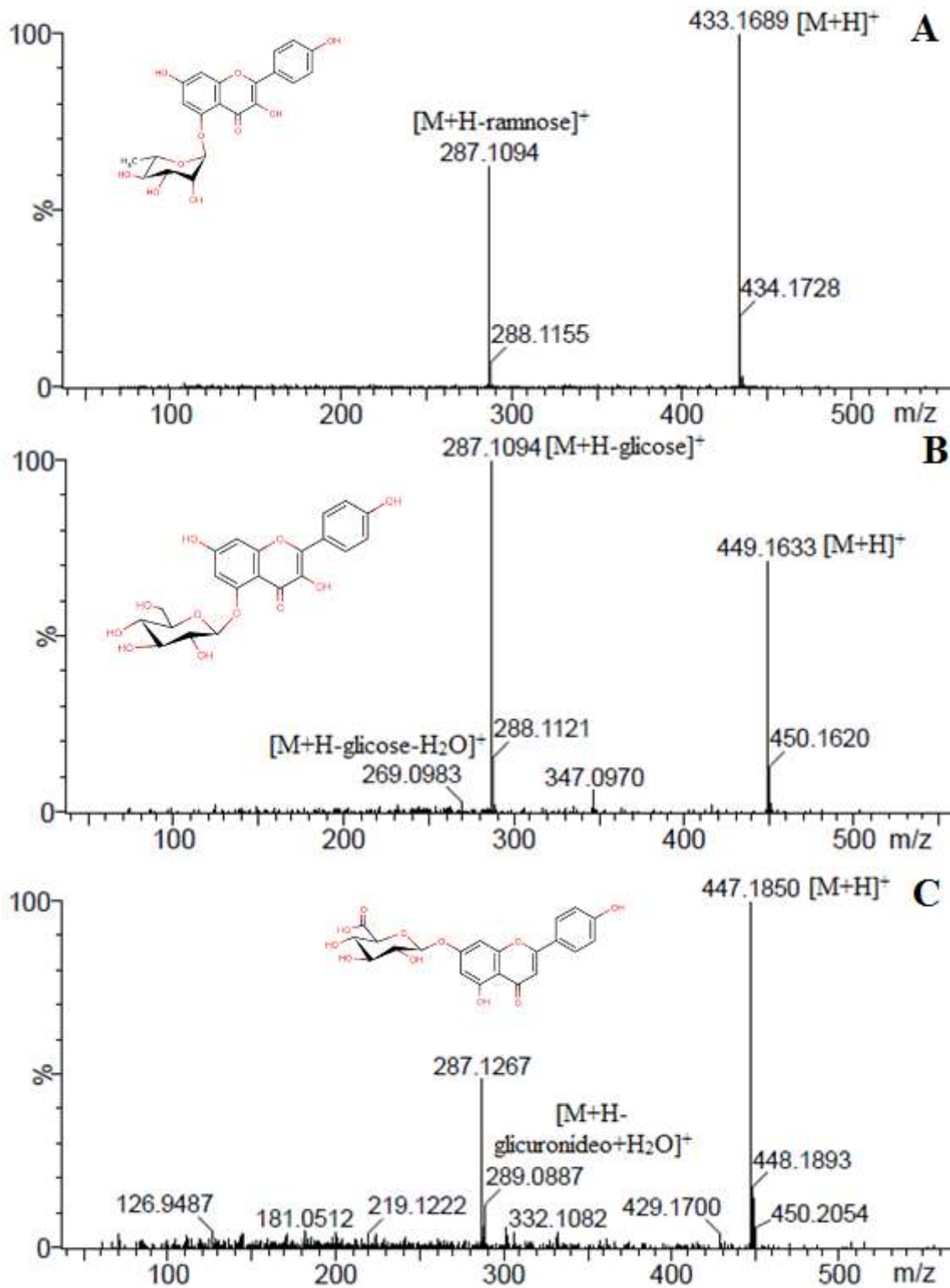
Para as demais substâncias (modo positivo), foi possível confirmar a presença kaempferol-ramnose (m/z 433,1689 $[M+H]^+$), kaempferol-glicose (m/z 449,1633 $[M+H]^+$) e apigenina-glicuronídeo (m/z 447,1850 $[M+H]^+$) (ABU-REIDAH *et al.*, 2015) no extrato analisado, através dos espectros de massas e suas fragmentações (Fig. 36).

Na Figura 36A, no espectro EM/EM, o fragmento m/z 287 indica a perda de uma molécula de ramnose, permanecendo apenas a molécula de kaempferol.

Na Figura 36B, no espectro EM/EM, o fragmento m/z 287 indica a perda de uma molécula de glicose, permanecendo apenas o kaempferol (aglicona), e o fragmento m/z 269, a perda de glicose e água.

Já na Figura 36C, no espectro EM/EM, o fragmento m/z 289 indica a perda de uma molécula de glicuronídeo e água.

Figura 36. Espectros de massas (EM/EM) de kaempferol-ramnose (A), kaempferol-glicose (B) e apigenina-glicuronídeo (C).



7. CONCLUSÕES

A avaliação da toxicidade *in vitro* revelou que o extrato do resíduo da polpa do pequi não foi capaz de romper a membrana das hemácias de carneiro no teste da atividade hemolítica em concentrações iguais ou inferiores a 125 µg/mL. Além disso, o creme base e o fitocosmético à base deste extrato também apresentaram 0% de hemólise, semelhante estatisticamente ao controle negativo. No teste de citotoxicidade pelo método MTT, foi constatado que, nas concentrações de 625 a 20000 µg/mL, o extrato apresentou uma citotoxicidade considerada pouco importante, sendo capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%. Já nas concentrações entre 15,6 a 250 µg/mL, o extrato apresentou ausência de toxicidade, isto porque com um valor de CI_{50} superior a 50%, ficou comprovado que nenhuma das concentrações analisadas foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%. Estes resultados sugerem o uso deste extrato no desenvolvimento de um novo fitocosmético. Em consonância, as análises do fitocosmético à base deste extrato e do creme base nas concentrações de 15,6 a 250 µg/mL, nos três tempos de tratamentos (24, 48 e 72 h), confirmaram a ausência de toxicidade da formulação.

A análise das condições de pré-tratamento do extrato do resíduo da polpa do pequi para posterior avaliação por CLAE evidenciou que a presença de açúcares livres interferiu na detecção dos metabólitos secundários presentes neste extrato. Sendo assim, diferentes condições de EFS foram testadas a fim de minimizar esta interferência. Após a análise da fração FE2, obtida na condição 4 de EFS, ficou evidente que esta fração exibiu um perfil químico adequado da matriz, com os metabólitos bem concentrados e quase a totalidade dos interferentes polares e lipofílicos tinha sido eliminada.

Durante o desenvolvimento do método de CLAE-DAD/UV, diversas condições cromatográficas foram testadas empregando as frações obtidas por EFS. Modificações da fase estacionária (colunas C18 150 e 250 mm e C18 Hydro) e da fase móvel (EtOH e MeOH) foram necessárias para o aperfeiçoamento do método cromatográfico.

Os princípios da GAC, como redução no consumo de solventes por meio do uso de colunas de menor comprimento e a troca de solventes potencialmente danosos por outros mais ambientalmente amigáveis, foram considerados na etapa de desenvolvimento do método cromatográfico. Porém, devido às dificuldades encontradas no emprego do EtOH como fase móvel, foi feita a sua substituição por MeOH. Mesmo assim, o uso da coluna C18 Hydro e o fato da maior parte das análises ter sido realizada empregando-se H₂O ultrapura (considerada um solvente verde), fez com que os conceitos da GAC fossem empregados.

A melhor condição cromatográfica obtida foi a que utilizou H₂O ultrapura acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e MeOH como fase móvel e a coluna C18 Hydro 250 x 4,6 mm x 4 µm (Phenomenex®) como fase estacionária (Condição 7). Esta apresentou uma boa Rs dos picos. Posteriormente, esta mesma condição foi convertida para o sistema CLUE-QTOF-EM que possibilitou identificar algumas possíveis substâncias presentes no extrato do resíduo da polpa do pequi. As substâncias detectadas são da classe dos compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, e os flavonoides (glicosilados ou não), além de açúcares. Ácido clorogênico (m/z 353 [M-H]⁻), glicosídeo do ácido cafeico (m/z 341 [M-H]⁻), ácido *p*-cumárico (m/z 163 [M-H]⁻), miricetina-galoil-glicosídeo (m/z 631 [M-H]⁻), sacarose (m/z 341 [M-H]⁻) e metil-2-O- α -ramnopiranosil- β -glicosídeo (m/z 471 [M-H]⁻) foram algumas das substâncias identificadas. A presença do ácido clorogênico e do ácido cafeico no extrato do resíduo da polpa do pequi foi comprovada pela coinjeção destes padrões no sistema CLAE-DAD/UV, além da identificação tentativa por CLUE-QTOF-EM. Além disso, a análise do fitocosmético por CLAE-DAD/UV permitiu afirmar que a incorporação do extrato foi eficiente e que este se manteve estável, sem sinal de degradação, na formulação cosmética.

Sendo assim, foi possível afirmar que a condição cromatográfica desenvolvida foi eficaz na Rs dos picos, bem como na detecção e identificação das substâncias por meio dos espectros no UV e de massas.

REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M. *et al.* HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chem.**, v. 166, p.179-191, 2015.
- ADSUL, M. G. *et al.* Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 6, p. 4304-4312, 2011.
- ALLEN J. R. L.; POPOVICH N.; ANSEL H. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALMEIDA, S. P. *et al.* Cerrado: espécies vegetais úteis. **EMBRAPA-CPAC**, Planaltina, 1998, 464 p.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e buriti: importância alimentar à população dos Cerrados**. Brasília: Documentos, 1994, p.1-38.
- AMARAL, L. F. B. **Avaliação da segurança e eficácia do extrato de *Caryocar brasiliense* obtido por CO₂ supercrítico e sua aplicação como ativo para formulações antissépticas.**

2014. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

ANASTAS, P. T.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010.

ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Acc. Chem. Res.**, v. 35, n. 9, p. 686-694, 2002.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. **Green chemistry: theory and practice**. Oxford University Press: Oxford, 1998.

ANGELO, H. *et al.* Valoração econômica da depredação do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Cerrado brasileiro. **Sci. For.**, v. 40, n. 93, p. 35-45, 2012.

ARARUNA, M. K. A. *et al.* Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. **Eur. J. Integr. Med.**, v. 5, n. 2, p. 178-183, 2013.

BEZERRA, J. C. B. *et al.* Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of the Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002.

BIAZOTTO, K. R. *et al.* Brazilian biodiversity fruits: discovering bioactive compounds from underexplored sources. **J. Agric. Food Chem.**, v. 67, n. 7, p. 1860-1876, 2019.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Cienc. Cult.**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016.

BORGES, R. C. G.; GARVIL, M. P.; ROSA, G. A. A. Produção de fitocosméticos e cultivo sustentável da biodiversidade no Brasil. **e-RAC**, v. 3, n. 1, 2013.

BREDA, C. A. **Emprego de extratos de folhas e resíduos de espécies frutíferas do Cerrado como fungicidas naturais em filmes e revestimentos comestíveis**. 2015. 202 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

CARRAZZA, L. R.; D'ÁVILA, J. C. C. **Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*)**. 2. ed. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2010, 48 p.

CARVALHO, M. C.; BURGER, O. N. **Contribuição ao estudo do pequi de Brasília**. (Coleção Estudo e Pesquisa Alimentar, 50). Brasília: SPS, 1960, 15 p.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A.; VALÉRIO, H. M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodron urundeuva* fr. Alemão. **BioFar**, v. 8, n. 2, p. 97-103, 2012.

CASTRO, A. C. C. M. *et al.* Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chem.**, v. 246, p. 48-57, 2018.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by CLAE-DAD-EM/EM, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 23, p. 5884-5892, 2012.

CHORILLI, M. *et al.* Toxicologia dos cosméticos. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 26, n. 1, p. 144-154, 2007.

COSTA, C. C.; GUILHOTO, J. J. M.; IMORI, D. Importância dos setores agroindustriais na geração de renda e emprego para a economia brasileira. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, v. 51, n. 4, p. 787-814, 2013.

COUTO, E. M. **Utilização da farinha da casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na elaboração de pão de forma.** 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

DALGÊ, J. J. **Estudo da capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-hemolítica do gengibre (*Zingiber officinale*).** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

DA COSTA, E. A. **Desenvolvimento de um método de análise de catequina e quercetina em extratos de espécies vegetais e fitoterápicos.** 2018. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

DA COSTA, G. V. **Atividade antibacteriana, antioxidante e citotóxica *in vitro* do extrato etanólico da entrecasca da planta *Ouratea hexasperma* (EEOH) (A. St.-Hill) Baill var. *planchonii* Engl.** 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

DE ASSIS, C. S. **Avaliação dos efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroetanólico dos frutos de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) em camundongos *Swiss*.** 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

DE LIMA, C. C. **Estudo químico e avaliação do potencial biológico de extratos e compostos de folhas e caule de *Myrciaria ferruginea* O. Berg (Myrtaceae).** 2016. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DE MORAES, S. L. *et al.* Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT: Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 4, p. 58-73, 2017.

DIDASKALOU, C. *et al.* Valorisation of agricultural waste with an adsorption/nanofiltration hybrid process: from materials to sustainable process design. **Green Chem.**, v. 19, n. 13, p. 3116-3125, 2017.

EPSTEIN, H. Skin care products. *In*: EPSTEIN, H. **Handbook of cosmetic science and technology.** 3rd ed. Estados Unidos: Informa Healthcare, 2009. chap. 11, p. 121-134.

FERREIRA, V. G. *et al.* Online extraction coupled to liquid chromatography analysis (OLE-LC): eliminating traditional sample preparation steps in the investigation of solid complex matrices. **Anal. Chem.**, v. 88, n. 17, p. 8421-8427, 2016.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 1043, p. 44-62, 2017.

FONSECA, M. C. M. **Epamig pesquisa, produção de plantas medicinais para aplicação no SUS.** Espaço para o produtor. Viçosa, 2012.

FRANCO, L. G. **Cromatografia verde.** 2015. 37 f. Monografia (Licenciatura em Química) - Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2015.

FUNARI, C. S. *et al.* A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting. **J. Chromatogr. A**, v. 1354, p. 34-42, 2014.

FUNARI, C. S. *et al.* Metabolomics, an optimized approach for the rational exploitation of Brazilian biodiversity: state of the art, new scenarios, and challenges. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, pp.1605-1609, 2013.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends Anal. Chem.**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GEORGELIS, N.; FENCIL, K.; RICHAEAL, C. M. Validation of a rapid and sensitive HPLC/MS method for measuring sucrose, fructose and glucose in plant tissues. **Food Chem.**, v. 262, p. 191-198, 2018.

GOLDEMBERG, J. Atualidade. "Perspectivas no uso de biomassa para geração de energia." **Rev. Virtual Quim**, v. 9, n.1, p.15-28, 2017.

GONÇALVES, L. G. **Produção de amilases de *Rhizopus microsporus var. oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.** 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. The current revolution in column technology: how it began, where is it going? **J. Chromatogr. A**, v. 1228, p. 2-19, 2012.

HORST, F. F. **Estudo fitoquímico, atividades biológicas e propriedades antioxidantes da espécie vegetal *Chusquea pinifolia* Ness (Ness) (Poaceae).** 2018. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores.** 1. ed. EdUFSCar: São Carlos, 2003, 152 p.

HUANG, Y. H; SHANG, B. Y; ZHEN, Y. S. Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 26, p. 3980-3984, 2005.

IHA, S. M. *et al.* Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2016. **Pevs 2016: produção da silvicultura e da extração vegetal alcança R\$ 18,5 bilhões.** Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/16981-pevs-2016-producao-da-silvicultura-e-da-extracao-vegetal-alcanca-r-18-5-bilhoes.html>. Acesso: 18 jan 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Diretoria de pesquisa, coordenação de agropecuária, produção da extração vegetal e da Silvicultura.** Rio de Janeiro, v. 22, p. 1-47, 2007.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Biodiversidade - Cerrado.** Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cbc/conservacao-da-biodiversidade/biodiversidade.html>. Acesso em: 02 abr. 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO-10993-4: biological evaluation of medical devices. **part 4: selection of testes for interactions with blood.** Geneva: ISO, 2017.

JOSÉ-CHAGAS, F. N. *et al.* Aspectos químicos e ecológicos de espécimes masculinos e femininos de *Cecropia* Loefl. (Urticaceae). **Rev. Virtual Quim.**, v. 6, n. 2, p. 432-452, 2014.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas.** São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da Flora, 2014.

LAMOUNIER, K. F. R. **Produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Galactomyces geotrichum* e *Saccharomyces cerevisiae*.** 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

LESELLIER, E.; WEST, C. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography - A critical review. **J. Chromatogr A.**, v.1382, p. 2-46, 2015.

LEÃO, D. P. **Avaliação comparativa do potencial de farelo de trigo comercial e pericarpo de pequi como substratos na produção de fibras com capacidade antioxidante.** 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LUQUE, R.; CLARK, J. H. Valorisation of food residues: waste to wealth using green chemical technologies. **Sustain. Chem. Process.**, v. 1, n. 1, p. 10, 2013.

LYRIO, E. S. *et al.* Recursos Vegetais em Biocosméticos: Conceito Inovador de Beleza, Saúde e Sustentabilidade. **Natureza Online**, v. 9, n. 1, p. 47-51, 2011.

MARIANO-DA-SILVA, S. *et al.* Caracterização química de frutos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de três municípios do Estado de Goiás. **Rev. Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 4, p. 771-777, 2009.

MAYER, C. R. M. *et al.* **Avaliação da composição química de óleo e tortas da polpa e da amêndoa de pequi obtidos por prensagem mecânica associada a aplicação de ultrassom.** In: XI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages e V Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos, 2016, São José do Rio Preto. Anais do XI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages & V Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos, São José do Rio Preto, 2016, p. 1-5.

MEDAETS, J. P. *et al.* **Agricultura familiar e uso sustentável da agrobiodiversidade nativa.** Brasília: Programa Biodiversidade Brasil Itália, 2006, 172 p.

MITTERMEIER, R. A. *et al.* **Hotspots Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.** México: CEMEX, Conservation International, 1999, 431 p.

MOREIRA, L. C. **Avaliação de alguns aspectos de toxicidade e eficácia do extrato etanólico de *Eugenia dysenterica* DC. para uso dermatocósmico.** 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

ONUMA, Y. *et al.* Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Manual de Oslo: Diretrizes para a coleta e interpretação de dados sobre inovação.** Paris: OCDE, 2005.

OLIVEIRA, E. **Exploração de espécies nativas como uma estratégia de sustentabilidade socioambiental - o caso do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em Goiás.** 2006. 294 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

PEGORIN, G. S. **Desenvolvimento e avaliação de fitocosméticos enriquecidos com *Caryocar brasiliense* Camb.** 2017. 56 f. Monografia (Bacharel em Engenharia Biotecnológica) - Universidade Estadual Paulista, Assis, 2017.

PEIXOTO, A. R. O pequi e a lavoura no Cerrado. In: PEIXOTO, A. R. (ed.). **Plantas oleaginosas arbóreas.** São Paulo: Nobel, 1973, p. 197-226.

PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae.** 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PFALTZGRAFF, L. A. *et al.* Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. **Green Chem.**, v. 15, n. 2, p. 307-314, 2013.

PLAZONIC, A. *et al.* Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, p. 2466-2490, 2009.

PŁOTKA, J. *et al.* Green chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1307, p.1-20, 2013.

PRAT, D. *et al.* CHEM21 selection guide of classical - and less classical-solvents. **Green Chem.**, v. 18, p. 88-296, 2016.

POZO, O. V. C. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do Cerrado no norte de Minas Gerais.** 1997. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Quim. Nova**, v. 20, n. 1, p. 83-88, 1997.

RIBEIRO, R. F. **Pequi o rei do Cerrado.** Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000, p. 62.

ROBARDS, K. *et al.* Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.

RODRIGUES, L. M. **Desenvolvimento e estudo de estabilidade preliminar de emulsões óleo/água (O/A) a base de óleos vegetais para prevenção e/ou adjuvante no tratamento de úlceras por pressão.** 2013. 45 f. Monografia (Bacharel em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem.**, v. 110, n. 3, p. 711-717, 2008.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do Cerrado. **Cienc. Tecnol. Alim.**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SACCARO JUNIOR, N. L. **Desafios da bioprospecção no Brasil.** Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2011.

SANDRA, P. *et al.* Green chromatography (part 1): introduction and liquid chromatography. **LCGC Eur.**, v. 23, n. 5, p.1-12, 2010.

SANTANA, D. A. **Análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante em cachaças baianas.** 2014. 162 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

SANTOS, F. S. *et al.* A cultura do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Acta Iguazu**, v. 2, n. 3, p. 46-57, 2013.

SANTOS, M. J. T. **Aproveitamento de resíduos da indústria de óleos vegetais produzidos na Amazônia**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. **CERRADO: Ecologia, Biodiversidade e Conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005, 439 p.

SIMÕES, M. O. C. *et al.* **Farmacognosia - do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SOUSA, F. C. *et al.* Parâmetros físicos e físico-químicos da polpa de pequi. **Revista Verde**, v. 6, n. 1, p. 12-15, 2012.

SOUSA, K. A. *et al.* Bioeconomia na Amazônia: uma análise dos segmentos de fitoterápicos & fitocosméticos, sob a perspectiva da inovação. **Fronteiras: J. Soc. Technol. Environ. Sci.**, v. 5, n. 3, p. 151-171, 2016.

SOUZA, A. D. V. *et al.* Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 44, p. 1328-1335, 2009.

SOUZA, I. D. S. **Prospecção no setor cosmético de cuidados com a pele: inovação e visão nas micro, pequenas e médias empresas**. 2015. 459 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

STRASSBURG, B. B. N. *et al.* **Combinação de políticas pode evitar extinções de proporções históricas projetadas para o Cerrado, mostra estudo coordenado por brasileiros, publicado na Nature Ecology and Evolution**. Rio de Janeiro: Instituto Internacional para Sustentabilidade, 2017. Disponível em: <http://www.iis-rio.org/noticia/75>. Acesso em: 20 out. 2017.

SUTTON, A. T. *et al.* Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography-searching for alternatives to organic solvents. **Anal. Bioanal. Chem.**, p. 1-9, 2018.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J. Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry. **TrAC - Trends Anal. Chem.**, v. 35, p. 67-73, 2012.

TORRES, L. R. O.; SILVA, A. M. O; LIMA, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of canned pequi pulp (*Caryocar* spp). **Científica**, v. 44, n. 4, p. 493-501, 2016.

TUCK, C. O. *et al.* Valorization of biomass: deriving more value from waste. **Science**, v. 337, n. 6095, p. 695-699, 2012.

TSUBOY, M. S. *et al.* In vitro evaluation of the genotoxic activity and apoptosis induction of the extracts of roots and leaves from the medicinal plant *Coccolobamollis* (Polygonaceae). **J. Med. Food**, v. 13, n. 3, p. 503-508, 2010.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM (UNEP) - DIVISION OF TECHNOLOGY, I. AND E. (DTIE). **Converting Waste Agricultural Biomass into a Resource** United Nations Environmental Programme. Osaka/Shiga: 2009. Disponível em: http://www.unep.org/ietc/Portals/136/Publications/WasteManagement/WasteAgriculturalBiomassEST_Compendum.pdf. Acesso em: 18 jan 2018.

VERA, R. A. *et al.* Caracterização física e química de frutos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no Estado de Goiás, Brasil. **Pesqui. Agropecu. Trop.**, v. 37, n. 1, p. 93-99, 2007.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

WELCH, C. J. *et al.* Greening analytical chromatography. **TrAC - Trends Anal. Chem.**, v. 29, n. 7, p.667-80, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1 - CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A23C398

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Numero do cadastro: A23C398
 Usuário: Lucinéia Santos
 CPF/CNPJ: 096.305.488-01
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético/CTA
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Caryocar brasiliense
 Os resíduos do pequi: casca e torta da polpa.

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Avaliação do potencial farmacológico e toxicológico dos extratos da **Caryocar brasiliense Camb.**

Equipe

Lucinéia Santos	Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho - Faculdade
Amanda de Andrade Machado	Faculdade de Ciências e Letras Unesp - Assis
Amanda Agustini de Souza	Faculdade de Ciências e Letras - Unesp Assis
Mariana Bittencourt Ibe	Faculdade de Ciências e Letras Unesp Assis
Giovana Sant'Ana Pegorin	Faculdade de Ciências Farmacéuticas

Data do Cadastro: 26/10/2018 17:17:19
 Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:21 de 26/10/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - SISGEN