



TAMARA REZENDE MARQUES

**EXTRATO DE BAGAÇO DE ACEROLA:
INIBIÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS, AÇÃO
ANTIOXIDANTE E INSETICIDA**

LAVRAS - MG

2016

TAMARA REZENDE MARQUES

**EXTRATO DE BAGAÇO DE ACEROLA: INIBIÇÃO DE ENZIMAS
DIGESTIVAS, AÇÃO ANTIOXIDANTE E INSETICIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa

Coorientador

Prof. Geraldo de Andrade Carvalho

Coorientador

Prof. Raimundo Vicente de Sousa

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Marques, Tamara Rezende.

Extrato de bagaço de acerola: inibição de enzimas digestivas,
ação antioxidante e inseticida : Inibidores de enzimas digestivas,
ação antioxidante e inseticida do bagaço de acerola / Tamara
Rezende Marques. – Lavras : UFLA, 2016.

125 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Angelita Duarte Corrêa.

Bibliografia.

1. Malpighia emarginata. 2. Compostos fenólicos. 3. Espécies
reativas. 4. Ratos. 5. Lagarta do cartucho. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

TAMARA REZENDE MARQUES

**EXTRATO DE BAGAÇO DE ACEROLA: INIBIÇÃO DE ENZIMAS
DIGESTIVAS, AÇÃO ANTIOXIDANTE E INSETICIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2016.

Dr. Chrystian Araújo Pereira	UFLA
Dra. Juliana Freire Mesquita	UFLA
Dra. Luciana Lopes Silva Pereira	UFLA
Dra. Martha Elisa Ferreira de Almeida	UFV/CRP

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa
Orientadora

Prof. Geraldo de Andrade Carvalho
Coorientador

Prof. Raimundo Vicente de Sousa
Coorientador

LAVRAS – MG

2016

A Deus, autor da vida, pela realização e conclusão deste trabalho e por me dar
força para não desanimar durante os momentos mais difíceis.

Aos meus pais Ubiratan e Irene, por seus ensinamentos, pelo amparo em
momentos de aflição e por tanta dedicação, carinho e amor incondicional.

À minha irmã Andira, por nossa união, amizade, pela compreensão e conforto
nos momentos de angústia e incerteza.

Ao meu sobrinho João Lucas por me conceder momentos maravilhosos de
muitos risos, tornando meus dias muito mais alegres.

E a todos que me apoiaram e deram suporte principalmente neste período de
minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida, pela força, coragem, sabedoria e por estar sempre presente nas horas de angústia, permitindo que eu chegasse até aqui, passando por lutas, mas alcançando vitórias, grandes vitórias.

À Profa. Angelita Duarte Corrêa, ilustre orientadora, pela amizade, respeito, paciência, oportunidade, orientação, confiança e incentivo durante todos os trabalhos, além dos ensinamentos proporcionados por eles. Foram cinco anos, incluindo os do mestrado, de muito aprendizado e uma ótima convivência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida para a concretização deste curso, ajudando-me a trilhar novas etapas na vida acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles professores que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos Professores Geraldo Andrade Carvalho e Raimundo Vicente de Sousa, pela orientação abrindo as portas de seus laboratórios, disponibilizando equipamentos e transmitindo seus conhecimentos para a realização dos ensaios.

Ao amigo Vinicius de Oliveira Ramos e a aluna de pós-graduação Dejjane Sousa Alves, pela ajuda, orientação e ensinamentos nos ensaios com a *Spodoptera frugiperda*.

As amigas Lidiany Mendonça Zacaroni Lima e Priscila Ferreira de Sales, funcionárias do Laboratório Central de Análise e Prospecção Química/CAPQ, pela ajuda com as análises cromatográficas.

Ao amigo Willian Cezar Cortez, funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (DMV), que com sua competente participação e instrução no ensaio biológico, foi essencial à realização deste trabalho.

As alunas Thais e em especial a Aline, bolsistas de iniciação científica, pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica, e em especial a Pricila, Flávia e ao Anderson pela grande amizade, companheirismo e por todo o aprendizado durante todos os trabalhos realizados juntos.

Aos funcionários do Departamento de Química, pela colaboração e pela amizade conquistada.

E a todos que, de alguma forma participaram e contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A acerola (*Malpighia emarginata*), cujo cultivo é recente no Brasil, é consumida *in natura*, mas o grande mercado para produtos de acerola é gerado a partir do suco clarificado e concentrado, usado como base na elaboração de polpa congelada, caldas para sorvetes e geleias. Porém, os resíduos decorrentes desse processamento, constituído principalmente pelo bagaço, são descartados. No entanto, por serem boas fontes de compostos fenólicos, sua utilização na indústria farmacêutica, cosmética, agroquímica e de alimentos pode ser promissora. Neste trabalho preparam-se extratos metanólico e acetônico de farinha de bagaço de acerola (FBA) objetivando avaliar o extrato metanólico como fonte de inibidoras das enzimas α -amilase, α -glicosidase, lipase e tripsina; investigar as atividades antioxidante e hepatoprotetora do extrato metanólico contra a lesão hepática induzida pelo CCl_4 em ratos *Wistar*; avaliar a atividade inseticida do extrato acetônico contra as características biológicas da *Spodoptera frugiperda* como uma possível alternativa de inseticida natural; e determinar os compostos fenólicos nesses extratos por cromatografia líquida de alta eficiência. O bagaço de acerola, obtido na indústria de processamento do fruto, foi liofilizado, homogeneizado em graal e armazenado em frascos hermeticamente fechados, protegidos da luz, em geladeira. Para obtenção do extrato metanólico, utilizou-se 1 g de FBA e 50 mL de metanol 50% (1:50), sob refluxo, em chapa aquecedora a 80 °C, por 15 minutos. Para a obtenção do extrato acetônico, utilizou-se 1 g de FBA misturado com 10 mL de acetona:água (7:3), deixando a temperatura ambiente por duas horas e levado ao vortex três vezes por 3 minutos. No extrato metanólico foram identificados os compostos fenólicos ácidos gálico, siríngico e *p*-cumárico, catequina, galato de epigalocatequina, epicatequina e quercetina. Enquanto, no extrato acetônico os compostos fenólicos identificados foram ácidos gálico, salicílico e *p*-cumárico, catequina,

galato de epigallocatequina e quercetina. O extrato metanólico foi capaz de inibir as enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase, mostrando potencial para ser utilizado como auxiliar no tratamento da obesidade e comorbidades associadas. Este mesmo extrato apresentou atividade antioxidante e hepatoprotetora em ratos *Wistar*, nas doses de 0,5 g e 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal, já que a dose de 5,0 g/70 kg peso de animal acarretou aumento da atividade da ALT, redução da SOD e do teor de albumina sérica, em comparação ao controle negativo. Já o extrato acetônico de FBA foi tóxico para a *Spodoptera frugiperda*, prolongando a fase de pré-pupa e aumentou a mortalidade das lagartas em condições laboratoriais. Estudos futuros devem examinar seu uso potencial em condições de campo e investigar o efeito dos compostos fenólicos isolados identificados no extrato de FBA.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata* Produto natural Compostos fenólicos Lagarta do cartucho Espécies reativas Ratos

ABSTRACT

Acerola (*Malpighia emarginata*), whose cultivation is recent in Brazil, is consumed fresh, but the big market for acerola products is generated from the clarified and concentrated juice, used as a basis in the preparation of frozen pulp, syrup for ice creams and jellies. However, the waste resulting from this processing, consisting mainly of bagasse, is discarded. Nevertheless, since they are good sources of phenolic compounds, their use in pharmaceutical, cosmetic, agrochemical and food industry can be promising. In this study, methanol and acetone extracts were prepared from acerola bagasse flour (ABF), with the objective to evaluate the methanol extract as an inhibitor source of α -amylase, α -glycosidase, lipase and trypsin inhibitors; investigate the antioxidant and hepatoprotective activities of the methanol extract against liver injury induced by CCl_4 in *Wistar* rats; evaluate the insecticidal activity of the acetone extract against biological characteristics of *Spodoptera frugiperda*, as a possible alternative natural insecticide; and determine the phenolic compounds in these extracts by high-performance liquid chromatography. Acerola bagasse, obtained from the fruit processing industry, was lyophilized, homogenized using mortar and pestle and stored in hermetically sealed flasks, protected from light, in a refrigerator. For the obtention of the methanol extract, 1 g of ABF and 50 mL of 50% methanol (1:50) were used, under reflux, on a hot plate at 80 °C for 15 min. For the obtention of the acetone extract, 1 g of ABF and 10 mL of acetone:water (7:3) were used, kept at room temperature for 2 hours and then vortexed three times for 3 min. The phenolic compounds gallic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin and quercetin, were identified in the methanol extract. On the other hand, the phenolic compounds gallic acid, salicylic acid, *p*-coumaric acid, catechin, epigallocatechin gallate and quercetin, were identified in the acetone extract. The methanol extract was able

to inhibit the digestive enzymes α -amylase and α -glucosidase, with potential to be used as an aid in the treatment of obesity and associated comorbidities. The same extract showed antioxidant and hepatoprotective activity in *Wistar* rats, at doses of 0.5 g and 1.0 g phenolic compounds/70 kg rat weight (RW), since the dose of 5.0 g/70 kg rat weight (RW) caused an increase in the activity of the enzyme alanine aminotransferase (ALT), reduction of superoxide dismutase (SOD) and content of serum albumin, compared to the negative control. However, the ABF acetone extract was toxic to *Spodoptera frugiperda*, extending the pre-pupal stage and increasing the mortality of larvae under laboratory conditions. Further studies should examine their potential use in field conditions and investigate the effect of isolated phenolic compounds identified in the ABF extract.

Keywords: *Malpighia emarginata* Natural product Phenolic compounds Fall armyworm Reactive species Rats

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
PRIMEIRA PARTE	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Resíduos agroindustriais	18
3.2 Considerações gerais sobre a aceroleira	19
3.3 Compostos fenólicos	22
3.3.1 Propriedades dos compostos fenólicos	25
3.4 Obesidade	27
3.5 Antioxidantes e radicais livres	30
3.6 Lagarta de cartucho	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	38
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	50
ARTIGO 1 Metanolic extract of <i>Malpighia emarginata</i> bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes...	51
ARTIGO 2 Extrato metanólico liofilizado de bagaço de acerola: atividade antioxidante e hepatoprotetora em ratos <i>Wistar</i>	72
ARTIGO 3 <i>Malpighia emarginata</i> DC. bagasse acetone extract: phenolic compounds and their effect on <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)	95
APÊNDICES	118

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de tese está dividido em duas partes:

Na primeira parte constam a Introdução, Objetivos, Referencial teórico e as Considerações finais.

Na segunda parte constam os resultados desta tese que estão apresentados sob a forma de artigos. Cada artigo está estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão ou publicação dos mesmos.

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As frutas, reconhecidas fontes de minerais, vitaminas e fibras, são alimentos nutricionalmente importantes na dieta e tem recebido nos últimos anos, maior atenção. Evidências epidemiológicas têm demonstrado que o consumo regular das mesmas está associado à redução da morbi-mortalidade por algumas doenças não transmissíveis. O possível efeito protetor exercido por estes alimentos tem sido atribuído principalmente à presença de substâncias com elevado potencial antioxidante, como os compostos fenólicos. Estes compostos, em pequenas quantidades, podem exercer efeitos preventivos e/ou curativos em distúrbios fisiológicos prevenindo a ação das espécies reativas, reduzindo o risco de câncer, doenças cardiovasculares, obesidade e suas comorbidades associadas.

Porém, nas frutas, de modo geral, a maioria das substâncias de interesse é encontrada em partes que normalmente são desprezadas como nas cascas, sementes e bagaço, sendo considerados resíduos agroindustriais. O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais, tanto na indústria como pelos próprios produtores. Embora esses resíduos sejam biodegradáveis, necessitam de um tempo para serem decompostos, constituindo-se fontes de poluentes ambientais. Assim, agregar valor a estes subprodutos é de grande interesse, já que o uso desses resíduos abre espaço para uma série de aplicações, principalmente na indústria farmacêutica, agroquímica e de alimentos.

A importância da utilização desses resíduos de frutas deve-se a sua contribuição como fonte natural de substâncias bioativas. Devido à ampla diversidade de seus constituintes, constituem fontes promissoras para a extração de princípios ativos, como os compostos fenólicos com diferentes atividades

biológicas benéficas que podem ser empregados como inibidores de enzimas digestivas, antioxidantes e inseticidas.

Neste contexto, pode-se citar a acerola, cujo cultivo é recente no Brasil, assim há carências quanto a dados de produção (áreas plantada e colhida) de acerola e comercialização do fruto *in natura* e de seus produtos. Entretanto, de 15% a 41% do volume total de toda acerola processada para a obtenção de polpa é considerado resíduo e desprezado no processo fabril, considerado custo operacional para as empresas (AGUIAR et al., 2010).

Além do consumo *in natura*, o grande mercado para produtos de acerola é gerado a partir do suco clarificado e concentrado, usado como base na elaboração de produtos, como polpa congelada, caldas para sorvetes e geleias. Porém, os resíduos decorrentes desse processamento, constituído principalmente por bagaço, são descartados. No entanto, por serem boas fontes de compostos fenólicos, sobretudo o bagaço, com altos níveis, apresentando 10,82 g 100 g⁻¹ matéria seca (MARQUES et al., 2013) sua utilização na indústria farmacêutica, agroquímica e de alimentos pode ser promissora, além de agregar valor ao resíduo e conseqüentemente ao fruto.

Uma alternativa para o aproveitamento desse resíduo é sua transformação em farinha, que além de possuir diversos componentes, tais como fibras, vitaminas, minerais, apresentam substâncias antioxidantes, como os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos, metabólitos secundários de plantas, possuem larga aplicação nos setores nutricional, farmacêutico, cosmético e agroquímico, além de servirem como aditivos naturais em alimentos. Está atribuição tem ganhado importância crescente, pois os antioxidantes sintéticos usados pela indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxi-anisol), o BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroximetilfenol) e o TBHQ (terc-butil-hidroxiquinona) despertam preocupação quanto as suas doses de segurança e toxicidade.

Devido aos efeitos biológicos, vários benefícios à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos. Estudos sugerem que os compostos fenólicos são capazes de inibir enzimas digestivas, devido sua estrutura comum que apresenta um anel aromático hidroxilado. Esta se combina com as enzimas, proteínas e outros polímeros (carboidratos) formando complexos estáveis, impedindo a absorção dos nutrientes. A inibição das enzimas digestivas glicolíticas e lipase é benéfica para auxiliar na prevenção da obesidade e doenças correlacionadas, como o controle de hiperglicemia (diabetes do tipo 2).

Os compostos fenólicos atuam também como antioxidantes, sendo os mais ativos presentes nos vegetais. Funcionam como inibidores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Assim, são eficazes para prevenir a oxidação lipídica, que tem relação direta com a formação de ateromas e ateroscleroses e outras doenças como o câncer, doenças cardiovasculares e inflamações.

Outra aplicação promissora dos compostos fenólicos é no controle de insetos pragas como a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Os compostos fenólicos, que incluem os flavonoides e taninos, reduzem o crescimento e a sobrevivência de insetos, uma vez que acarretam a diminuição da palatabilidade devido seu sabor adstringente, provocando a inibição alimentar, redução de peso, infertilidade, alterações biológicas e nutricionais.

Produtos a base de ingredientes naturais são amplamente valorizados pelo mercado externo e pelas grandes companhias. Assim, cada vez mais busca-se a incorporação de extratos vegetais com princípios ativos relevantes em diversas formulações farmacêuticas, alimentícias e agroquímicas. Entretanto, apesar das evidências, escassos são os trabalhos que relatam à aplicação de extratos de bagaço de acerola como inseticida, inibidores de enzimas digestivas e antioxidante. Assim, existe a necessidade de estudos científicos que

comprovem seus efeitos benéficos, visando garantir a eficácia dos mesmos e sua utilização pelas indústrias.

2 OBJETIVOS

Neste trabalho prepararam-se extratos metanólico e acetônico de farinha de bagaço de acerola (FBA); avaliou-se o potencial do extrato metanólico como fonte de inibidores das enzimas α -amilase, α -glicosidase, lipase e tripsina, visando utilizá-lo como auxiliar no tratamento da obesidade e doenças correlacionadas; investigou-se a atividade antioxidante e hepatoprotetora do extrato metanólico contra a lesão hepática induzida pelo CCl_4 em ratos *Wistar*, visando encontrar possível alternativa para a indústria farmacêutica; avaliou-se a atividade inseticida do extrato acetônico contra as características biológicas da *S. frugiperda* em função de ser uma possível alternativa de inseticida natural; e determinou-se os compostos fenólicos nestes extratos por cromatografia líquida de alta eficiência.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Resíduos agroindustriais

Resíduo é entendido como o sobranço da matéria-prima não aproveitada na elaboração do produto alimentício e esse mesmo sobranço, caso seja transformado industrialmente para fins determinados, é conhecido como subproduto (EVANGELISTA, 2005).

O Brasil por ser um dos três maiores produtores de frutas no mundo, com uma produção superior a 43 milhões de toneladas em 2013 (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2015), vem tornando-se uma grande potência no beneficiamento de sua produção. Frutas que antes eram exportadas *in natura*, hoje passam por diversos processos de industrialização. Assim, além do consumo diário, o processamento dessas frutas gera muitos resíduos que são descartados no meio ambiente, muitas vezes sem nenhum cuidado ou direcionados para a fabricação de ração animal ou adubo.

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada à minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. Os resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço ou sementes e o bagaço. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica e nutritiva, servem como fonte de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos, que são importantes para as funções fisiológicas e passíveis de recuperação e aproveitamento na indústria farmacêutica, de cosméticos, de agroquímicos e de alimentos (SOUSA et al., 2011).

Vários pesquisadores vêm estudando o aproveitamento de resíduos de frutas gerados pelas agroindústrias para aplicação em setores industriais, tais como as frutas refugadas, cascas, sementes e/ou caroços e bagaço. Uma alternativa é a transformação destes resíduos em pós-alimentícios ou farinhas,

que além de possuírem diversos componentes, como: fibras, vitaminas e minerais, apresentam compostos fenólicos, como os flavonoides. Esses componentes trazem efeitos benéficos, podendo auxiliar na prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis e na conservação dos alimentos (BRENNAN, 2006).

A conservação pós-colheita da acerola é relativamente curta, devido apresentar elevada atividade respiratória. Uma opção viável para o aproveitamento econômico dessa fruta é a industrialização, porém é gerada grande quantidade de resíduos. O aproveitamento deste resíduo como matéria-prima para pesquisa de novos compostos bioativos é de grande interesse econômico e representa um segmento importante nas indústrias, pois agrega valor ao resíduo, conseqüentemente ao fruto, e ajuda a minimizar os riscos de danos ambientais causados com o seu descarte.

3.2 Considerações gerais sobre aceroleira

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), também conhecida como Cereja das Antilhas ou Cereja de Barbados (Figura 1), pertence à família Malpighiaceae, gênero *Malpighia* e é originária de regiões da América Central, noroeste da América do Sul e Antilhas (SANTOS et al., 2006).



FIGURA 1 Fruto da aceroleira

A aceroleira pode florescer e frutificar várias vezes durante o ano, com uma produção de três ou mais safras, concentradas principalmente na primavera e verão, que dependem das condições climáticas locais, como disponibilidade de água no solo. As plantas adultas chegam a produzir acima de 59,3 kg de frutos planta⁻¹ano⁻¹, que corresponde a uma produtividade em torno de 29 toneladas por hectare ao ano (AGRIANUAL, 2010). O fruto da aceroleira é uma drupa carnosa que varia na forma e tamanho e pesa de 2 a 10 g (NEVES, 2007). Sua polpa (mesocarpo) carnuda e suculenta é recoberta por uma casca (epicarpo) de proteção muito fina e delicada, que amadurece rapidamente. Seu endocarpo normalmente é constituído de três caroços triangulares e alongados, com textura de pergaminho e superfície reticulada, podendo ou não conter uma semente cada (MARQUES et al., 2007; RITZINGER; RITZINGER, 2011).

As variedades são divididas em doces e ácidas. Apesar das doces serem mais agradáveis ao consumo *in natura*, são as ácidas que despertam o maior interesse comercial, devido ao fato de apresentarem maior teor de vitamina C (SANTOS et al., 2006). Além de fonte de vitamina C, a acerola apresenta-se vitaminas como provitamina A, e vitaminas do grupo B como tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6) e niacina, e apresenta em sua composição os minerais, ferro, cálcio, fósforo e sódio (FOLEGATTI; MATSUURA, 2003).

No campo da saúde, a acerola é indicada em infecções, gripes, resfriados, lesões hepáticas, afecções pancreáticas e pulmonares, dispepsia, vômitos insidiosos, úlceras do trato digestivo, nas alterações do mecanismo de coagulação sanguínea, nas hemorragias capilares nasais e gengivais, nos estados de intoxicação por antibióticos, além de evitar dores musculares (MENDONÇA; MEDEIROS, 2011).

A acerola é uma fruta com grande potencial industrial, devido às suas características nutricionais e à presença de compostos fenólicos, com alta atividade antioxidante. No entanto, a elevada perecibilidade e a curta vida útil

pós-colheita desta fruta, devido apresentar estrutura frágil e elevada atividade respiratória, limitam a sua exportação, sendo mais empregada na indústria de processamento de alimentos o que gera grande quantidade de resíduo. Sabe-se que 15 a 41% do volume total de toda acerola processada para obtenção de polpa é considerado resíduo e desprezado no processo fabril, considerado custo operacional para as empresas (AGUIAR et al., 2010). Assim, o aproveitamento deste resíduo como matéria-prima para pesquisa de novos compostos bioativos é de grande interesse econômico e representa um segmento importante nas indústrias, pois agrega valor ao fruto.

Marques et al. (2013) avaliaram as farinhas de semente e bagaço de acerola e identificaram metabólitos de interesse nutricionais e farmacológicos e ausência de substâncias potencialmente tóxicas nas farinhas. Enquanto, que Marques et al. (2015) utilizaram as farinhas de semente e de bagaço de acerola na elaboração de barras de cereais em diferentes combinações com a aveia integral e concluíram que as barras BC 4 e BC 5 podem ser consideradas como produtos com maior valor nutricional, contendo ferro, com baixo valor energético e teores elevados de fibras alimentares, além de estarem enriquecidas com substâncias antioxidantes. Esses resíduos poderiam ser aplicados na indústria agroquímica, farmacêutica e de alimentos, sobretudo devido aos seus níveis elevados de compostos fenólicos e fibras.

Estudos científicos sobre uso do resíduo de acerola como inibidor de enzimas digestivas, antioxidante e inseticida são praticamente inexistentes. Além disso, devido a sua riqueza de fitoquímicos, como os compostos fenólicos, ele poderia ser utilizado pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e agroquímica.

3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis são derivados do metabolismo vegetal secundário presentes em plantas e estão relacionados, principalmente, com a proteção, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas. Nos alimentos, estes compostos podem influenciar o valor nutricional e a qualidade sensorial, conferindo atributos como cor, textura, amargor e adstringência. Na maioria dos vegetais, os compostos fenólicos constituem os antioxidantes mais abundantes (EVERETTE et al., 2010). Ahmad et al. (2012) definem compostos fenólicos como fitoquímicos naturais de plantas que possuem atividade antioxidante, quimio-preventiva e propriedades quimioterápicas.

O grupo dos polifenóis é um dos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo atualmente conhecidas mais de 8.000 estruturas químicas diferentes. Encontram-se naturalmente conjugados a um ou mais resíduos de açúcares ligados aos grupos hidroxila ou, menos frequentemente, ligados diretamente a um carbono aromático (MARTINEZ-FLORES et al., 2002). Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas e em sua maioria são de grande polaridade e muito reativos, além de serem suscetíveis à ação de enzimas. Estruturas fenólicas ligam-se a proteínas e açúcares e fazem parte de alcaloides e terpenoides (SOARES et al., 2008; LI et al., 2014).

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se a sua dupla origem biossintética, com a possibilidade de uma participação simultânea nas vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato, formando compostos de origem mista, o que pode originar desde moléculas simples como as dos ácidos fenólicos até compostos altamente polimerizados como os taninos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto principal, originando:

- Ácidos fenólicos: são derivados do ácido benzoico (ácido *p*-hidróxi-benzoico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido gentísico) ou do ácido cinâmico (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido sinápico e ácido ferúlico) (Figura 2). O ácido gálico, um dos derivados do ácido *p*-hidróxi-benzoico, é encontrado mais frequentemente na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico, que é encontrado em plantas vascularizadas, de forma solúvel ligado à glicose, como um galotanino hidrolisável (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

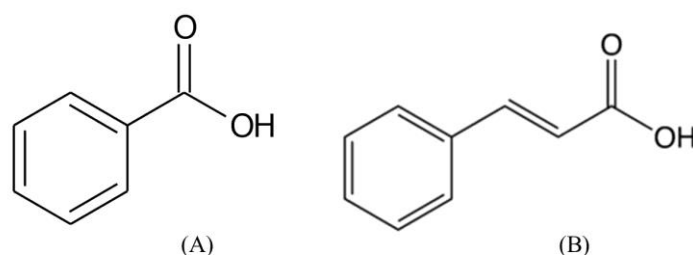


FIGURA 2 Estrutura do ácido benzoico (A) e do ácido cinâmico (B)

- Flavonoides: possuem uma estrutura básica de dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6) (Figura 3), resultante das duas rotas biossintéticas distintas, a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; ANGELO; JORGE, 2007). Os flavonoides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma conjugada é conhecida como heterosídeo e, quando está sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina. Os flavonoides podem ser subdivididos em: flavonas, flavonóis, *o*-heterosídeos, *c*-heterosídeos, antocianos,

chalconas, auronas, diidroflavonoides, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonoides, neoflavonoides e biflavonoides (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

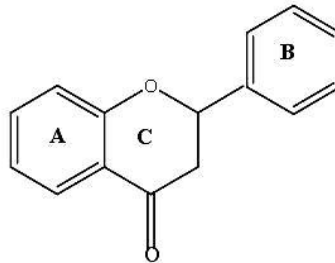


FIGURA 3 Estrutura fundamental dos flavonoides

- Taninos: são classificados segundo sua estrutura química, em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Figura 4). Os taninos hidrolisáveis são formados por um álcool poli hídrico, cujas hidroxilas são esterificadas, parcialmente ou completamente, pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexahidroxidifênico (elagitaninos) (BATTESTIN et al., 2004; ZHANG et al., 2012). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de unidades de flavan-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis. Essa classe de taninos também é denominada de proantocianidinas, na qual são encontradas, a catequina, galocatequina, epicatequina e robinetinidol, os quais se diferenciam pelo tipo de substituinte da cadeia principal (SANTOS; MELLO, 2003; BATTESTIN et al., 2004).

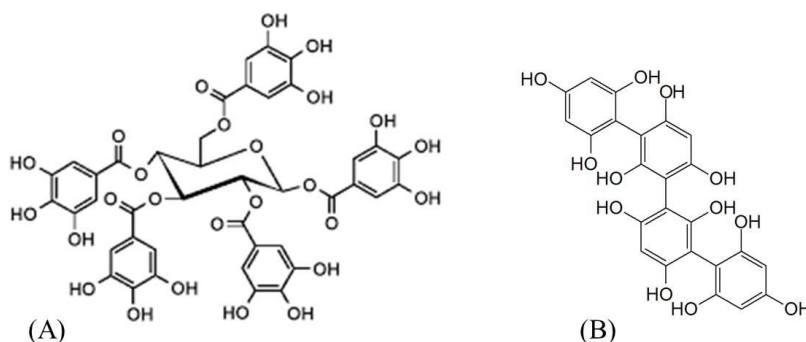


Figura 4 Estrutura do tanino hidrolisável (A) e do tanino condensado (B)

3.3.1 Propriedades dos compostos fenólicos

A funcionalidade dos compostos fenólicos está relacionada principalmente à sua ação antioxidante, ou seja, ação neutralizadora de radicais livres. E podem estar associados à possível prevenção do risco da ocorrência de algumas doenças, como aterosclerose, alguns cânceres, patologias cerebrais e inflamações (SOARES et al., 2008; GONENC et al., 2011). De acordo com Halliwell (2007), antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis e têm como principal função proteger os constituintes celulares, sequestrar os radicais livres e manter o estado redox celular.

Compostos fenólicos e, em particular, os flavonoides possuem estruturas ideais para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), sendo considerados antioxidantes mais eficazes que as vitaminas E e C. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. Estes compostos podem agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo e os produtos

intermediários formados por sua ação são relativamente estáveis, devido em sua estrutura química conter número variável de hidroxilas e ressonância do anel aromático (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010; GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011).

Estudos recentes têm demonstrado a ação dos compostos fenólicos como antioxidantes, atuando no combate dos radicais livres responsáveis pelo desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, desordens neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças crônicas (KATAKI et al., 2012; LIMA et al., 2013).

Como inibidores de enzimas digestivas humanas estudos mostram a aplicação desses compostos (SREERAMA et al., 2010; VOGEL et al., 2015; ZHANG et al., 2015), devido à capacidade de ligação com as enzimas glicolíticas e lipase, reduzindo a absorção de carboidratos e gorduras sendo capazes de auxiliar na prevenção da obesidade e doenças correlacionadas.

Taninos têm a capacidade de combinar com enzimas digestivas, proteínas e outros polímeros, formando complexos estáveis, interferindo na digestibilidade e, conseqüentemente, prejudicando a absorção de carboidratos, lipídios e proteínas (WON et al., 2007; GHOLAMHOSEINIAN et al., 2010). Klaus et al. (2005) e Alterio et al. (2007) relataram que estruturas fenólicas reduzem a ingestão alimentar, diminuem a absorção intestinal de gorduras e carboidratos ocasionado pela inibição de enzimas digestivas e apresentam efeitos termogênicos, podendo atuar na prevenção da obesidade.

Já no controle de insetos, compostos fenólicos como os taninos, têm reconhecidamente função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações, frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens tornam-se impalatáveis aos fitófagos, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, resultando na perda do poder lubrificante (MONTEIRO et al., 2006). Os taninos apresentam habilidade para formar complexos solúveis com alcaloides, gelatinas e diversas

outras proteínas e também inibem enzimas digestivas (SIMÕES et al., 2007). O efeito dos taninos sobre os insetos dá-se em razão do fato desses compostos formarem complexos com as enzimas digestivas presentes no intestino dos herbívoros, e, como consequência, levam a uma redução na eficiência da digestão de proteínas e, por fim, retardam o crescimento (WAR et al., 2012), o que torna essas classes de substâncias fenólicas bastante tóxicas a insetos.

Os flavonoides, tais como a quercetina, também participam de importantes funções no desenvolvimento e na defesa dos vegetais, inibindo a regulação de enzimas digestivas, fortalecendo a parede celular dos vegetais e diminuindo a palatabilidade para herbívoros (CHEN, 2008; FILGUEIRAS et al., 2011).

Existem relatos de compostos fenólicos que foram tóxicos, reduzindo o crescimento dos insetos, provocando deformação de pupas, bem como uma redução na oviposição (URREA-BULLA et al., 2004; MESBAH et al., 2007; TIRELLI et al., 2010; ALVES et al., 2011; RANI; PRATYUSHA, 2013; ALVES et al., 2014).

Portanto, grande ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, de inibidores de enzimas digestivas e inseticida oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de combate as enfermidades e combate as pragas, evidenciando a necessidade de pesquisas para descoberta de novas fontes desses compostos, como no resíduo proveniente do processamento de suco de acerola.

3.4 Obesidade

A obesidade é uma doença resultante do acúmulo excessivo de gordura na forma de tecido adiposo que resulta em prejuízos à saúde, podendo levar a morte. Muitas são as causas que levam a obesidade, entre elas podem ser citadas

as desordens genéticas, os maus hábitos alimentares, as desordens endócrinas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA – SBEM, 2010) e o balanço energético positivo, que acontece quando a quantidade de energia consumida é maior que a quantidade gasta (HENRY; PANDIT, 2009).

Vários são os fatores que levam à obesidade como a influência familiar, as dietas calóricas ricas em lipídios e o gasto energético insuficiente (THIVEL et al., 2012). A evolução do padrão de consumo da população brasileira entre 1970 e 2009 mostra as seguintes tendências: aumento do consumo de alimentos ultraprocessados (biscoitos, embutidos, refrigerantes e refeições prontas) e estabilização do consumo de frutas e hortaliças (que representam menos da metade da recomendação de consumo) e redução de consumo de alimentos básicos como ovos, gordura animal, peixe, leguminosas, raízes e tubérculos e arroz (IBGE, 2011).

Dados da Organização Mundial da Saúde relataram que em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso e destes mais de 600 milhões eram obesos (WHO, 2015), dados estes, que implicam em altos gastos econômicos tanto pelos órgãos governamentais como pelos indivíduos afetados. Bahia et al. (2012) estimaram que os custos totais por ano com as doenças relacionadas ao excesso de peso e à obesidade, incluindo internações, consultas e medicamentos, chegam a US\$ 2,1 bilhões.

A obesidade está presente tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento e causa prejuízos à saúde em adultos, adolescentes e crianças, sendo considerada uma epidemia mundial (WANDERLEY; FERREIRA, 2010). O excesso de peso está associado a vários problemas, como doenças cardiovasculares respiratórias, gastrintestinais, problemas metabólicos como diabetes mellitus tipo 2, dermatites, micoses, alguns tipos de cânceres e problemas renais (SBEM, 2010).

Para o diagnóstico da obesidade as medidas antropométricas utilizadas são o Índice de massa corporal (IMC), a medida da circunferência abdominal e a razão cintura quadril, sendo a primeira a mais utilizada (WHO, 2010). O IMC é o padrão utilizado pela WHO e é calculado dividindo-se o peso do indivíduo (em kg) pelo quadrado de sua altura (em metros) (SBEM, 2010). Quando o resultado do cálculo do IMC de um adulto está entre 18,5 a 24,9 é considerado peso normal e quando o IMC está acima de 30 já é considerado obeso.

Para o combate dessa epidemia inclui a prática de atividade física e mudanças de hábito alimentar como realizar refeições sem pressa e em ambientes tranquilos, evitar associar emoções com ingestão alimentar, mastigar bem os alimentos, além da correção dos erros alimentares (tratamento dietético). Outra forma de combate é com o tratamento medicamentoso que inclui agentes que diminuem a fome ou modifiquem a saciedade; que reduzem a digestão e absorção de alimentos e os que aumentam o gasto energético (NONINO-BORGES et al., 2006). No entanto, esses medicamentos causam efeitos colaterais e deve servir apenas como auxílio ao tratamento dietético e não como estrutura fundamental do tratamento da obesidade.

Assim, uma alternativa amplamente utilizada é o uso de extratos vegetais. Nos últimos anos houve um aumento considerável em seu consumo, devido à população acreditar que está ingerindo “medicamentos” que não provocam danos à saúde; que apresentam baixo custo e que podem inibir enzimas digestivas glicolíticas e lipase ocasionando alterações benéficas no metabolismo (SIMÃO et al., 2012). Extratos vegetais também podem proporcionar efeitos adversos e provocar danos à saúde necessitando assim, de respaldo científico.

Pesquisas têm buscado avaliar o efeito de produtos de origem vegetal como auxiliares no tratamento da obesidade e comorbidades associadas e reforçam a necessidade da busca por novas fontes de inibidores de amilases,

glicosidases e lipases (UDANI et al., 2009; SOUZA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; SIMÃO et al., 2012).

Enzimas como a α -amilase e α -glicosidase, são responsáveis pelo processamento de carboidratos da dieta, agindo sobre a quebra do amido, o que resulta na absorção de monossacarídeos por enterócitos. Portanto, a sua inibição oferece uma estratégia promissora para auxiliar no tratamento da obesidade através da redução da quebra do amido e a absorção de glicose no intestino delgado (KWON et al., 2008). Já a lipase, envolvido no metabolismo da gordura, é também um importante alvo para inibidores, uma vez que a sua inibição promove a redução na absorção de triglicérides da dieta, que conduz a uma diminuição no rendimento calórico e a perda de peso. Por outro lado, a inibição de tripsina, envolvidos na digestão de proteínas, tem um efeito nefasto, uma vez que diminui a absorção de aminoácidos na alimentação e é essencial para o organismo (FRIEDMAN; BRANDON, 2001).

Assim, inibidores de enzimas digestivas que auxiliem na redução da absorção de carboidratos e gorduras no intestino na fase inicial podem revelar-se úteis como auxiliares no tratamento da obesidade. O uso de resíduos agroindustriais de frutas apresenta-se bastante promissor para a extração de princípios ativos que podem ser empregados como auxiliar no tratamento da obesidade e doenças correlacionadas.

3.5 Antioxidantes e espécies reativas

O estilo de vida da população sofreu mudanças nos últimos anos. O estresse, a poluição, a má alimentação, o sedentarismo, são evidências de que os maus hábitos podem causar vários problemas à saúde humana. E como consequência a esses maus hábitos surge o estresse oxidativo que é definido como um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes, que conduzem o surgimento de várias doenças.

Antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis e têm como principal função proteger os constituintes celulares e manter o estado redox celular, impedindo a ação das espécies reativas (KATAKI et al., 2012). Eles previnem os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, neutralizando as espécies reativas e/ou quelando íons metálicos; protegem organismos aeróbicos do estresse oxidativo, definido como elevação na formação de espécies reativas de oxigênio (RODRIGUES et al., 2003). Apesar dos antioxidantes doarem elétrons para determinados substratos, eles não se tornam espécies reativas, pois eles são estáveis em ambas às formas.

A presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; a capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; a capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e o acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição são características de um bom antioxidante (MANACH et al., 2004).

Já as espécies reativas advêm da formação e da atividade de compostos químicos conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou do nitrogênio (ERN), os quais apresentam tendência de promover reações oxidativas.

Essas espécies podem ou não apresentar um ou mais elétrons desemparelhados sendo, por isto, instáveis e altamente reativos. Como exemplos, podem ser citadas as espécies radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o ânion superóxido (O_2^-), o ácido hipocloroso (HOCl), peróxido (O_2^{2-}), peroxila ($\text{ROO}\cdot$), hidroperóxido (ROOH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), alcoxila ($\text{RO}\cdot$), óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), peroxinitritos ($\text{ONOO}\cdot$). A geração destas espécies ocorre durante as funções normais das células como a respiração, a fagocitose, o

metabolismo do ácido araquidônico, a atuação das defesas anti-inflamatórias e a fertilização, mas o excesso das mesmas pode provocar diferentes condições patológicas como câncer, distrofia muscular, desordens neurológicas (LOBO et al., 2010; STUMPF et al., 2012).

A presença excessiva de espécies reativas podem desenvolver várias doenças crônicas não transmissíveis como aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, várias formas de cânceres, diabetes, fibrose cística, distúrbios neurodegenerativos como a doenças de Alzheimer e o mal de Parkinson e a catarata (KATAKI et al., 2012; STUMPF et al., 2012).

Os organismos aeróbicos desenvolveram sistemas defensivos com a função de regular a geração das espécies reativas ou neutralizá-las após a sua produção. Estes mecanismos incluem a utilização de substâncias antioxidantes de origem endógena ou exógena que reduzem as ERO ou ERN a formas menos reativas e a transcrição de enzimas antioxidantes com a função de degradar ou desativar substratos oxidados. Entre estas enzimas, podem ser destacadas a superóxido dismutase (SOD) que elimina os radicais superóxido, a glutathione peroxidase (GPx) que reduz os peróxidos e hidroperóxidos, a glutathione reductase (GR) que regenera a glutathione a partir da sua forma oxidada e a catalase (Cat) que destrói o peróxido de hidrogênio por dismutação, juntas atuam como neutralizadoras de espécies reativas (PINCEMAIL, 2006; KATAKI et al., 2012). Os antioxidantes adquiridos na alimentação podem inverter a ação prejudicial e patológica da ação das espécies reativas, restaurando as funções fisiológicas (KATAKI et al., 2012). A soma de antioxidantes endógenos e derivados dos alimentos representa a capacidade antioxidante total do sistema (KURIAKOSE; KURUP, 2010).

A partir de 1980, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais

têm sido restringidos devido ao seu potencial tóxico e carcinogênico em experimentos com animais, como aumento do peso do fígado (ANDRADE et al., 2012).

Muitos trabalhos associam a ingestão de compostos fenólicos com a capacidade antioxidante. Martinez et al. (2008) ao investigar os efeitos da quercetina em um modelo de inflamação pulmonar induzida por bleomicina, ressaltaram seu efeito antiinflamatório e relacionaram esse efeito a sua propriedade antioxidante. Já Tipoe et al. (2010) mostraram que a administração de galato de epigallocatequina foi eficaz na atenuação da lesão hepática induzida por CCl₄ e fibrose em ratos. Enquanto, Brito et al. (2013) verificaram que a quercetina inibiu a proliferação celular da linhagem de carcinoma hepatocelular.

O interesse por substâncias naturais encontradas em plantas com ação antioxidante tem aumentado nos últimos anos, levando as indústrias alimentícias, cosmética e farmacêutica a terem maior atenção em novas fontes antioxidantes. Entretanto, existem várias questões a ser respondidas como a relação dose/resposta para essa ação, se a capacidade antioxidante está relacionada à biodisponibilidade de compostos fenólicos, das enzimas antioxidantes ou a estes dois fatores. Assim, surge a necessidade de maiores investigações sobre resíduos agroindustriais de frutas contendo substâncias fenólicas e possíveis efeitos *in vivo* destes compostos como antioxidantes que podem prevenir ou minimizar a ocorrência de diversas doenças crônicas não transmissíveis.

3.6 Lagarta-do-cartucho

Nos últimos anos, a busca por produtos naturais que contenham princípios ativos contra insetos praga tem se intensificado. A descoberta de novas substâncias em alternativa aos inseticidas sintéticos é de grande relevância. Pois, a aplicação de inseticidas sintéticos além de causar efeitos

adversos ao meio ambiente, também pode promover seleção de populações de insetos praga resistentes, acúmulo de resíduos nos alimentos e mortalidade de inimigos naturais dos insetos praga (BUSATO et al., 2006; AL-MAZRA'AWI e ATEYYAT, 2009; CACCIA et al., 2014).

Entre os inúmeros insetos pragas de culturas de importância econômica, se sobressai a lagarta militar ou lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Trata-se de um inseto polífago e de distribuição cosmopolita, amplamente encontrado na América do Norte e do Sul, podendo causar danos em diversas culturas, incluindo milho, sorgo, algodão e diversas gramíneas (MÚRUA et al., 2009; CASMUZ et al., 2010).

Os adultos são mariposas com alta mobilidade, medindo em torno de 4 cm de envergadura, com as asas anteriores de coloração cinza escuro e posteriores branco acinzentadas. As fêmeas apresentam elevado potencial reprodutivo, com capacidade de ovipositar mais de 1000 ovos. O ciclo de vida do ovo a fase adulto (Figura 5) é relativamente curto de 25 a 30 dias, dependendo da temperatura, sendo a longevidade dos adultos de aproximadamente 12 dias (OMOTO et al., 2013).

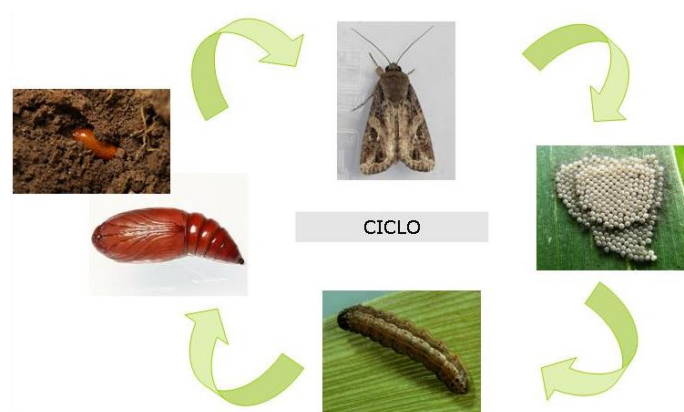


FIGURA 5 Ciclo de vida da *Spodoptera frugiperda*

Nas culturas de milho, sorgo, algodão e algumas gramíneas a *S. frugiperda* realiza postura em massa nas folhas com aproximadamente 200 a 300 ovos. Os ovos são de coloração verde-clara, passando a alaranjado algumas horas após a oviposição. O período de incubação é de aproximadamente 3 dias. As larvas de 1ª *instar* são de coloração clara passando para pardo-escuro até quase preta dependendo da idade. Apresentam um “Y” invertido na parte frontal da cabeça. O período larval varia de 15 a 25 dias, com 4 a 7 *instares* dependendo da temperatura, planta hospedeira, sexo e biótipo. Findo o período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em crisálidas (pupas) de coloração marron-avermelhada. Após aproximadamente 10 dias de período pupal ocorre à emergência dos adultos (OMOTO et al., 2013).

O controle de *S. frugiperda* não tem se sido uma tarefa fácil, pois os inseticidas com frequência têm apresentado falhas de controle. Isso se deve aumento de indivíduos resistentes no campo. Assim, a busca por novos produtos com ação inseticida contra esse inseto em substituição aos sintéticos é de grande importância.

A atividade biológica de produtos naturais sobre *S. frugiperda* foi identificada ao retardar o desenvolvimento das larvas, reduzindo sua capacidade de alimentação, o desenvolvimento e a emergência dos adultos, afetando também a capacidade de oviposição de muitas espécies (TIRELLI et al., 2010; SANTOS et al., 2013; ALVES et al., 2014).

Nesse contexto, o uso de resíduos agroindustriais de frutas apresenta-se bastante promissor para a extração de princípios ativos que podem ser empregados para o controle de insetos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resíduos agroindustriais de frutas são fontes naturais de substâncias bioativas, amplamente reconhecidas por suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, como antioxidantes, inseticidas e inibidores de enzimas digestivas, superando muitas vezes o teor nas polpas das frutas. Entre essas substâncias bioativas, sobressaem os compostos fenólicos.

Assim, agregar valor a estes resíduos é de grande interesse visto que, o uso destes pode apresentar uma solução viável para a pesquisa de novas drogas para o tratamento da obesidade e doenças relacionadas; para encontrar substâncias naturais com atividade antioxidante e impedir a ação das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio prevenindo o aparecimento de várias doenças, como o câncer e doenças cardiovasculares; para controle de infestações de insetos pragas em plantações.

Diversos estudos sobre a composição dos resíduos agroindustriais de frutas têm sido realizados com o intuito de que estes sejam adequadamente aproveitados. Para agregar-lhes valor, é necessário o conhecimento dos seus constituintes, através de investigações científicas e tecnológicas. O resíduo, bagaço de acerola, proveniente do processamento para a obtenção de suco, é rico em compostos fenólicos, portanto, uma ótima fonte para a extração deste constituinte.

Neste trabalho de tese foram preparados dois extratos de farinha de bagaço de acerola, um extrato metanólico e outro acetônico sendo identificados os compostos fenólicos ácidos gálico, siríngico, salicílico e p-cumárico, catequina, galato de epigallocatequina, epicatequina e quercetina.

O extrato metanólico da FBA foi capaz de inibir *in vitro* as enzimas α -amilase e α -glicosidase, na presença do fluido gástrico simulado, podendo ser utilizado como auxiliar no tratamento da obesidade e comorbidades associadas. Este extrato, também apresentou propriedades antioxidante e hepatoprotetora

nas doses de 0,5 g e 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg de peso animal, já que a dose de 5,0 g/70 kg de peso animal acarretou aumento da atividade da ALT, redução da SOD e do teor de albumina, em comparação ao controle negativo, revelando potencial farmacológico. Porém, estudos complementares do potencial medicinal deste resíduo se fazem necessários para averiguação de outros parâmetros que definam efetividade e segurança, além de outras possíveis aplicações.

Já o extrato acetônico da FBA diminuiu a sobrevivência de *S. frugiperda*, em condições laboratoriais. Estudos futuros devem ser realizados avaliando seu uso potencial em condições de campo e investigar o efeito dos compostos fenólicos isolados identificados no extrato FBA.

Portanto, esses extratos apresentam potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica e/ou agroquímica.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. M. et al. Caracterização química e avaliação do valor nutritivo de sementes de acerola. **Nutrice**: revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 91-102, ago. 2010.

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2010. 520 p.

AHMAD, Z. et al. Effect of structural modulation of polyphenolic compounds on the inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 50, n. 3, p. 476-486, Apr. 2012.

AL-MAZRA'AWI, M. S.; ATEYYAT, M. Insecticidal and repellent activities of medicinal plant extracts against the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae) and its parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae). **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 82, n. 2, p. 149-154, May 2009.

ALTERIO, A. A.; FAVA, D. A. F.; NAVARRO, F. Interaction of the daily ingestion of Green tea (*Camella sinensis*) in the cellular metabolism and the adipose cell promoting emagrecimento. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 27-37, maio/jun. 2007.

ALVES, A. P. C. et al. Toxicity of the phenolic extract from jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) fruit skins on *Spodoptera frugiperda*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 74, n. 2, p. 200-204, 2014.

ALVES, D. S. et al. Plant extracts as an alternative to control *Leucoptera coffeella* (Guérin Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 1, p. 123-128, jan./fev. 2011.

ANDRADE, M. A. et al. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.

ANGELO P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

BAHIA, L. et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, Londres, v. 12, n. 440, p 1-7, June 2012.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 1, p. 63-77, 2004.

BRENNAN, J. G. **Food processing handbook**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 602 p.

BRITO, A. F. et al. Anticancer effect of quercetin in hepatocellular carcinoma: the role of GLUT-1. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, Lisboa, v. 25, p. 23-30, June 2013.

BUSATO, G. R. et al. Susceptibility of caterpillars of the biotypes corn and rice of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides with different action manners. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 15- 20, jan./fev. 2006.

CACCIA, M. G. et al. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 74, n. 1, p. 123-126, Mar. 2014.

CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Buenos Aires, v. 69, n. 3-4, p. 209-231, 2010.

CHEN, M. S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science**, v. 15, n. 2, p. 101-114, Apr. 2008.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 652 p.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, July 2010.

FILGUEIRAS, C. C. et al. Bioactivity of aqueous extracts of *Clibadium Sylvestre* (Aubl.) Baill. and *Derris Amazonica* Killip on the Aphid *Myzus*

persicae (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1059-1066, nov./dez. 2011.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. Produtos. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P. (Ed.). **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p. 164-184.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, Mar. 2001.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, Barcelona, v. 101, n. 8, p. 659-672, Oct. 2010.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, Dec. 2011.

GHOLAMHOSEINIAN, A.; SHAHOZEHI, B.; SHARIFI-FAR, F. Inhibitory effect of some plant extracts on pancreatic lipase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 18-24, 2010.

GONENC, A. et al. Free radical reaction products and antioxidant capacity in beating heart coronary artery surgery compared to conventional bypass. **Biochemistry**, New York, v. 76, n. 6, p. 677-685, June 2011.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, Londres, v. 35. pt. 5, p. 1147-1150, Nov. 2007.

HENRY, J. A.; PANDIT, A. Perspective on biomaterials used in the surgical treatment of morbid obesity. **Obesity Reviews**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 324-332, May 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **O sistema agroalimentar de frutas e derivados**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/detalhe.aspx?id=1>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

KATAKI, M. S. et al. In vitro antioxidant profile of *Wedelia calandulaceae* leaves. **Pharmacologia**, v. 3, n. 3, p. 75-83, 2012.

KLAUS, S. et al. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. **International Journal of Obesity**, Londres, v. 29, n. 6, p. 615-623, June 2005.

KURIAKOSE, G. C.; KURUP M. G. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Aphanizomenon flos-aquae* Linn against paracetamol intoxication in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 48, v. 11, p. 1123–1130, Nov. 2010.

KWON, Y. I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia

linked to type 2 diabetes. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 32, n. 1, p. 15-31, 2008.

LI, A. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020-6047, Dec. 2014.

LIMA, A. R. et al. Effect of decaffeination of green and roasted coffees on the *in vivo* antioxidant activity and prevention of liver injury in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 23, n. 3, p. 506-512, May/June 2013.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, July/Dec. 2010.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food source and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MARQUES, L. G.; FERREIRA, M. C.; FREIRE, J. T. Freeze-drying of acerola (*Malpighia glabra* L.). **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v. 46, n. 5, p. 451–457, May 2007.

MARQUES, T. R. et al. Chemical components and functional properties of acerola (*Malpighia emarginata* dc.) residue flour. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 3, p. 526-531, July/Sept. 2013.

MARQUES T. R. et al. Cereal bars enriched with antioxidant substances and rich in fiber, prepared with flours of acerola residues. **Journal Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 8, p. 5084–5092, Aug. 2015.

MARTINEZ-FLORES, H. E. et al. Physical properties and composition of femurs of rat fed with diets based on corn tortillas made from different processes. **International Journal Food Science Nutrition**, Basingstoke, v. 53, n. 2, p. 155-162, Mar. 2002.

MARTINEZ, J. A. B. et al. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 445-452, 2008.

MENDONÇA, V.; MEDEIROS, L. F. **Culturas da aceroleira e do maracujazeiro**. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semiárido. Departamento de Ciências Vegetais, 2011. (Boletim Técnico, 4).

MESBAH, H. A. et al. Biological performance of quercetin on the cotton leaf-worm larvae, *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) and prevailing natural enemies in the Egyptian cotton fields. **Communications in Agricultural Applied Biological Science**, Belgium, v. 72, n. 3, p. 611-622, 2007.

MONTEIRO, J. M. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 338-344, jul./set. 2006.

MÚRUA, M. G.; MOLINA-OCHOA, J.; FIDALGO, P. Natural distribution of parasitoids of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Argentina. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 20, p. 1-17, May 2009.

NEVES, I. P. **Cultivo de acerola**. Salvador: Rede de Tecnologia da Bahia, 2007. (Dossiê Técnico).

NONINO-BORGES, C. B.; BORGES, R. M.; SANTOS, J. E. Tratamento Clínico da obesidade. **Revista de Medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 2, p. 246-253, abr./jun. 2006.

OMOTO, C. et al. Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas e plantas *Bt*. Piracicaba: ESALQ/USP, 2013. Disponível em: <<http://www.irac-online.org/documents/resistencia-de-spodoptera-frugiperda/?ext=pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

PEREIRA, C. A. et al. Inhibition of digestive enzymes by commercial powder extracts of *Hoodia gordonii*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 3, p. 265-269, jul./set. 2011.

PINCEMAIL, J. **How to evaluate your oxidative stress (homepage da internet)**. 2006. Disponível em: <http://www.probiox.com/uk/html/body_stressoxydant.htm>. Acesso em: 30 out. 2014.

RANI, P. U.; PRATYUSHA, S. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. anti-oxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura* F. feeding. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 131-136, June 2013.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **The chemistry of wine: stabilization and treatments**. West Sussex, UK: Wiley & Sons, 2006. (Handbook of Enology, 2).

RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 264, p. 17-25, set./out. 2011.

RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 315-320, jul./set. 2003.

SANTOS, M. A. I. et al. Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas cortadeiras. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, Supl. 1, p. 3501-3512, 2013.

SANTOS, S. C. et al.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia** - da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Florianópolis: Ed. UFSC, 2003. p. 615-656.

SANTOS, D.; SIQUEIRA, D. L.; BORBA, A. N. **Cultivo da aceroleira**. Viçosa, MG: UFV/PREC, 2006. n. 48.

SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D.; CHAGAS, P. M. B. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **Journal Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 47, p. 5826-5830, Dec. 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. 1102 p.

SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Obesidade**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/resultados-da-pesquisagoogle/?q=obesidade>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

SOUSA, M. S. B. et al. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, maio/jun. 2011.

SOUZA, S. P. et al. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 3, p. 450-455, maio/jun. 2011.

SREERAMA, Y. N. et al. Distribution of nutrients and antinutrients in milled fractions of chickpea and horse gram: seed coat phenolics and their distinct modes of enzyme inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 7, p. 4322-30, Apr. 2010.

STUMPF, C. et al. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes tipos de chocolate em tecido hepático de ratos Wistar: estudo *in vitro*. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 1 n. 3, p. 236-245, 2012

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Artmed, 2013.

TIPOE, G. L. et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in mice. **Toxicology**, Amsterdam, v. 273, n. 1-3, p. 45-52, June 2010.

TIRELLI, A. A. et al. Effect of tanical fractions on biological and nutritional parameters of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1417-1424, nov./dez. 2010.

THIVEL, D. et al. Acute exercise and subsequent nutritional adaptations: what about obese youths?. **Sports Medicine**, Auckland, v. 42, n. 7, p. 607-613, July 2012.

UDANI, J. K. et al. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. **Nutrition**, New York, v. 8, n. 52, p. 1-5, Oct. 2009.

URREA-BULLA, A.; SUÁREZ, M. M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 75, n. 3-4, p. 392–394, June 2004.

VOGEL, P. et al. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L.) to human health. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 31, n. 3, p. 1427-1433, 2015.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p.185-194, Jan. 2010.

WAR, A. R. W. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Lant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, Oct. 2012.

WON, S.; KIM, S.; KIM, Y. Licochalcone A: a lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. **Food Research International**, Barking, v. 40, n. 8, p. 1046–1050, Oct. 2007.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Global database on Body Mass Index**. Geneva, 2010. Disponível em: <<http://apps.who.int/bmi/index.jsp>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

ZHANG, X. F. et al. Tannic acid inhibited norovirus binding to HBGA receptors, a study of 50 chinese medicinal herbs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 1616-1623, Feb. 2012.

ZHANG, B. et al. Phenolic profiles of 20 canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. **Food Chemistry**, London, v. 172, p. 862-872, Apr. 2015.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA J. A. Flavonóides. In: SIMÕES C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia** - da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. p. 577-614.

SEGUNDA PARTE

ARTIGOS

No primeiro artigo, intitulado **Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes**, avaliou-se o potencial do extrato metanólico de bagaço de acerola como fonte de inibidores das enzimas α -amilase, α -glicosidase, lipase e tripsina e determinaram-se os compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência, visando utilizá-lo como auxiliar no tratamento da obesidade e doenças correlacionadas.

No segundo artigo, intitulado **Extrato metanólico liofilizado de bagaço de acerola: atividade antioxidante e hepatoprotetora em ratos *Wistar***, investigaram-se as atividades antioxidante e hepatoprotetora do extrato metanólico de bagaço de acerola, proveniente da extração da polpa, contra a lesão hepática induzida pelo CCl_4 em ratos *Wistar*, visando encontrar possível alternativa para a indústria farmacêutica e/ou cosméticas.

No terceiro artigo, intitulado ***Malpighia emarginata* DC. bagasse acetone extract: phenolic compounds and their effect on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**, avaliou-se o efeito do extrato acetônico de bagaço de acerola contra *S. frugiperda* e caracterizaram-se os compostos fenólicos, em função de ser uma possível alternativa de inseticida natural.

ARTIGO 1

Artigo aceito pela Revista Brasileira de Farmacognosia

**Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds
and inhibitory potential on digestive enzymes**

**Extrato metanólico de bagaço de *Malpighia emarginata*: compostos
fenólicos e potencial inibitório sobre enzimas digestivas**

**Tamara R. Marques^{a*}, Aline A. Caetano^a, Anderson A. Simão^a, Flávia
Cíntia de O. Castro^a, Vinicius de Oliveira Ramos^a, Angelita D. Corrêa^a**

^aLaboratório de Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Minas Gerais, MG, Brazil, PO Box 3037 – Zip code 37200-000.

* Corresponding author: E-mail: tamara_rezende@hotmail.com; angelita@dqi.ufla.br

ABSTRACT

Adding value to fruit residues is of great interest, since they can be presented as a viable solution in search of new drugs for the treatment of obesity and related diseases, due to bioactive substances, especially phenolic compounds. Thus, the objective of this study was to prepare the methanol extract of acerola bagasse flour (ABF), in order to evaluate its potential as a source of inhibitors of the enzymes α -amylase, α -glucosidase, lipase and trypsin, and determine the content of phenolic compounds by high performance liquid chromatography. Enzymatic inhibition assays were conducted in the presence or absence of simulated gastric

fluid. In the methanol extract of ABF, the following phenolic compounds were identified: gallic acid, syringic and p-coumaric acid, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin and quercetin; epicatechin was the major compound. In the absence of gastric fluid, simulated enzymes had a variable inhibition of the ABF extract, except for lipase, which was not inhibited. In the presence of simulated gastric fluid, there was an inhibition of 170.08 IEU (Inhibited Enzyme Unit in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) for α -amylase and 69.29 IEU for α -glucosidase, indicating that this extract shows potential as an adjuvant in the treatment of obesity and other dyslipidemia.

Keywords: *Malpighia emarginata*, α -amylase, α -glucosidase, lipase, trypsin, inhibitor.

Introduction

Obesity is a disease resulting from the excessive accumulation of body fat, and brings multiple outcomes for health, such as the prevalence and progression of cardiovascular diseases (especially heart diseases and stroke), which were the major causes of death in 2012; Some types of cancer (endometrium, breast and colon); skeletal muscle disturbs (specially osteoarthritis - a highly incapacitating degenerative disease); hypertension and type 2 diabetes mellitus (WHO, 2015; Wanderley & Ferreira, 2010).

Between 1980 and 2014, the world's obesity prevalence doubled. Data from the World Health Organization report that, in 2014, more than 1.9 billion adults were overweight and, among them, more than 600 million were obese (WHO, 2015).

One way to fight this epidemic disease is drug treatment. Medicine to fight weight gain, which has the objective to restrict energy absorption and cause weight loss, is widely available (Boniglia et al., 2008). However, these drugs

cause side effects and are prohibited by Anvisa since 2011 (ABESO, 2014). Another alternative broadly employed is the use of plant extracts. Over the last years, there was a substantial increase in its use, by the fact that the population believes its intake is harmless, with a low cost, and may inhibit digestive enzymes, leading to beneficial changes in metabolism (Simão et al., 2012). However not all natural products are beneficial and further studies are necessary to evaluate their effects on the organism.

Enzymes like α -amylase and α -glycosidase, responsible for processing dietary carbohydrates, act on starch breakdown, resulting in monosaccharide absorption by enterocytes. Therefore, their inhibition offers a promising strategy for the prevention of obesity, as well as type 2 diabetes associated to hyperglycemia, by inhibiting starch breakdown and glucose absorption in the small intestine (Balasubramanian et al., 2013; Kwon et al., 2006).

Lipase, involved in fat metabolism, is also an important target for inhibitors, since its inhibition limits triacylglycerol absorption, leading to a decrease in caloric yield and weight loss. On the other hand, trypsin inhibition, involved in protein digestion, has a malefic effect, once it impairs the complete amino acid absorption in food, essential for the organism.

Research has been carried out for evaluating the effects of natural products on the treatment of obesity and associated comorbidities, reinforcing the need for the search of new sources of amylase, glycosidase and lipase inhibitors (Souza et al., 2011; Pereira et al., 2011a; Simão et al., 2012). Therefore, digestive inhibitors who assist in reducing fat and carbohydrate absorption in the small intestine may be useful helpers in the treatment of obesity.

Natural products have been gaining space and importance in the pharmaceutical industry, since they have bioactive substances capable of inspiring new phytomedicines and phytotherapeutic products. Phenolic compounds

are among those substances. These compounds present chemical structures with hydroxyls and aromatic rings, which can be simple structures or polymers, originated from plant secondary metabolism and largely found in fruits (Angelo & Jorge, 2007). Many studies report the benefits of phenolic compounds as an adjunct in the treatment of obesity (Vogel et al., 2015; Zhang et al., 2015; Santiago-Mora et al., 2011; Alterio et al., 2007; Hen et al., 2006; Klaus et al., 2005).

Alterio et al. (2007) and Klaus et al. (2005) report that phenolic compounds act in the prevention of obesity due to their thermogenic effects, ability to oxidize body fat and by decreasing intestinal absorption of fats and carbohydrates caused by the inhibition of digestive enzymes, resulting in weight loss. Phenolic compounds, such as tannins, have the ability of combining with digestive enzymes, proteins and other polymers (such as carbohydrates), forming stable complexes, impairing absorption and, therefore, making them possible inhibitors of some of these digestive enzymes (Gholamhoseinian et al., 2010; Won et al., 2007).

In this context, the use of agro industrial residues of fruits is promising for the extraction of active principles that may be employed as an alternative to the treatment of obesity and correlated diseases. By discarding these residues, secondary metabolites of great aggregated value with possible applications in pharmaceutical and food industries, are also eliminated. For example, the acerola bagasse originated in juice processing is, according to Marques et al. (2013), rich in phenolic compounds, with record contents of 10.82 g 100 g⁻¹ dry matter; however, these phenolic compounds were not yet identified.

Given the above, the objective of the present study was to prepare the methanol extract of acerola bagasse flour (ABF), evaluate its potential as a source of α -amylase, α -glycosidase, lipase and trypsin inhibitors, and determine the phenolic compounds by high performance liquid chromatography (HPLC),

aiming to use it as an auxiliary in the treatment of obesity and correlated diseases, aggregating value to this residue.

Material and methods

Preparation of acerola bagasse flour

Acerola *Malpighia emarginata* DC. (BRS 238 Frutacor) bagasse was obtained from plants grown in the municipality of Perdões, MG, Brazil (21°05'27" S; 45°05'27" W, 848 m altitude); the local climate according to the Köppen system is classified as Cwa: mild and rainy summers with moderate temperatures, annual average temperature below 21°C, average annual precipitation of 1,529.7 mm, and relative humidity of 76% (Emater, 2002). Acerola fruits were used for pulp extraction, and the residual bagasse was provided in three batches by a fruit pulp plant firm located in Perdões, MG, Brazil.

Acerola bagasse (4 kg) was frozen at -18°C and lyophilized in glass containers protected from light for 7 days to obtain 450 g dry bagasse. After lyophilization, acerola bagasse was homogenized using mortar and pestle, was passed in sieves and most flour particles were retained on sieves sized 40 mesh (0.425 mm) to 80 mesh (0.180 mm), thus, classified as fine and then placed in a hermetically sealed flask, protected from light in a refrigerator at 4°C.

Obtention of the extract

To obtain the methanol extract of acerola bagasse flour (ABF), 1 g of acerola bagasse lyophilized powder was transferred to a 250 mL erlenmeyer and then added 50 mL of 50% methanol solution in three repetitions. Afterwards, it

covered with a ground glass joint and put on a hot plate at 80 °C. After boiling for 15 minutes, the extract was filtered in filter paper and collected to a 250 mL becker. The residue was once again put on an erlenmeyer and this process repeated for two more times. After the third filtration, the becker was taken to the hot plate to evaporate the methanol until the volume reaches 16 mL (AOAC, 2012), and then submitted to enzymatic inhibition analysis.

For the chromatography process, the becker was taken to the hot plate to evaporate the methanol, posteriorly frozen and lyophilized (Free Zone® 2,5 liter Freeze Dry Systems). 1g of lyophilized extract was solubilized in 16 mL ultrapure water obtained from a Milli-Q system (EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

Identification and quantification of phenolic compounds

The high performance liquid chromatography (HPLC) was performed using a Shimadzu UHPLC chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with two LC-20AT high-pressure pumps, an SPD-M20A UV-vis detector, a CTO-20AC oven, a CBM-20A interface, and an automatic injector with an SIL-20A auto sampler. Separations were performed using a Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm×4.6 mm) column, connected to a Shim-pack Column Holder (10 mm×4.6 mm) pre-column (Shimadzu, Japan).

The mobile phase consisted of the following solutions: 2% acetic acid in water (A) and methanol:water:acetic acid (70:28:2 v/v/v) (B). Analyses were performed for a total time of 65 min at 40 °C, flux of 1 mL min⁻¹, wavelength of 280 nm, and injection volume of 20 µL in a gradient-type system (100% solvent A from 0.01 to 5 min; 70% solvent A from 5 to 25 min; 60% solvent A from 25 to 43 min; 55% solvent A from 43 to 50 min; and 0% solvent A for 10 min) until the end of the run. Solvent A was increased to 100%, seeking to maintain a

balanced column. Acetic acid and methanol (HPLC grade; Sigma-Aldrich, USA) were used in the preparation of the mobile phase.

Addition of standards to the extracts was also used as an identification parameter. The phenolic standards used were gallic acid, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid, resveratrol and quercetin all obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The stock standard solutions were prepared in methanol (HPLC grade; Sigma-Aldrich, USA).

The ABF extract and the standards were filtered through a 0.45- μ m nylon membrane (EMD Millipore, USA) and directly injected into the chromatographic system, in three replicates. The phenolic compounds in the extract were identified by comparison with retention times of standards. Quantification was performed by the construction of analytical curves obtained by linear regression using Origin 6.1 computer software (OriginLab, Northampton, MA, USA) and considering the coefficient of determination (R^2) equal to 0.99.

Enzyme obtention

Were used in the assays the enzymes: porcine pancreatic lipase (EC 3.1.1.3) type II, Sigma; porcine pancreatic α -amylase (EC 3.2.1.1) type VI B, Sigma and porcine pancreatic trypsin (EC 3.4.21.4), Merck. The α -glycosidase (EC 3.2.1.20) was obtained from fresh porcine duodenum according to Souza et al. 2011. The supernatant was collected and used as an enzymatic extract.

Activity of α -amylase, α -glucosidase, lipase and trypsin

The α -amylase activity was determined using the methodology proposed by Noelting and Bernfeld (1948). Thus, the extract and α -amylase enzyme were pre-incubated for 20 min, in a water bath at 37 °C. The substrate was the 1% starch prepared in Tris 0.05 mol L⁻¹, pH 7.0 buffer with 38 mmol L⁻¹ NaCl and 0.1 mmol L⁻¹ CaCl₂. After addition of 100 μ l of the substrate, the mixture was incubated for four periods of time. The reaction was interrupted adding 200 μ l of 3.5 dinitrosalicylic acid and the product read in spectrophotometer at 540 nm.

The α -glucosidase activity was determined according to Kwon et al. (2006), using 5 mmol L⁻¹ *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside in a 0.1 mol L⁻¹ pH 7.0 citrate-phosphate buffer as substrate. In the assay, extract and α -glucosidase enzyme were incubated in a water bath, at 37 °C, for four periods of time, after addition of the substrate. The reaction was interrupted adding 1.000 μ l of 0.05 mol L⁻¹ NaOH and the product was read in a spectrophotometer at 410 nm.

The lipase activity was determined according to Souza et al. 2011, using 8 mmol L⁻¹ *p*-nitrophenylpalmitate in Tris-HCl 0.05 mmol L⁻¹, pH 8.0 buffer containing 0.5% Triton-X100 as substrate. In the assay, extract and lipase enzyme was incubated in a water bath, at 37 °C, for four periods of time, after addition of the substrate. The reaction was stopped, transferring the tubes to an ice bath and adding Tris-HCl 0.05 mmol L⁻¹ pH 8.0 buffer. The *p*-nitrophenol, of yellow coloration, a product of the lipase action on *p*-nitrophenylpalmitate, was read in a spectrophotometer at 410 nm.

The trypsin activity was determined according to the methodology proposed by Erlanger et al. (1961). Thus, extract and trypsin enzyme were incubated in a water bath, at 37 °C, for four periods of time, after addition of *p*-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide substrate (BAPNA), prepared in Tris 0.05

mol L⁻¹, pH 8,2. The reaction was interrupted adding 200 µl of 30% acetic acid and the product read in a spectrophotometer at 410 nm.

For each assay of enzymatic activity, the volume of extract was different and its dilution ranged so that the enzyme inhibition ranged from 50% to 80%, according to the methodology.

The inhibition of the enzymes were obtained from the determination of the slopes of the straight lines (absorbance x time) of the control enzyme (without extract) and enzymes + inhibitor (with extract) activity assays. The slope of the straight line is due to the speed of product formation per minute of reaction and the presence of the inhibitor causes a decrease in that inclination. From that inclination, the absorbance values were converted into micromoles of product through a standard glucose curve for the amylase and of *p*-nitrophenol for glycosidase and lipase, while, for the trypsin, the of BApNA molar extinction coefficient determined by Erlanger et al. (1961) was used.

Preparation of simulated gastric fluid

With the objective of simulating the digestion process in the stomach *in vitro*, enzymatic activity assays in the presence of a simulated gastric fluid were also carried out. For such, the extract was incubated with the simulated gastric fluid prepared according to The United States Pharmacopeia - USP (2005), for 1 h in a water bath at 37 °C. Subsequently, was neutralized with sodium bicarbonate salt to pH 7.2 and only then realized the activity assays.

Results and discussion

Each 100 g ABF yielded 48 g of lyophilized extract (48% yield). The following phenolic compounds were identified in the ABF extract, in mg L⁻¹:

gallic acid (3.32 ± 0.23), catechin (11.33 ± 0.33), epigallocatechin gallate (9.13 ± 0.89), epicatechin (91.86 ± 1.49), syringic acid (37.16 ± 0.12), p-coumaric acid (2.41 ± 0.13) and quercetin (0.29 ± 0.02) (Figure 1); gallic acid is a hydrolyzable tannin monomer, and epigallocatechin gallate, catechin and epicatechin are condensed tannin monomers. It was possible to observe that epicatechin had the highest content, followed by syringic acid. The compounds epicatechin, ferulic acid, salicylic acid and resveratrol were not identified in the ABF extract.

Rains et al. (2011), Cho et al. (2010), Alterio et al. (2007) and Lin et al. (2006) reported that phenolic compounds such as caffeic and chlorogenic acid, catechin, epigallocatechin gallate and quercetin have thermogenic effect, ability to oxidize fats, control appetite, regulate levels of hormones related to obesity and inhibit digestive enzymes involved in the absorption of carbohydrates and lipids. Thus, this study shows that the acerola bagasse extract has bioactive substances and can be exploited by the pharmaceutical industry in search of drugs to control obesity and related diseases.

The results for enzymatic inhibition of ABF before the exposure to gastric fluids are shown in Table 1. The ABF methanol extract inhibited the activity of α -amylase, presenting an inhibition potential of $238.96 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ dry matter - DM. This potential exceeds the one found by Pereira et al. (2011b), who analyzed the white bean crude extract and detected an inhibition of $54.1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Simão et al. (2012), studying aqueous extracts of medicinal plants, observed an inhibition of $2,907.13 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ DM for *Tournefortia paniculata* Cham (marmelinho), higher than that found in this study.

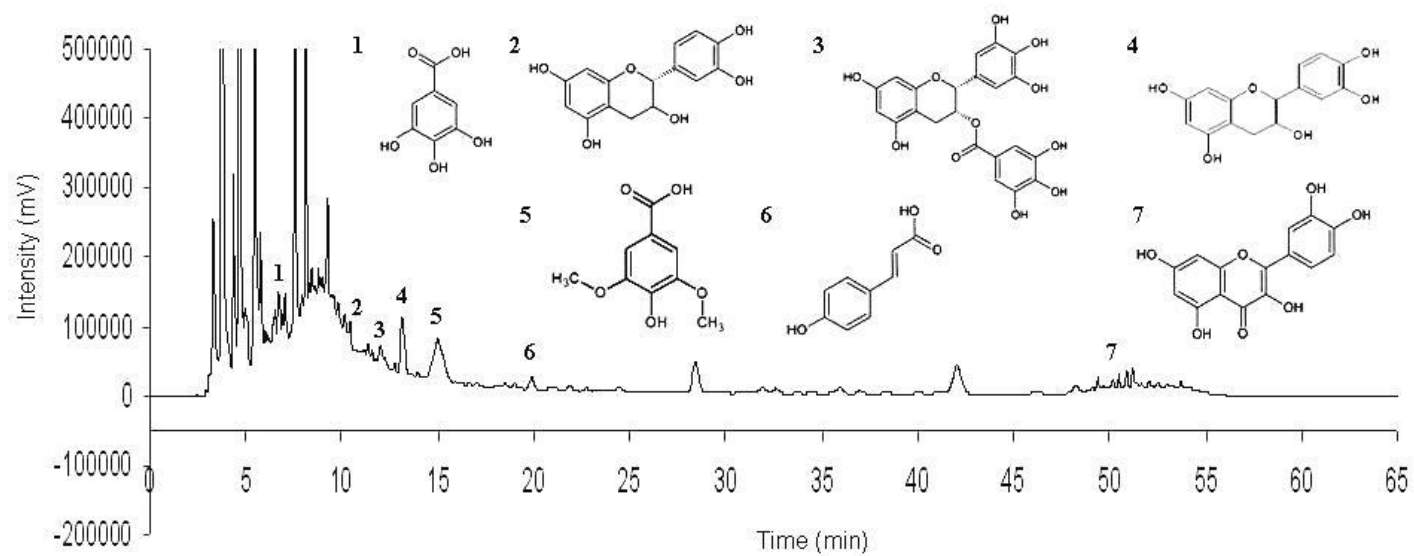


Figure 1. Chromatogram of extract acerola bagasse flour, with peak identification: 1 - gallic acid (time = 6.541); 2 - catechin (time = 10.419); 3 - epigallocatechin gallate (time = 11.987); 4 - epicatechin (time = 13.139); 5- syringic acid (time = 14.988); 6 - *p*-cumaric acid (time = 19.892) and 7 - quercetin (time = 51.185)

Table 1 Inhibition of digestive enzymes by acerola bagasse powder before and after the exposure to simulated gastric fluid

Enzyme	Inhibition (IEU ¹)*	
	Before exposure	After exposure
α-amylase	238.96 \pm 1.64	170.08 \pm 1.06
α-glycosidase	78.51 \pm 1.78	69.29 \pm 0.28
Lipase	nd ²	nd ²
Trypsin	227.52 \pm 3.59	84.73 \pm 5.41

Data from three repetitions, with mean \pm standard deviation. *The ABF extract measured for each of the enzymes was diluted to provide an inhibition between 50% and 80%, in order to ensure result reliability. ¹IEU = Inhibited Enzyme Unit in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ Dry Matter – DM. ²nd = inhibition not detected.

α -amylase is related with the digestion of carbohydrates and, consequently, with the elevation in glycemic levels after a meal. High glycemic levels lead to serious health problems in the population, such as type 2 diabetes. The intake food rich in α -amylase poses as an interesting strategy in the prevention and treatment of hyperglycemia, by slowing postprandial glucose levels in blood after the ingestion of carbohydrates (Vadivel et al., 2011).

The inhibition of α -glucosidase by the ABF extract was about 78.51 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ DM. The inhibitory potential of ABP found in this paper surpasses the ones verified by Simão et al. (2012) who, studying aqueous extracts of medicinal plants like *Aloe vera* (L.) Burm. (Aloe), *Simaba ferruginea* St. Hil. (calunga), *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja), *Garcinia cambogia* Desr. (garcinia), *Tournefortia paniculata* Cham. (marmelinho), found inhibitions of 0.58 and 35.46 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ DM, as well as those from Pereira et al. (2011),

who analyzed commercial samples of *Hoodia gordonii*, used as an auxiliary in the treatment of obesity, and found inhibitions of 10.40 e 16.70 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ DM.

The inhibition of α -glucosidase extends gastric emptying, leads to satiety and weight loss, effects which can be useful in the treatment of obesity (Chen et al., 2008).

Therefore, the inhibition of α -amylase and α -glycosidase by natural products can provide an alternative for the treatment of obesity in substitution to synthetic drugs now available on the market, besides controlling glucose levels in blood in type 2 diabetes patients (McDougall et al., 2005a).

The ABF extract was not able to inhibit lipase, an enzyme involved in lipid metabolism, neither before nor after the exposure to simulated gastric fluid. However, for trypsin, an inhibition of 227.52 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ DM was observed. When trypsin inhibitors are present in the diet, these may lead to a reduction in growth rate in animals, followed by a decrease in protein digestibility, leading to weight loss and endogenous protein catabolism (McDougall et al., 2005a). Therefore, the trypsin inhibitor is considered an antinutritional factor.

The passage of the ABF extract through the gastrointestinal cavity may lead to structural modifications on the inhibitors because of the pH of the gastric acid. Considering the expressive inhibition of α -amylase, α -glycosidase and trypsin in the presence of the ABF extract, this extract was submitted to a gastric fluid assay (Table 1).

In the presence of simulated gastric fluid, the ABF methanol extract still maintained 71% of its inhibitory activity over α -amylase and 88% of inhibitory activity over α -glycosidase. Therefore, the extract did not show a considerable inhibitory activity over these two enzymes after they were submitted to simulated gastric fluid.

The ABF extract decreased the inhibition of trypsin by 63% in the presence of simulated gastric fluid. This reduction in trypsin inhibition is considered positive since, when inhibition occurs, it is considered antinutritional, impairing protein digestion, which is the main source of essential amino acids. However, a residual inhibitory activity of 37% was still observed. It is noted that the resistance of the inhibitor to pass through the simulated gastric fluid is a strong indicative that these results will repeat in *in vivo* assays.

In this study, the inhibition of digestive enzymes can probably be explained by the presence of phenolic compounds in the methanol ABF extract, whose levels were different for each enzymatic assay assessed (Table 2).

Table 2 Content of phenolic compounds in the methanol extract of acerola bagasse flour, used in each enzymatic assay

Phenolic Compound (μg)	Enzymatic assays			
	α -amylase ¹	α -glycosidase ²	Lipase ³	Trypsin ⁴
Gallic Acid	0.02	0.06	0.17	0.66
Catechin	0.07	0.19	0.57	2.26
Epigallocatechin Gallate	0.05	0.15	0.46	1.83
Epicatechin	0.54	1.53	4.60	18.4
Syringic Acid	0.22	0.62	1.86	7.44
<i>p</i> -Cumaric Acid	0.01	0.04	0.12	0.48
Quercetin	1.71×10^{-3}	4.83×10^{-3}	0.01	0.06
Σ Phenolic Compounds	0.91	2.59	7.79	31.13

¹ Extract dilution 1:7.5; ² Extract dilution 1:2; ^{3 and 4} Crude extract

α -amylase was the one that had the smallest content of phenolic compounds, which led to an inhibition of 0.91 μg . On the other hand, the content of phenolic compounds was higher (31.13 μg) for the trypsin assay, that is, 34 times superior to that found for α -amylase. Therefore, this suggests that smaller contents of phenolic compounds may not lead to trypsin inhibition, which would be beneficial, since it could reduce the absorption of carbohydrates and allow protein digestion.

Gallic acid is considered a hydrolyzable tannin, when found in the form of gallic acid esters, while catechin, epicatechin gallate and epicatechin, when found in the form of flavonoids, are considered condensed tannins. These compounds have strong interactions with metal ions and macromolecules such as polysaccharides, besides the ability to form soluble complexes with several proteins, as digestive enzymes (Gholamhoseinian et al., 2010; Won et al., 2007). This ability that tannins exhibit to interact with proteins makes this class of substances powerful digestive enzyme inhibitors.

McDougall et al. (2005b) report that red fruit extracts in phenolic compounds inhibit two main enzymes involved in starch digestion, α -amylase and α -glycosidase, *in vitro*. In a similar way, recent studies with red fruits reported inhibition of α -amylase and α -glycosidase, and mentioned that tannins were the most effective compounds in inhibiting these enzymes (Boath et al., 2012). Kam et al. (2013), studying the effects of extracts from different parts of pomegranate (pulp, peels, seeds and flower) over the digestive enzymes α -amylase and α -glycosidase, showed that the methanol extract from the pomegranate flower, where the phenolic compounds gallic acid and ellagic acid are found, exhibits a potent inhibitor effect on these enzymes.

Klaus et al. (2005) reported that rats fed epigallocatechin gallate, purified from green tea, had an obesity decrease induced by the diet, due to a reduction in energy absorption and an increase in lipid oxidation. On the other

hand, Bryans et al. (2007) reported that black tea is efficient in reducing postprandial blood glucose levels and related this fact to the presence of phenolic compounds such as epigallocatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin and epicatechin gallate.

Flavonoids like quercetin comprise a heterogeneous class of phenolic compounds present in plants, which can also act in the organism, inhibiting digestive enzymes. Wenzel (2013) reported that quercetin is a promising enzyme inhibitor, limiting carbohydrate digestion and controlling postprandial glucose levels in blood, thus confirming the result obtained by Tadera et al. (2006), who reported the inhibitory activity of quercetin in the presence of α -amylase.

Lin and Lin-Shiau (2006), report that flavonoids have the ability to act on the sympathetic nervous system through the modulation of noradrenaline, thus increasing thermogenesis and fat oxidation. It also prevents the increase in the size and number of adipocytes, therefore preventing the deposition of fat in the body and regulating body weight.

Phenolic extracts of lentils containing *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, trans-*p*-coumaric acid, epicatechin gallate, quercetin and kaempferol were shown to be good inhibitors of lipase and α -glycosidase, contributing to control glucose levels in blood, as well as obesity (Zhang et al., 2015).

Most phenols previously mentioned were found in the ABF extract, which could have led to a complexation with digestive enzymes and, probably, contributed to its inhibition. The inhibition of digestive enzymes is a promising alternative for the treatment of obesity and type 2 diabetes, especially by the fact they act in the small intestine, without acting in the central nervous system, where prescribed anorexigenic drugs usually act.

Conclusion

The ABF methanol extract that contains the phenolic compounds gallic acid, catechin, epicatechin gallate, epicatechin, syringic acid, p-cumaric acid and quercetin, was able to inhibit *in vitro* digestive enzymes α -amylase and α -glucosidase. This shows that the ABF extract may represent a good source of inhibitors, and can be used as an auxiliary in the treatment of obesity, associated comorbidities and in the control of type 2 diabetes.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grants provided.

Authors' contributions

TRM contributed in running the laboratory work, analysis of the data and drafted the paper. AAC contributed in running the laboratory work. AAS participated of enzyme activity assays. FCOC contributed to chromatographic analysis. VOR participated of enzyme activity assays. ADC designed the study, supervised the laboratory work and contributed to critical reading of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

References

Abeso - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica 2014.

- <http://www.abeso.org.br/lenoticia/1120/abeso+defende+o+tratamento+completo+da+obesidade+com+acesso+a+medicamentos>, access in March 2015.
- Alterio, A.A., Fava, D.A.F., Navarro, F. 2007. Interaction of the daily ingestion of Green tea (*Camella sinensis*) in the cellular metabolism and the adipose cell promoting emagrecimento. Rev. Bras. Obes. Nut. Emag. 1, 27-37.
- Angelo, P.M., Jorge, N., 2007. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 66, 1-9.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) 2012. Official methods of analysis. 19^{ed}. Gaithersburg, 3000p.
- Balasubramaniam, V., Mustar, S., Khalid, N.M., Rashed, A.A., Noh, M.F.M., Wilcox, M.D., Peter, I.C., Brownlee, I.A., Pearson, J.P., 2013. Inhibitory activities of three Malaysian edible seaweeds on lipase and α -amylase. J. Appl. Phycol. 25, 1405–1412.
- Boath, A.S., Grussu, D., Stewart, D., McDougall, G., 2012. Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: a source of potential health benefits? Food Dig. 3, 1-7.
- Boniglia, C., Carratù, B., Di Stefano, S., Giammarioli, S., Mosca, M., Sanzini, E., 2008. Lectins, trypsin and α -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris*. Eur. Food Res. Technol. 227, 689-693.
- Bryans, J.A., Judd, P.A., Ellis, P.R., 2007. The effect of consuming instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans. J. Am. Coll. Nutr. 26, 471-477.
- Chen, X., Xu, G., Li, X., Li, Z., Ying, H., 2008. Purification of an α -amylase inhibitor in a polyethylene glycol/fructose-1,6-bisphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. Process Biochem. 43, 765-768.
- Cho, A.S., Jeon, S.M., Kim, M.J., Yeo, J., Seo, K.L., Choi, M.S., Lee, M.K. 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. Food Chem. Toxicol. 48, 937-943.

- Emater 2002. Área de proteção ambiental do Município de Perdões. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater), Unidade de Consultoria e Projetos, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
- Erlanger, B.F., Kukowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Gholamhoseinian, A., Shahouzehi, B., Sharifi-far, F. 2010. Inhibitory effect of some plant extracts on pancreatic lipase. *Int. J. Pharm.* 6, 18–24.
- Hen, Q., Lv, Y., Yao, K. 2006. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem.* 101, 1178-1182.
- Kam, A., Li, K.M., Razmovshi-Naumovshi, V., Nammi, S., Shi, J., Chan, K., Li, G.Q., 2013. A comparative study on the inhibitory effects of different parts and chemical constituents of pomegranate on α -amylase and α -glucosidase. *Phytother Res.* 27, 1614–1620.
- Klaus, S., Pultz, S., Thone-Reineke, C., Wolfram, S., 2005. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int. J. Obesi.* 29, 615-623.
- Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Shetty, K., 2008. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J. Food Biochem.* 32, 15-31.
- Lin, J.K., Lin-Shiau, S. Y. 2006. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 211-217.
- Marques, T.R., Corrêa, A.D., Lino, J.B. dos R., Abreu, C.M.P. de, Simão, A.A., 2013. Chemical components and functional properties of acerola (*Malpighia emarginata* dc.) residue flour. *Food Sci. Technol.* 33, 526-531.
- McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., 2005a. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2760–2766.

- McDougall, G.J., Fiffe, S., Dobson, P., Stewart, D., 2005b. Anthocyanins from red wine – Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochem.* 66, 2540-2548.
- Noelting, G., Bernfeld, P., 1948. Sur les enzymes amylolytiques – III. La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. *Helv. Chim. Acta.* 31, 286-290.
- Pereira, C.A., Pereira, L.L.S., Corrêa, A.D., Chagas, P.M.B., Souza, S.P., Santos, C.D., 2011a. Inhibition of digestive enzymes by commercial powder extracts of *Hoodia gordonii*. *Rev. Bras. Biociên.* 9, 265-269.
- Pereira, L.L.S., Santos, C.D., Sátiro, L.C., Marcussi, S., Pereira, C.A., Souza, S.P., 2011b. Inhibitory activity and stability of the white bean flour extract on digestive enzymes in the presence of simulated gastric fluid. *Rev. Bras. Farm.* 92, 367-372.
- Rains, T.M., Agarwal, S., Maki, K.C. 2011. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J. Nutr. Biochem.* 22, 1-7.
- Santiago-Mora, R., Casado-Díaz, A., Castro, M.D., Quesada-Gómez, J.M. 2011. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int.* 22, 675-684.
- Simão, A.A., Corrêa, A.D., Chagas, P.M.B., 2012. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. *J. Med. Plants Res.* 6, 5826-5830.
- Souza, S.P., Pereira, L.L.S., Souza, A.A., Santos, C.D., 2011. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 450-455.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T., 2006. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52, 149–153.

- The United States Pharmacopeia. 2005. The national formulary NF 18 (Pharmacopeial Convention Inc). Rockvile.
- Vadivel, V., Nandety, A., Biesalski, H.K., 2011. Antioxidant, free radical scavenging and type II diabetes-related enzyme inhibition properties of traditionally processed Jequirity bean (*Abrus pectorius* L.). *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 2505-2512.
- Vogel, P., Machado, I.K., Garavaglia, J., Zani, V.T., Souza, D., Dal Bosco, S.M., 2015. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L.) to human health. *Nutr. Hosp.* 31, 1427-1433.
- Wanderley, E.M., Ferreira, V.A., 2010. Obesity: a plural perspective. *Cienc. Saúde Coletiva.* 15, 185-194.
- Wenzel, U., 2013. Flavonoids as drugs at the small intestinal level. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 864-868.
- Who - World Health Organization. 2015. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, access in March 2015.
- Won, S., Kim, S., Kim, Y. 2007. Licochalcone A: A lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Food Res. Int.* 40, 1046–1050.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D.D., Tang, Y., Chen, P.X., Liu, R., Liu, Q., Tsão, R. 2015. Phenolic profiles of 20 canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chem.* 172, 675-684.

ARTIGO 2

Artigo a ser submetido à revista Anais da Academia Brasileira de Ciências

Extrato metanólico liofilizado do bagaço de acerola: atividade antioxidante e hepatoprotetora em ratos *Wistar*

Tamara Rezende Marques^{1*}, Aline Aparecida Caetano¹, Pedro Henrique Cesar¹, Mariana Aparecida Braga¹, Raimundo Vicente de Sousa² e Angelita Duarte Corrêa¹

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, CP 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, CP 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

*Autor correspondente: tamara_rezende@hotmail.com e/ou angelita@dqi.ufla.br.

Resumo

Os compostos fenólicos previnem a ação de espécies reativas no organismo humano e o surgimento de várias doenças. Assim, avaliou-se o potencial antioxidante e hepatoprotetor do extrato metanólico liofilizado do bagaço de acerola (EMBA), que é resíduo do processamento industrial do fruto - rico em compostos fenólicos, contra a ação tóxica do CCl₄, em ratos *Wistar*, durante 21 dias . Para obtenção do extrato utilizou-se a proporção de 1:50 (g farinha de bagaço de acerola: mL metanol 50%). Os ratos foram divididos em seis grupos de seis animais e receberam os seguintes tratamentos: G1- Água; G2- Água e

CCl₄; G3- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal (PA); G4- EMBA contendo 0,5 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄; G5- EMBA contendo 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄ e G6- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄. Verificou-se que os tratamentos G4 e G5 apresentaram diminuição na atividade da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamiltransferase e aumento da superóxido dismutase, capacidade antioxidante total e do teor de albumina em relação ao G2. Conclui-se que o EMBA apresenta ação antioxidante e hepatoprotetora, nas doses de 0,5 g e 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata*, resíduo de fruta, compostos fenólicos.

Abstract

Phenolic compounds prevent the action of reactive species in the human body, as well as the onset of various diseases. Thus, were evaluated the antioxidant and hepatoprotective potential of the lyophilized methanol extract of acerola bagasse (MEAB), which is residue from the industrial processing of the fruit - rich in phenolic compounds, against the toxic action of CCl₄ in *Wistar* rats, during 21 days. For the obtention of the extract used the ratio of 1:50 (acerola bagasse flour g: ml 50% methanol). The rats were divided into six groups of six animals and received the following treatments: G1- Water; G2- Water and CCl₄; G3- MEAB containing 5.0 g of phenolic compounds/70 kg rat weight (RW); G4- MEAB containing 0.5 g of phenolic compounds/70 kg RW and CCl₄; G5- MEAB containing 1.0 g of phenolic compounds/70 kg RW and CCl₄ and G6- MEAB containing 5.0 g of phenolic compounds/70 kg RW and CCl₄. It was found that the treatments G4 and G5 presented a decrease in the activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and gamma glutamyl transferase, and an increase in superoxide dismutase, total antioxidant capacity

and albumin content in relation to G2. It is concluded that the MEAB has antioxidant and hepatoprotective action, at doses of 0.5 g and 1.0 g of phenolic compounds/70 kg RW.

Keywords: *Malpighia emarginata*, fruit waste, phenolic compounds.

Introdução

O fígado é um órgão de grande importância, responsável por reações metabólicas essenciais e está exposto a uma variedade de xenobióticos, como drogas, vírus, produtos químicos e poluentes ambientais levando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que promovem o desenvolvimento de várias doenças (Chandan et al. 2008, Feijóo et al. 2010, Lima et al. 2013).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas naturalmente durante as reações metabólicas e exercem papel fisiológico importante nos mecanismos defensivos celulares. Entretanto, em situações patológicas sua produção pode aumentar de forma a exceder as concentrações viáveis ao funcionamento normal do organismo humano resultando em inúmeros processos deletérios, com o conseqüente surgimento de várias doenças, como câncer, distrofia muscular e desordens neurológicas (Lobo et al. 2010, Stumpf et al. 2012).

As espécies reativas podem ou não conter elétrons desemparelhados, podendo promover danos nas células e agir sobre os ácidos graxos insaturados presentes nas membranas levando a eventos como a inativação celular por morte programada (Martin e Grotewiel 2006, Kataki et al. 2012).

O organismo, por sua vez, disponibiliza um sistema antioxidante de defesa composto por diferentes enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase, que junto aos antioxidantes adquiridos na dieta, atuam neutralizando as espécies reativas (Kataki et al. 2012). Os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação de

macromoléculas envolvidas nos processos oxidativos impedindo ou revertendo a ação das espécies reativas (Kuriakose e Kurup 2010, Katakai et al. 2012), e a cooperação entre os diferentes antioxidantes, presentes em nosso organismo e adquiridos da dieta, oferece maior proteção contra o ataque de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (Kuriakose e Kurup 2010).

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é usado como indutor de fibrose hepática em animais (Weber et al. 2003, Porchezian e Ansari 2005, Lima et al. 2007), cuja principal consequência é a peroxidação lipídica, a qual é mediada pela produção de espécies reativas derivadas do CCl_4 e, quando administrado repetidamente em uma dose baixa, induz a fibrose hepática e posteriormente a cirrose (Muriel e Escobar 2003). O uso de CCl_4 em protocolos experimentais contribui para os estudos utilizando agentes preventivos, protetivos ou curadores de hepatotoxicidade e suas consequências (Weber et al. 2003, Lima et al. 2007), visto que seus mecanismos de indução de danos são amplamente descritos. A confirmação de dano hepático é realizada por testes bioquímicos específicos, como a determinação da atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), cuja presença no sangue é uma consequência da lesão celular (Lima et al. 2013).

Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais têm sido desenvolvidas visando à substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos, aos quais se atribuem efeitos deletérios ao organismo humano quando utilizados em doses elevadas. Além dos possíveis riscos que o uso irregular e/ou indiscriminado dos antioxidantes sintéticos pode acarretar ao homem, soma-se a rejeição generalizada dos aditivos alimentares sintéticos (Katakai et al. 2012).

As frutas contêm substâncias distintas com atividades farmacológicas. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas e taninos, além das vitaminas C, E e carotenoides, contribuem para

os efeitos benéficos destes alimentos (Silva et al. 2010). Pesquisas demonstram que os compostos fenólicos possuem efeitos significativos na redução do câncer, e evidências epidemiológicas mostram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos ricos em substâncias fenólicas, possivelmente por suas propriedades antioxidantes (Bernardes et al. 2010, Senger et al. 2010, Zakir e Freitas 2015).

Estudos relatam a ação antioxidante e hepatoprotetora de extratos naturais contra os danos oxidativos induzidos pelo CCl_4 (Huo et al. 2011, Singhal e Gupta 2012, El-Tawil et al. 2013, Lima et al. 2013). O bagaço de acerola, resíduo proveniente do processamento para a obtenção do suco, é rico em compostos fenólicos, com teor de $10,82 \text{ g } 100^{-1} \text{ g}$ de matéria seca (Marques et al. 2013). Assim, o bagaço de acerola é fonte destes compostos, cujo extrato provavelmente poderá combater as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, com possíveis aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, agroquímica e alimentícia, além de agregar valor ao fruto.

Assim, o objetivo neste estudo foi avaliar o potencial antioxidante e hepatoprotetor do extrato metanólico liofilizado do bagaço de acerola contra a ação tóxica do CCl_4 , em ratos *Wistar*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparo da amostra

As acerolas, *Malpighia emarginata* DC., da variedade BRS 238 Frutacor, cultivadas no município de Perdões, MG, Brasil, foram utilizadas para a extração da polpa, sendo o bagaço fornecido em três lotes por uma microempresa de polpas de frutas. Para o preparo da farinha do bagaço de acerola, 4 kg do bagaço de acerola foram congelados a -18°C e liofilizados em recipientes de vidro protegidos da luz, por sete dias, obtendo 450 g de bagaço seco. Após a liofilização, o bagaço foi homogeneizado em graal, passado em

peneiras e a maioria das partículas foram retidas em peneiras entre 40 mesh (0,425 mm) e 80 mesh (0,180 mm), sendo classificado granulometria fina. Em seguida, essa farinha do bagaço de acerola (FBA) foi acondicionada em frasco hermeticamente fechado, protegida da luz, em geladeira a 4 °C.

Preparo do extrato

Para obtenção do extrato, utilizou-se 1 g FBA com 50 mL de metanol 50% (1:50), sob refluxo, em chapa aquecedora a 80 °C, por 15 minutos de fervura, em três repetições. Após, o extrato foi filtrado em papel de filtro e recolhido. O resíduo da extração foi submetido novamente ao processo de extração por mais duas vezes. Os filtrados reunidos foram evaporados na chapa aquecedora (AOAC 2012), ficando livres de metanol. Após esfriar, este filtrado foi congelado, liofilizado e pesado para determinação do rendimento da extração.

Neste extrato metanólico liofilizado do bagaço de acerola (EMBA) foi quantificado o teor de compostos fenólicos usando o reagente de Folin-Denis (AOAC 2012), e o ácido tânico como padrão.

Bioensaio

Animais e condições do experimento

O experimento foi desenvolvido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação com Animais, tendo sido o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras - UFLA (Protocolo nº 007/14). Foram utilizados 36 ratos machos *Wistar (Rattus norvegicus)*, em fase de crescimento com peso corporal inicial de aproximadamente 224 g.

Durante todo o experimento os animais permaneceram em caixas de polietileno (49 cm x 34 cm x 16 cm), com cama de maravalha, sempre em

número máximo de seis animais por caixa, em sala com temperatura ambiente de 21 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas e com acesso à ração própria para a espécie (Muvilab CR1®) e água *ad libitum*. Os cuidados de higienização, alimentação e a gavagem foram diários e realizados pela mesma pessoa.

Os animais foram divididos em seis grupos de seis animais cada um e receberam os seguintes tratamentos, por 21 dias: G1- Água; G2- Água e CCl₄; G3- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal (PA); G4- EMBA contendo 0,5 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄; G5- EMBA contendo 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄ e G6- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄. Para a indução da lesão hepática foram administrados aos animais, doses de tetracloreto de carbono (CCl₄) de 1,5 mL kg⁻¹ solubilizados em óleo de oliva na proporção de 1:1 via intraperitoneal, no terceiro e sexto dia da última semana de tratamento dos animais com o extrato.

A dose de EMBA a ser administrada foi baseada na dose usual máxima de compostos fenólicos sugerida para humanos, de 1,0 g dia⁻¹ (Scalbert et al. 2005) por peso médio de um humano adulto de 70 kg. A dose por peso corporal dos animais foi calculada com base no teor de compostos fenólicos encontrado no EMBA. As doses foram preparadas em 1 mL de água e administradas aos animais, por gavagem uma vez ao dia, por 21 dias, aferindo o peso do animal no dia. O mesmo procedimento foi realizado para os grupos controle negativo e positivo, para os quais foram administrados somente água e água com CCl₄, respectivamente.

Término do bioensaio

Ao final do experimento, os ratos foram submetidos à anestesia geral utilizando-se o tiopental sódico (25 mg L⁻¹) via intraperitoneal, na dose de 40 mg kg⁻¹. Após a coleta de 2 a 4 mL de sangue por punção cardíaca, que promoveu a

morte por exsanguinação, o sangue foi centrifugado, a 2.500 x g, durante 10 minutos, para a obtenção do soro, que foi mantido sob refrigeração, sendo usado subsequentemente para dosagem de enzimas.

Após a eutanásia, foi realizada também necropsia com retirada do fígado e pesagem. O fígado foi dividido em três partes, sendo uma parte destinada à análise histológica qualitativa, outra utilizada para determinação da peroxidação lipídica e a última para quantificação do extrato etéreo.

Análises no fígado

a) Determinação da gordura hepática

Parte do fígado foi pesado e liofilizado até peso constante. Em seguida, foi triturado em gral e submetido à extração lipídica utilizando o extrator Soxhlet (AOAC 2012).

b) Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo Simão et al. (2015). A concentração de TBARS foi calculada a partir da curva padrão do dialdeidomalônico - MDA (1,1,3,3 tetraetóxiopropano). Os resultados foram expressos em μmol de MDA g^{-1} amostra fresca.

c) Histopatologia

Para as análises histopatológicas, foram preparadas lâminas contendo cortes provenientes do fígado de cada rato. No processamento histológico, o fígado foi seccionado em pequenos fragmentos, imersos em formalina 10%, durante 24 horas e mantido em álcool 70%, até o momento da inclusão em parafina. Foram feitos cortes de 4 μm em micrótomo rotativo, corados por

hematoxilina-eosina, montados em lâminas/lamínulas de vidro e analisados sob microscopia de luz (aumento de 100 vezes), para a análise qualitativa.

Análises no soro

a) Dosagem de albumina, atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama glutamiltransferase e superóxido dismutase e capacidade antioxidante total

O soro foi utilizado para determinar a concentração da albumina e a atividade das enzimas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT) e superóxido dismutase (SOD) e a capacidade antioxidante total (CAT).

A concentração de albumina sérica e a atividade das enzimas AST, ALT e GGT foram realizadas por *kits* comerciais (Labtest) utilizando o equipamento Analisador Bioquímico Veterinário Automático Thermoplate. Já a atividade da enzima SOD e a CAT foram mensuradas usando os *kits Superoxide Dismutase Assay* e *Antioxidant Assay Cayman* (Cayman Chemical Company®), respectivamente.

Análise estatística

O bioensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com seis tratamentos (G1, G2, G3, G4, G5, e G6) e seis repetições, representando cada animal uma parcela experimental. Os dados do peso do fígado, gordura hepática, teor de albumina, atividade das enzimas e peroxidação lipídica foram submetidos à análise de variância e quando significativa aplicou-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparação das médias, por meio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada 100 g de farinha do bagaço de acerola (FBA) renderam 48 g de extrato metanólico liofilizado (EMBA), contendo 13,47 g de compostos fenólicos para 100 g⁻¹ de extrato metanólico liofilizado.

O peso médio do fígado e os teores de gordura hepática dos tratamentos G1 (água), G3 (contendo extrato), G4, G5 e G6 (extrato e CCl₄) foram significativamente menores que o G2 (água e CCl₄), indicando que o CCl₄ elevou o peso dos fígados e os índices de lipídeos hepáticos e que a administração do EMBA protegeu o fígado do acúmulo de lipídeos induzido pelo CCl₄ (Tabela 1). A esteatose hepática é causada pelo acúmulo de gorduras no fígado, sendo que esse quadro pode ser provocado pela presença de substâncias tóxicas, como o CCl₄ (Ramakrishna et al. 2011).

O tratamento G1 (água) apresentou maior concentração de albumina que o G2 (água e CCl₄), indicando que o CCl₄ diminuiu os índices de albumina no soro dos animais (Tabela 2). Os tratamentos G4, G5 e G6 (extrato e CCl₄) apresentaram níveis significativamente maiores que o tratamento G2 e menores que o G1, demonstrando que o EMBA conferiu proteção ao fígado dos animais em todas as doses testadas, apesar de não ter atingido os níveis normais de albumina, apresentados pelo tratamento G1. Todavia, o teor de albumina no tratamento G3 (contendo extrato) foi superior ao G2, mas não se igualou ao G1 parecendo que o tratamento contendo apenas extrato na concentração de 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA acarretou alterações ao fígado.

A albumina é a proteína sintetizada no fígado mais abundante do plasma sanguíneo, constituindo cerca de 50% a 65% (Nicoluzzi et al. 2000).

Como a administração do CCl₄ elevou os índices de lipídeos hepáticos (Tabela 1), conseqüentemente acarretou a redução da concentração de albumina sérica. Segundo Nicoluzzi et al. (2000), o acúmulo de gordura provoca uma

redução da capacidade de síntese hepática, reduzindo a concentração de albumina.

Tabela 1. Média de peso dos fígados e quantidade de gordura hepática dos ratos *Wistar*, submetidos a diferentes tratamentos, durante 21 dias.

Tratamentos*	Peso do fígado (g)	Gordura hepática (g 100 g ⁻¹)
G1	7,30 ± 1,01b	9,58 ± 1,01b
G2	8,77 ± 0,55a	12,63 ± 1,95a
G3	7,79 ± 0,38b	9,10 ± 0,95b
G4	7,19 ± 0,54b	8,26 ± 1,32b
G5	7,62 ± 0,71b	9,67 ± 1,66b
G6	7,01 ± 1,16b	8,12 ± 1,83b
CV	9,35	15,73

*Tratamentos: G1- Água; G2- Água e CCl₄; G3- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal (PA); G4- EMBA contendo 0,5 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄; G5- EMBA contendo 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄ e G6- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄. Os valores representam as médias de seis repetições ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos dos ratos *Wistar*, submetidos a diferentes tratamentos, durante 21 dias.

Tratamentos*	Albumina (g dL ⁻¹)	AST ¹ (U L ⁻¹)	ALT ² (U L ⁻¹)	GGT ³ (U L ⁻¹)	SOD ⁴ (U mL ⁻¹)	CAT ⁵ (mmol L ⁻¹)
G1	5,24 ± 0,39a	55,14 ± 7,05b	46,93 ± 1,17c	1,31 ± 0,12c	35,73 ± 2,83a	1,38 ± 0,21a
G2	3,51 ± 0,32c	81,54 ± 3,97a	78,13 ± 1,58a	3,87 ± 0,18a	27,16 ± 1,40c	0,81 ± 0,10b
G3	4,27 ± 0,39b	55,22 ± 7,01b	52,65 ± 1,18b	1,42 ± 0,13c	31,60 ± 1,45b	1,25 ± 0,32a
G4	4,30 ± 0,58b	56,63 ± 5,49b	46,89 ± 3,81c	1,57 ± 0,25c	29,70 ± 0,59b	1,55 ± 0,34a
G5	4,43 ± 0,49b	53,03 ± 4,31b	42,54 ± 1,62d	1,80 ± 0,11b	31,34 ± 0,66b	1,62 ± 0,39a
G6	4,30 ± 0,23b	54,48 ± 5,76b	40,61 ± 1,94d	1,42 ± 0,16c	31,48 ± 1,34b	1,69 ± 0,27a
CV	9,39	9,55	4,07	8,64	5,04	21,07

*Tratamentos G1- Água; G2- Água e CCl₄; G3- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal (PA); G4- EMBA contendo 0,5 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄; G5- EMBA contendo 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄ e G6- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄. ¹AST: aspartato aminotransferase. ²ALT: alanina aminotransferase. ³GGT: Gama glutamiltransferase. ⁴SOD: superóxido dismutase. ⁵CAT: capacidade antioxidante total. Os valores representam as médias de seis repetições ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os tratamentos G1 (água) e G3 (contendo extrato) apresentaram atividade de AST, ALT e GGT significativamente menor que G2 (água e CCl₄) (Tabela 2), indicando que a administração do CCl₄ acarretou elevação significativa nos níveis dessas enzimas, que segundo Mota (2009), lesões ou destruição das células hepáticas resultam em liberação de aminotransferases para a circulação sanguínea.

Para a enzima AST (Tabela 2), observou-se que os tratamentos G4, G5 e G6 (extrato e CCl₄) inibiu a ação do CCl₄, produzindo a enzima com atividade igual ao tratamento G1 (água) e, que o tratamento G3 (contendo extrato) não acarretou alteração na atividade desta enzima, sendo também estatisticamente igual ao grupo G1.

Para a enzima ALT, os tratamentos G4, G5 e G6 (extrato e CCl₄) mostraram redução nos níveis desta enzima, sendo estatisticamente iguais ao G1 e diferentes do G2 (água e CCl₄), que apresentou maior atividade. Os tratamentos G5 e G6, com maiores concentrações de compostos fenólicos no extrato acarretaram maior redução nos níveis da ALT. Entretanto, o tratamento G3 (contendo extrato) apresentou maior atividade que o G1 (água), sugerindo que o extrato em dose igual ou superior a cinco vezes a dose usual para humanos parece acarretar lesão ao fígado.

Em relação à enzima GGT (Tabela 2), observou-se que os tratamentos G4, G5 e G6 (extrato e CCl₄) apresentaram diminuição da atividade da enzima em comparação ao grupo G2 (água e CCl₄), sendo iguais estatisticamente ao G1 (água), exceto o grupo G5, cujo atividade foi maior que o G1.

Assim, parece que o EMBA teve papel protetor sob a elevação da atividade destas enzimas, provavelmente devido aos compostos fenólicos presentes neste extrato.

O tratamento G2 (água e CCl₄) apresentou menor atividade da SOD que o G1 (água), indicando que o CCl₄ diminuiu a atividade desta enzima no soro

dos animais (Tabela 2). Com a administração do EMBA houve um incremento na atividade desta enzima, não havendo diferença significativa entre as doses, porém, não atingiram os níveis do G1. Todavia, o G3 (contendo extrato) foi superior ao G2, mas não se igualou ao G1 sugerindo que o tratamento contendo apenas extrato na concentração de 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA extrato acarretou alterações ao fígado.

A enzima SOD faz parte do mecanismo de defesa antioxidante celular. Ela é capaz de remover os radicais superóxido (O_2^-) convertendo-os em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez é menos reativo e pode ser degradado pela ação de outras enzimas (Hitchon e Ei-Gabalawy 2004).

Observou-se que a CAT (Tabela 2) dos tratamentos G4, G5 e G6 (com o extrato e CCl_4) e G3 (contendo extrato) foram estatisticamente iguais ao G1 (água) e superiores ao G2 (água e CCl_4). Portanto, a administração do EMBA aumentou a capacidade antioxidante total no organismo dos animais. A soma de antioxidantes endógenos e dos derivados dos alimentos representa a capacidade antioxidante total (CAT) do sistema. Assim, a CAT pode fornecer informações biológicas mais relevantes, em comparação à medida de componentes individuais como a atividade da SOD, uma vez que considera o efeito cumulativo de todos os antioxidantes presentes no plasma e fluidos corporais (Kuriakose e Kurup 2010).

A lipoperoxidação (Figura 1) para os tratamentos G1 (água) e G3 (contendo extrato), G4, G5 e G6 (extrato e CCl₄), foram significativamente menores que o G2 (água e CCl₄), com redução média de malonaldeído (MDA) de 42,34%. Este resultado sugere que as substâncias fenólicas presentes neste extrato, provavelmente, foram às responsáveis pelo efeito antioxidante.

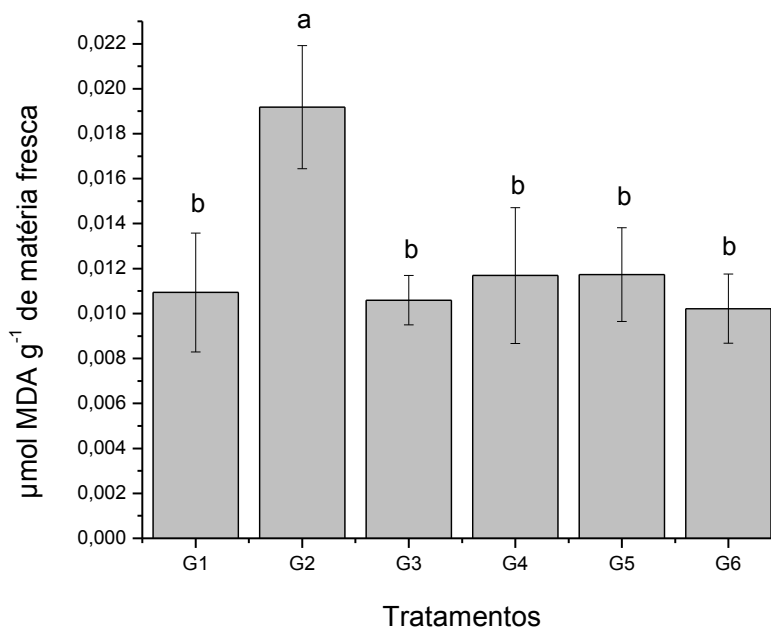


Figura 1. Produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado de ratos *Wistar* submetidos a diferentes tratamentos, durante 21 dias. Tratamentos: G1- Água; G2- Água e CCl₄; G3- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal (PA); G4- EMBA contendo 0,5 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄; G5- EMBA contendo 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄ e G6- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄. ¹MDA: malonaldeído. Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão. Médias seguidas de letra diferente diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A peroxidação lipídica mede o índice de estresse oxidativo causado normalmente pelas espécies reativas no organismo, e é considerada um marcador importante do estresse oxidativo e, também, um dos principais fatores envolvidos no dano celular causado por estas espécies (Balu et al. 2005).

Os compostos fenólicos possuem em sua estrutura hidroxilas reativas que apresentam alta estabilidade por ressonância, sendo esta propriedade responsável pelo seu potencial antioxidante e hepatoprotetor. Compostos fenólicos como o ácido gálico, galato de epigallocatequina, epicatequina e quercetina são eficazes na hepatoproteção e aumento da atividade antioxidante em modelos *in vivo* (Sun et al. 2002, Jung et al. 2003, Tung et al. 2009, Tipoe et al. 2010, Ma et al. 2015).

Tung et al. (2009) estudaram o efeito protetor do ácido gálico, fenólico ativo presente no extrato de *Acacia confusa* Merr (*Leguminosae*) contra lesão hepática crônica induzida por CCl₄ (0,75 mL kg⁻¹) em ratos (Sprague Dawley), e os resultados sugerem uma potente proteção contra os danos no fígado pela diminuição nos níveis de AST e ALT e aumento de SOD, inibição da peroxidação lipídica e ativação do citocromo P4502E1. Santos et al. (2014) avaliaram o efeito antioxidante e hepatoprotetor de extratos de folhas de mandioca, obtidos de extração com etanol e acetona, contra a lesão hepática induzida pelo CCl₄ (1,5 mL kg⁻¹) em ratas *Fisher*. Os resultados apontaram a diminuição da atividade das enzimas AST, ALT e GGT e da peroxidação de lipídeos e aumento dos níveis de albumina e proteínas totais, relacionando essa ação hepatoprotetora do extrato com os compostos fenólicos (ácido gálico, galocatequina, catequina e o ácido clorogênico).

De acordo com Tipoe et al. (2010), a administração do galato de epigallocatequina apresentou efeito protetor contra a lesão hepática e a fibrose induzidas por CCl₄ em ratos, enquanto Ma et al. (2015) relataram que a administração de quercetina impediu a lesão hepática causada pelo CCl₄,

diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes em fígados de ratos. Já Chowdhury et al. (2015) avaliaram em ratas (Loong-Evans), o efeito hepatoprotetor da suplementação da dieta com pó de casca de *Citrus maxima* contra danos oxidativos induzidos por CCl₄ (1 mL kg⁻¹) sendo observada redução significativa da peroxidação lipídica e dos níveis de AST e ALT, assim como aumento do nível da enzima catalase. Esses resultados foram relacionados à ação hepatoprotetora com a presença dos compostos fenólicos ácido gálico, vanílico, siríngico e benzóico e rutina, sendo considerados de maior relevância o ácido cafeico e a epicatequina.

O papel protetor sob a elevação da atividade das enzimas ALT, AST e GGT e defesas antioxidantes exercidas pela administração do EMBA deve estar relacionado com a presença dos compostos fenólicos, que foram registrados por Marques et al. (2016) no mesmo EMBA, sendo estes compostos: ácido gálico, catequina, galato de epigallocatequina, epicatequina, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico e quercetina.

O estudo anatopatológico realizado em cortes de fígado não revelou alterações macroscópicas, nem lesões ou alterações microscópicas significativas.

O possível acúmulo de lipídeos no fígado dos animais, induzido pela administração do CCl₄, assim como lesões ou destruição das células hepáticas que resultam na liberação das transaminases para a circulação sanguínea, não foram observados na histologia. Considera-se que o período de tempo em que o experimento foi conduzido (21 dias), assim como a proximidade de tempo entre a última administração do CCl₄ e a eutanásia dos animais, tenham impossibilitado a visualização de alterações histológicas, uma vez que os dados bioquímicos revelaram indução de toxicidade hepática pela administração do CCl₄ (aumento na atividade de ALT, AST e GGT em G2 – controle positivo; Tabela 2), e efeito protetor exercido pelo extrato (redução na concentração da gordura hepática em G4, G5 e G6 – extratos e CCl₄; Tabela 1).

Conclusão

Conclui-se que o extrato metanólico liofilizado do bagaço de acerola apresenta ações antioxidante e hepatoprotetora, nas doses de 0,5 g e 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA, já que a dose de 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA, acarretou aumento da atividade da ALT, redução da SOD e do teor de albumina, em comparação ao controle negativo.

Estudos complementares do potencial medicinal deste resíduo se fazem necessários para a averiguação de outros parâmetros que definam efetividade e segurança, além de outras possíveis aplicações.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelas bolsas concedidas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY). 2012. Official methods of analysis. 19.ed. Gaithersburg, 3000p.
- BALU M, SANGEETHA P, HARIPRIYA D, PANNEERSELVAM C. 2005. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neuroscience Letters* 383:295-300.
- BERNARDES NR, PESSANHA FF, OLIVEIRA DB. 2010. Functional Foods: A Brief Review. *CIÊNCIA E CULTURA - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB* 6:11-19.
- CHANDAN BK, SAXENA AK, SHUKLA S, SHARMA N, GUPTA DK, SINGH K, et al. 2008. Hepatoprotective activity of *Woodfordia fruticosa* Kurz

flowers against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 119:218-224.

CHOWDHURY MRH, SAGOR MAT, TABASSUM N, POTOL MA, HOSSAIN H, ALAM MA. 2015. Supplementation of *Citrus maxima* peel powder prevented oxidative stress, fibrosis, and hepatic damage in carbon tetrachloride (CCl₄) treated rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015:1-10.

EL-TAWIL OS, SHALABY AA, MOHAMED EA. 2013. Potential hepatoprotective effects of licorice root (*Radix glycyrrhizae*) extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Life Science Journal* 10:1862-1871.

FEIJÓO M, TÚNEZ I, RUIZ A, TASSET I, MUNOZ E, COLLANTES E. 2010. Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage. *Reumatología Clínica* 6:91-94.

HITCHON CA, EI-GABALAWY HS. 2004. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 6:265-278.

HUO HS, WANG B, LIANG YK, BAO YY, GU Y. 2011. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *International Journal of Molecular Sciences* 12:6529-6543.

JUNG C, MAEDER V, FUNK F, FREY B, STICHER H, FROSSARD E. 2003. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* 252:301-312.

KATAKI MS, AHMED MZ, AWASTHI D, TOMAR B, MEHRA P, YADAV RS, RAJAR P. 2012. In vitro antioxidant profile of *Wedelia calandulaceae* leaves. *Pharmacologia* 3:75-83.

KURIAKOSE GC, KURUP MG. 2010. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Aphanizomenon flos-aquae* Linn against paracetamol intoxication in rats. *Journal of Experimental Biology* 48:1123-1130.

- LIMA CF, FERNANDES-FERREIRA M, WILSON CP. 2007. Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. Food and Chemical Toxicology 45:456-464
- LIMA AR, PEREIRA RGFA, ABRAHÃO AS, ZANGERONIMO MG, PAULA FBA, DUARTE SMS. 2013. Effect of decaffeination of green and roasted coffees on the *in vivo* antioxidant activity and prevention of liver injury in rats. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 23:506-512.
- LOBO V, PATIL A, PHATAK A, CHANDRA N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews 4:118-126.
- MA JIE-QIONG, LI Z, XIE WAN-RU, LIU CHAN-MIN, LIU SI-SI. 2015. Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF-κB pathway. International Immunopharmacology 28:531-539.
- MARQUES TR, CORRÊA AD, LINO JBR, ABREU CMP, SIMÃO AA. 2013. Chemical components and functional properties of acerola (*Malpighia emarginata* dc.) residue flour. Food Science and Technology 33:526-531.
- MARQUES TR, CAETANO AA, SIMÃO AA, CASTRO FCO, RAMOS VO, CORRÊA AD. 2016. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. Revista Brasileira de Farmacognosia, no prelo, 2016.
- MARTIN I, GROTEWIEL MS. 2006. Oxidative damage and age-related functional declines. Mechanisms of Ageing Development 127:411-423.
- MOTTA VM. 2009. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 5.ed. Rio de Janeiro: MedBook, 400 p.
- MURIEL P, ESCOBAR Y. 2003. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. Journal of Applied Toxicology 23:103-108.

NICOLUZZI JE, BARBU V, BALDRMONT M. 2000. Viabilité et état de différenciation des hépatocytes humains immunoprotégés par macroencapsulation et transplantés chez le rat. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 24:342-348.

PORCHEZHIAN E, ANSARI SH. 2005. Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. *Phytomedicine* 12:62-64.

RAMAKRISHNA S, GEETHA KM, BHASKAR GOPAL PVVS, RANJIT KUMAR P, CHARAN MADAV P, UMACHANDAR L. 2011. Effect of *Mallotus philippensis* Muell.-Arg leaves against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research* 2:74-83.

SANTOS MAI, CORRÊA AD, SIMÃO AA, ALVES AP de C, SOUSA RV, SACZK AA. 2014. Antioxidant and hepatoprotective action of cassava leaf flour extract against injury induced by CCl₄ in rats. *African Journal of Agricultural Research* 9:2190-2195.

SENGER AE, SCHWANKE CHA, GOTTLIEB MG. 2010. Green tea (*Camellia sinensis*) and its functional properties on transmissible chronic diseases. *Scientia Medica* 20:292-300

SCALBERT A, JOHNSON IT, SALTMARSH M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81:215-217.

- SILVA MLC, COSTA RS, SANTANA AS, KOBLITZ MGB. 2010. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semina: Ciências Agrárias*, 31: 669-682.
- SIMÃO AA, RAMOS V de O, CORRÊA AD, SOUSA RV, MARCUSSI S. 2015. Anti-obesity Effects of the administration of *Tournefortia paniculata* Cham extract on Wistar rats subjected to a hypercaloric diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58:494-503.
- SINGHAL KG, GUPTA G. 2012. Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* CCl₄ induced liver injury in rats. *Asian Pacific J Trop Med* 5:677:685.
- SUN J, SIMONYI A, SUN GY. 2002. The “French Paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Journal Free Radical Biology & Medicine* 32:314-318.
- STUMPF C, MEDEIROS NS, FUNCHAL CS, DANI C. 2012. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes tipos de chocolate em tecido hepático de ratos Wistar: estudo *in vitro*. *RESBCAL* 1:236-245.
- TEAM, R DEVELOPMENT CORE. 2011. A language and environment for statistical computing. Viena: R Foundation for Statistical Computing.
- TIPOE GL, LEUNG TM, LIONG EC, LAU TYH, FUNG ML, NANJI A. 2010. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in mice. *Toxicology* 273:45-52.
- TUNG Y-T, WU J-H, HUANG C-C, PENG H-C, CHEN Y-L, YANG S-C, CHANG S-T. 2009. Protective effect of *Acacia confusa* bark extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 47:1385-1392.

WEBER LWD, BOLL M, STAMPFL A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology* 33:105-136.

WINTERBOURN CC, GUTTERIDGE J.M, HALLIWELL B. 1985. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *Journal Free Radical Biology & Medicine* 2:1119-1122.

ZAKIR MM, FREITAS IR. 2015. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. *Journal of Bioenergy and Food Science* 2: 107-116.

ARTIGO 3

Artigo publicado na revista Chilean Journal of Agricultural Research, v.76, p. 55-61, 2016. doi:10.4067/s0718-58392016000100008

***Malpighia emarginata* DC. bagasse acetone extract: phenolic compounds and their effect on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**

Extrato acetônico de bagaço de *Malpighia emarginata* DC.: compostos fenólicos e seu efeito sobre a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Tamara R. Marques^{1*}, Aline A. Caetano¹, Dejjane S. Alves², Vinicius de O. Ramos¹, Anderson A. Simão¹, Geraldo A. Carvalho² and Angelita D. Corrêa¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras-Minas Gerais, Brasil. *Corresponding author (tamara_rezende@hotmail.com; angelita@dqi.ufla.br).

²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras-Minas Gerais, Brasil.

Annually, several tons of residues that are rich in phenolic compounds are produced during the processing of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice. Adding value to these residues is of great interest, since they can be a viable solution in the search for natural substances with insecticidal action and low impact on the environment and humans. Taking into account the economic

losses from the attacks by the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in different crops, the objective of this study was to evaluate the effect of the extract of acerola bagasse flour (ABF) against this insect and determine the phenolic compounds in this extract. Bagasse of acerola (BRS238 or Frutacor clon) generated after juice production, was frozen and lyophilized. To obtain the extract, 6 g ABF was mixed with 60 mL acetone:water solution (7:3 v/v), and the extract was lyophilized. *Spodoptera frugiperda* caterpillars, 48 h-old, obtained by the maintenance breeding, were transferred to glass tubes supplied with an artificial diet containing the ABF extract at 0, 250, 500, 1000, and 2000 mg L⁻¹ diet. The following variables were evaluated: duration and survival of larval and pupal stages, pupal weight, sex ratio, adult longevity, oviposition period, number of egg masses, and total number of eggs. The ABF extract contained several phenolic compounds including gallic acid, epigallocatechin gallate, catechin, *p*-coumaric acid, salicylic acid, and quercetin. The extract was toxic to *S. frugiperda*, prolonging the pre-pupal stage and increasing the mortality of caterpillars.

Key words: Fall armyworm, *Malpighia emarginata*, natural product, pest control, toxicity.

INTRODUCTION

The search for natural products containing active ingredients against insect pests has intensified in recent years. The discovery of new substances as an alternative to synthetic insecticides is of great relevance, because the application of synthetic insecticides, besides causing adverse environmental effects, can result in the select for resistant insect populations, residue accumulation in food, and mortality of natural enemies (Busato et al., 2006; Souza et al., 2014; Zhu et al., 2015).

Among the numerous insect pests of economically important crops, fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is significant. It is a polyphagous and cosmopolitan insect, widely distributed in North and South America, that causes damage to several crops, including cotton, corn, sorghum, and other grasses (Múrua et al., 2009; Casmuz et al., 2010). In corn plantations, this pest causes defoliation of plants and attacks the corncobs, thus reducing production (Busato et al., 2005) depending on cultivar, phenological stage, production system, and planting site (Sarmiento et al., 2002). Therefore, the search for new products with insecticidal action against this pest is of great importance.

The potential of the products of plant metabolism to control insect pests has been evaluated (Tirelli et al., 2010; Alves et al., 2011; Santos et al., 2013; Alves et al., 2014). Secondary metabolites are involved in plant defense against herbivores and as such have the potential to be used in the control of insect infestations. Thus, phenolic compounds, which include tannins and flavonoids, are known to reduce growth and survival in insects (Schaller, 2008). These compounds, mainly tannins, reduce the palatability of plant tissues to insects because of their astringent taste, causing feeding inhibition, weight reduction, infertility, and biological and nutritional changes in insects (Schoonhoven et al., 2005). Furthermore, War et al. (2012) proposed a theory that these substances form complexes with digestive enzymes present in the intestines of herbivores, reducing the efficiency of protein digestion and ultimately slowing the growth.

In this context, the use of agro-industrial fruit residues is quite promising for the extraction of active ingredients that can be used in insect control. When the residues are discarded, secondary metabolites of great value for potential application as insecticides and/or agrochemicals are also eliminated. Acerola bagasse is one such example. It is produced after the fruit processing for juice

production; according to Marques et al. (2013) acerola bagasse is rich in phenolic compounds, with recorded content of 10.82 g 100 g⁻¹ DM.

Hence, the objective of the present study was to evaluate the effect of acetone extract of acerola bagasse flour against *S. frugiperda* and characterize the phenolic compounds and assess the prospect of acerola bagasse as an alternative natural insecticide, thus adding value to the fruit.

MATERIAL AND METHODS

Acquisition and preparation of acerola bagasse flour

Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) (BRS 238 or Frutacor clon) bagasse was obtained from plants grown in the municipality of Perdões (21°05'27" S, 45°05'27" W; 848 m a.s.l.), Minas Gerais, Brazil; the local climate according to the Köppen system is classified as Cwa: mild and rainy summers with moderate temperatures, annual average temperature below 21 °C, average annual precipitation of 1529.7 mm, and 76% RH (Emater, 2002). Acerola fruits were used for pulp extraction, and the residual bagasse was provided in three batches by a fruit pulp plant firm located on Perdões.

Acerola bagasse (4 kg) was frozen at -18 °C and lyophilized in glass containers protected from light for 7 d to obtain 450 g dry bagasse. After lyophilization, acerola bagasse was homogenized using mortar and pestle and then placed in a hermetically sealed flask, protected from light in a refrigerator at 4 °C.

Preparation of the extracts

To obtain the extract, 6 g acerola bagasse flour (ABF) was mixed with 60 mL acetone:water solution (7:3 v/v) (Agostini-Costa et al., 2003) in a round-bottom flask, in three replicates. This mixture was kept at room temperature for 2 h and

then vortexed three times for 3 min. The solution was then centrifuged for 10 min, at 5000 g and filtered through glass wool. The residue was dissolved with 60 mL acetone:water solution (7:3 v/v) and the mixture was kept at room temperature for 2 h and finally vortexed three times for 3 min. The residue was discarded and the supernatants from the three extractions were combined and concentrated in a rotary evaporator (801, Fisatom, São Paulo, Brazil) until the complete evaporation of acetone. The material was then frozen, lyophilized, and weighed. Samples for chromatography were prepared by solubilizing 1 g lyophilized extract in 16 mL ultrapure water obtained from a Milli-Q system (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts, USA).

Identification and quantification of phenolic compounds

The high performance liquid chromatography (HPLC) was performed using a Shimadzu UHPLC chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with two LC-20AT high-pressure pumps, an SPD-M20A UV-vis detector, a CTO-20AC oven, a CBM-20A interface, and an automatic injector with an SIL-20A auto sampler. Separations were performed using a Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm × 4.6 mm) column, connected to a Shim-pack Column Holder (10 mm × 4.6 mm) pre-column (Shimadzu).

The mobile phase consisted of the following solutions: 2% acetic acid in water (A) and methanol:water:acetic acid (70:28:2 v/v/v) (B). Analyses were performed for a total time of 65 min at 40 °C, flux of 1 mL min⁻¹, 280 nm wavelength, and injection volume of 20 µL in a gradient-type system (100% solvent A from 0.01 to 5 min; 70% solvent A from 5 to 25 min; 60% solvent A from 25 to 43 min; 55% solvent A from 43 to 50 min; and 0% solvent A for 10 min) until the end of the run. Solvent A was increased to 100%, seeking to maintain a balanced column.

The phenolic standards used were gallic acid, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid, resveratrol, quercetin, malvidin chloride, pelargonidin chloride, and cyanidin chloride, all obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). The stock standard solutions were prepared in methanol (HPLC grade; Sigma-Aldrich) in the following concentration ranges: gallic acid (0.0753-7.5252 mg L⁻¹), catechin (0.1161-11.6120 mg L⁻¹), epigallocatechin gallate (0.1837-18.3360 mg L⁻¹), epicatechin (0.1161-11.6108 mg L⁻¹), syringic acid (0.0793-7.9268 mg L⁻¹), *p*-coumaric acid (0.0657-6.5664 mg L⁻¹), ferulic acid (0.0777-7.7672 mg L⁻¹), salicylic acid (0.0552-5.5248 mg L⁻¹), resveratrol (0.0913-9.1296 mg L⁻¹), quercetin (0.0004-0.0400 mg L⁻¹), malvidin chloride (0.1467-14.6700 mg L⁻¹), pelargonidin chloride (0.1227-12.2680 mg L⁻¹), and cyanidin chloride (0.1291-12.908 mg L⁻¹). Acetic acid and methanol (HPLC grade; Sigma-Aldrich) were used in the preparation of the mobile phase.

The ABF extract and the standards were filtered through a 0.45- μ m nylon membrane (EMD Millipore) and directly injected into the chromatographic system, in three replicates. The phenolic compounds in the extract were identified by comparison with retention times of standards. Quantification was performed by the construction of analytical curves obtained by linear regression using Origin 6.1 computer software (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) and considering the coefficient of determination (R^2) equal to 0.99.

Bioassay with *S. frugiperda* caterpillars

The bioassay was conducted in an acclimatized room at 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ RH, and a 12-h photophase, using insects reared by laboratory breeding and fed an artificial diet (Parra, 2007).

For the bioassay, the lyophilized extract was solubilized in 30 mL distilled water and incorporated into 300 mL artificial diet at 250, 500, 1000, and 2000

mg L⁻¹ diet. Once solidified, pieces from the diet were distributed in glass tubes (8 cm high × 2 cm wide).

The experimental design was completely randomized, with 60 replicates per treatment and the control treatment, which consisted of the artificial diet combined with only water (30 mL). A 48-h-old *S. frugiperda* caterpillar, previously fed an artificial diet free of extract, was transferred into the experimental unit consisting of a glass tube (8 cm high × 2 cm wide) with a piece of diet (3 cm wide × 3 cm high) incorporated with the extract or the control.

Insect mortality was evaluated daily during the larval stage until the pupal stage. The following characteristics were also evaluated: duration of larval stage (days), duration of pre-pupal stage (days), pupal weight (g), duration of pupal stage (days), pupal survival (%) [pupal survival (%) = (number of insects that emerged/total number of pupae)*100], and sex ratio of adults [sex ratio = (number of males)/(number of females + males)]. The first 12 couples that emerged from each treatment were separately placed in PVC cages (10 cm high × 10 cm wide) and fed with 10% aqueous solution of honey. Adult longevity (days), oviposition period (days), number of egg masses total, and total number of eggs laid were evaluated daily.

Statistical analysis

Data on larval accumulated mortality and pre-pupal periods were subjected to one-way ANOVA and regression analysis was performed ($p < 0.05$) as a function of extract concentration using R software (R Development Core Team, 2014).

Data on larval mortality over time were analyzed with the survival package in the Weibull model (Therneau, 2013). After the selection of the most appropriate mathematical model by residue analysis, a contrast analysis was

performed to verify the similarity between the treatments and the formation of congener groups. Lethal concentration (LC₂₀ and LC₃₀) and median lethal times (LT₅₀, time required to kill 50% of the insects) were estimated for each group formed by the Probit analysis (Ritz and Strebig, 2015).

Data on larval and pupal periods, pupal weight, pupal survival, adult longevity, oviposition period, the number of ovipositions, and number of eggs were subjected to one-way ANOVA using R (R Development Core Team, 2014).

The results of sex ratio were subjected to the chi-square statistical test (χ^2) at a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Each 100 g ABF yielded 30 g lyophilized extract (30% yield). The phenolic compounds identified in the ABF extract are presented in the Figure 1, whose areas of the peaks resulted in the following levels (mg 100 g⁻¹ extract): gallic acid (14.85 ± 1.03), catechin (14.26 ± 0.95), epigallocatechin gallate (8.98 ± 0.95), *p*-coumaric acid (6.20 ± 0.34), salicylic acid (27.01 ± 0.38), and quercetin (0.80 ± 0.01). Anthocyanin compounds malvidin chloride, pelargonidin chloride, cyanidin chloride, epicatechin, syringic acid, ferulic acid, and resveratrol were not identified in the ABF extract. We observed several other peaks for which the substances were not identified.

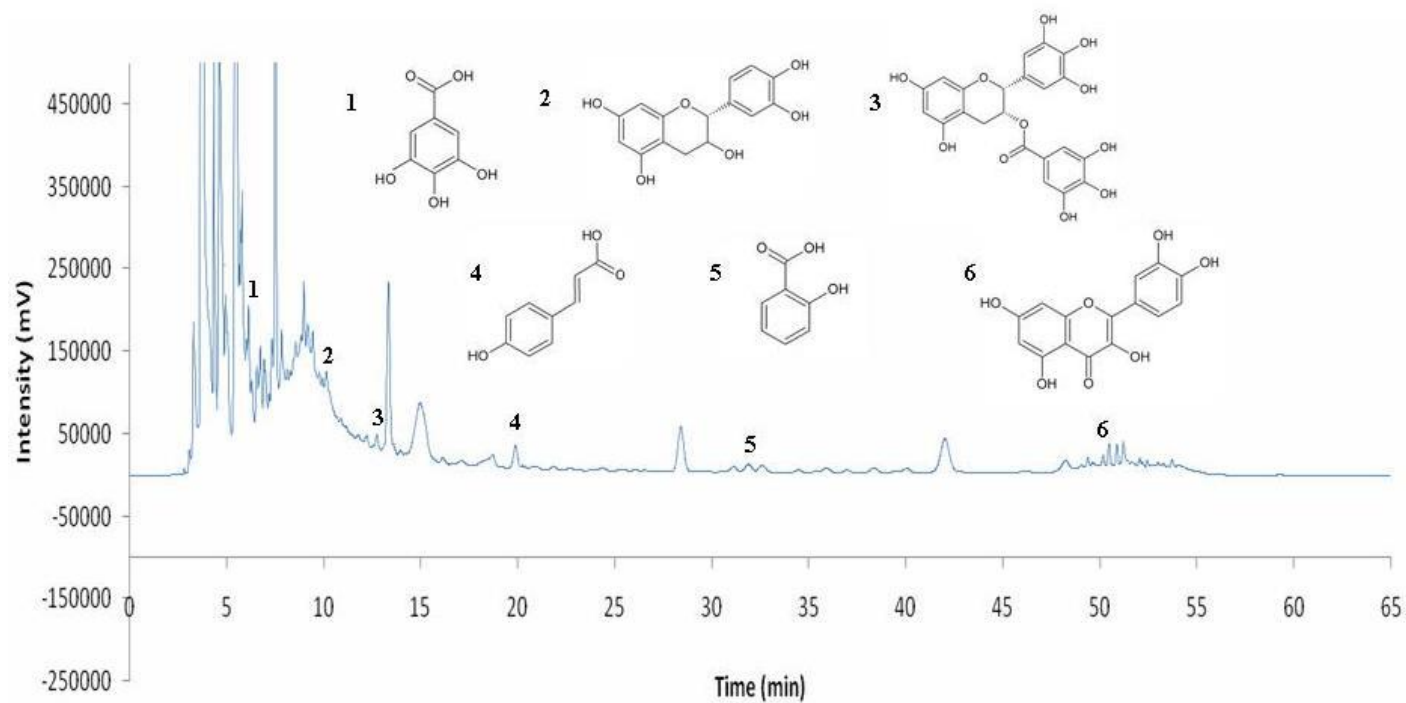


Figure 1. Chromatogram of acerola bagasse flour extract with peaks identification. 1: Gallic acid (time = 6.126 min); 2: catechin (time = 10.152 min); 3: epigallocatechin gallate (time = 12.211 min); 4: *p*-coumaric acid (19.901 min); 5: salicylic acid (time = 32.547 min); and 6: quercetin (time = 51.187 min).

Characterization of phenolic compounds in ABF has not been reported; however, a few studies report the identification of these compounds in agro-industrial residues of other fruits. Lafka et al. (2007) identified phenolic compounds such as gallic acid, catechin, epicatechin, caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, and *p*-coumaric and *o*-coumaric acids in grape (*Vitis vinifera* L.) residues (skins and seeds) from the winemaking process. In contrast, Melo et al. (2011) studied grape and guava bagasse and found gallic acid, epicatechin, quercetin, isovanillic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, and resveratrol. Alves et al. (2014) reported gallic acid, gallocatechin, catechin, epicatechin, ellagic acid, and salicylic acid in jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) skin flour. These results show that agro-industrial residues from fruits are rich in bioactive substances, and they can be used by the agrochemical and pharmaceutical industries.

The content of each phenolic compound identified in the ABF extracts added to the artificial diet offered to *S. frugiperda* larvae is shown in Table 1.

Table 1. Contents of phenolic compounds in acerola bagasse flour (ABF) extract supplemented to the artificial diet of *Spodoptera frugiperda* at different concentrations.

Phenolic compound	ABF extract concentration (mg L ⁻¹ diet)			
	250	500	1000	2000
Gallic acid	0.037	0.074	0.148	0.296
Catechin	0.036	0.072	0.144	0.288
Epigallocatechin gallate	0.022	0.044	0.088	0.176
<i>p</i> -Cumaric acid	0.016	0.032	0.064	0.128
Salicylic acid	0.068	0.136	0.272	0.544
Quercetin	0.002	0.004	0.008	0.016

The salicylic acid and gallic were the majority, followed by catechin, epigallocatechin gallate, *p*-coumaric acid and quercetin among the identified phenolic substances. These data show the concentration of each phenolic compound in the diet that hindered the development of *S. frugiperda*.

Gallic acid in ester form is considered to be hydrolyzable tannin, while oligomers and polymers of catechin and epigallocatechin gallate, formed by polycondensation of two or more flavonoid units, are considered condensed tannins. These compounds are important biological components due to their strong interactions with metal ions and macromolecules such as polysaccharides. Additionally, they are able to form soluble complexes with alkaloids, gelatins, and several other proteins and to inhibit digestive enzymes (Simões et al., 2007), making this class of substances quite toxic to insects.

Flavonoids such as quercetin participate in important processes, including development and plant defense, inhibition of the regulation of digestive enzymes, strengthening of plant cell walls, and decrease in the palatability to herbivores (Schoonhoven et al., 2005; Chen, 2008; Filgueiras et al., 2011). Vandock et al. (2012) reported that flavonoids affect enzymes, preventing enzymatic reactions that are vital to the development, and are considered anti-nutritional and highly toxic to insects.

Salicylic and *p*-coumaric acids belong to the class of phenolic acids, which also includes derivatives from hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids. The relationship of these compounds and their role in the protection against herbivory is not known. Acids derived from benzoic acid may undergo substitutions in the meta position, yielding, for example, gallic acid (Mamede and Pastore, 2004), which can be found as hydrolyzable tannins, which are reported to reduce growth and survival of insects.

It was observed that the diet containing the extract at a concentration of 2000 mg L⁻¹ caused an increase in accumulated mortality of *S. frugiperda*, while

those fed on diets containing the extract at lower concentrations were less affected ($F = 0.05$; $P = 0.02589$) (Figure 2A). Regarding the pre-pupal stage, only the treatment containing 1000 mg L^{-1} of extract caused a lengthening of pre-pupal stage compared to the control ($F = 0$; $P = 1.125 \times 10^{-6}$) (Figure 2B).

The concentrations of ABF extract reduced the insect survival during the larval stage. The lethal time (LT_{50}) was determined only at the end of the evaluation period since this time was greater than 336 h (Figure 3). It was not possible to estimate the LC_{50} and LC_{90} because the confidence interval of these values exceeded the ABF extract concentrations employed in this work. Thus, the LC_{20} and LC_{30} of the ABF extract on the larvae of *S. frugiperda* were 648.18 (95% CI = 229.57 – 996.78) and 1,614.35 (95% CI = 477.35 – 2,751.3) mg L^{-1} , respectively ($\chi^2 = 242.2$, $P = 0.4122$, $df = 238$), respectively.

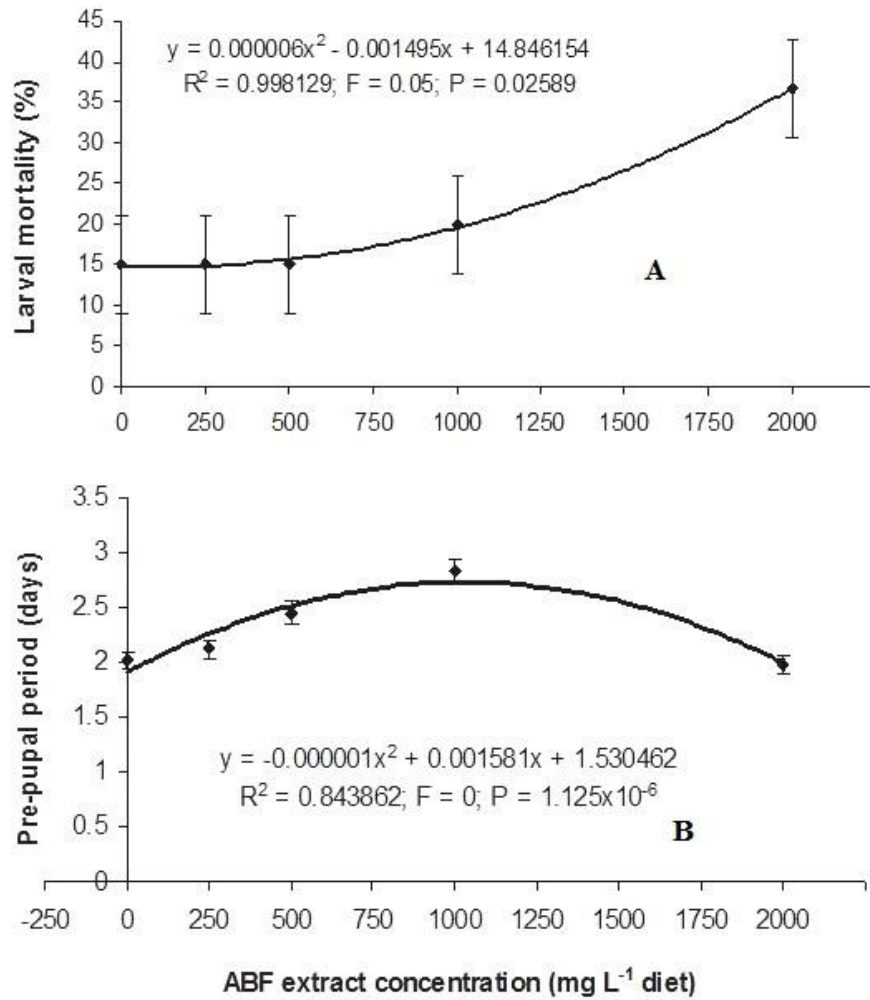


Figure 2. Regression analysis of larval accumulated mortality (A) and duration of the pre-pupal period (B) of *Spodoptera frugiperda* larvae fed on artificial diet containing different concentrations of acerola bagasse flour (ABF) extract.

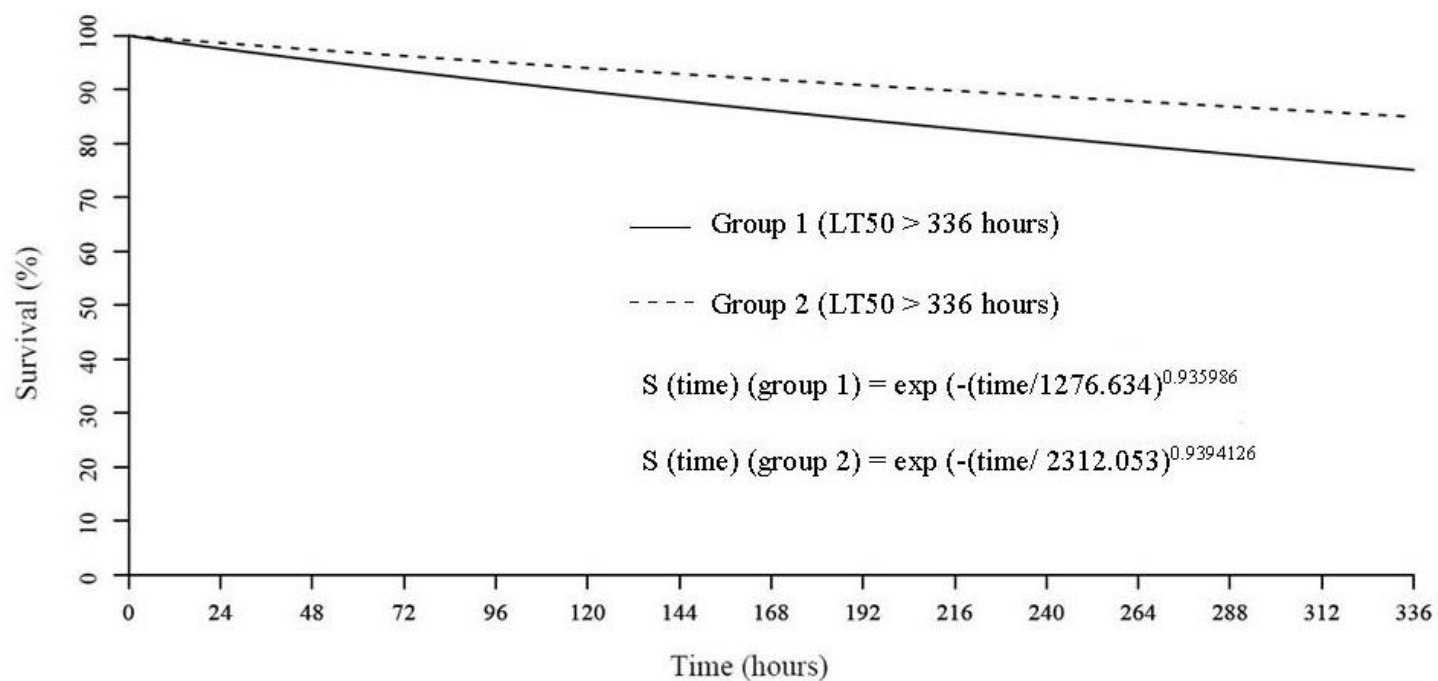


Figure 3. Survival curves of *Spodoptera frugiperda* caterpillars, over time, fed on artificial diet containing acerola bagasse flour (ABF) extract. Group 1: 1000 mg ABF extract L⁻¹ diet (n = 60) and 2000 mg ABF extract L⁻¹ diet (n = 60). Group 2: control (30 mL water) (n = 60); 250 mg ABF extract L⁻¹ diet (n = 60); 500 mg ABF extract L⁻¹ diet (n = 60). The curve is represented with the formula $S(\text{time}) = \exp(-(\text{time}/\delta)\alpha)$ where δ is shape parameter and α is scale parameter.

The larval mortality of *S. frugiperda* reported in this study may be due to the phenolic compounds (tannins and flavonoids) characterized in ABF, which interfered with the feeding behavior and larval development of this insect. This hypothesis is supported by the fact that the phenolic compounds identified in ABF, such as gallic acid and catechin, affect growth and survival of herbivorous insects. Barbehenn and Constabel (2011) reported that, contrary to early theories, tannins have no direct effect on protein digestion in insect herbivores. Instead, they concluded that their toxicity is derived from reactive oxygen species such as semiquinone radicals and quinones, which are formed by oxidation of tannins in insects' high intestinal pH. Flavonoid quercetin, also identified in ABF, is known to decrease the palatability of plant tissues to herbivores and to inhibit enzymatic reactions that are vital for insect development (Filgueiras et al., 2011; Vandock et al., 2012).

Antifeedant and toxic effects of gallic acid and catechin have already been observed in species of the genus *Spodoptera* (Urrea-Bulla et al., 2004; Rani and Pratyusha, 2013). Mesbah et al. (2007) reported the toxic effect of quercetin on *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae), and they attributed this toxicity to insect feeding inhibition, which prevented normal growth and development, causing pupal deformation as well as a reduction in oviposition.

Increased mortality at the larval stage was also reported by Rodríguez and Vendramim (1996), who observed that the pupal stage of *S. frugiperda*, compared to the larval stage, was less affected by extracts from various plants when they were incorporated into the artificial diet. Torrecillas and Vendramim (2001) found that changes in the development of *S. frugiperda* occurred only in the larval stage, probably due to higher metabolic activity during this phase.

According to Tirelli et al. (2010) and Jadhav et al. (2012), inhibition of larval growth and duration of the pre-pupal and pupal stages have already been related to the activity of phenolic compounds, especially tannins and flavonoids,

which reduce the nutritional value but create the antifeedant effect in food. Alves et al. (2014) studied the effects of acetone extract from jabuticaba skin flour on the development of *S. frugiperda* and found that the reduction in their growth was proportional to the concentration and quantity of ingested phenolic compounds.

Tannin activity is not always related to its concentration. Heil et al. (2002) found that in some plant species, the increase in tannin concentration did not lower herbivory. However, a positive correlation between tannin content and reduction in herbivory rate was observed for *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (Fabaceae), *Acacia farnesiana* (L.) Willd. (Fabaceae), and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae). Therefore, the authors concluded that the antifeedant effect of tannins cannot always be correlated with the increase in their concentration. These results are consistent with those obtained in the present study, in which it was found that the treatment with 1000 mg L⁻¹, although with lower tannin content than the treatment with 2000 mg L⁻¹, had prolonged the most the pre-pupal characteristics of *S. frugiperda* (Figure 2B).

The ABF extract at the evaluated concentrations did not negatively affect the larval period, pupal weight, pupal period, pupal survival, oviposition period, total number of egg masses, number of eggs, male and female longevity (Table 2), and sex ratio (Table 3).

Table 2. Effect of acetone extract from acerola bagasse flour (ABF) at different concentrations on larval period, pupal weight, pupal period, pupal survival, oviposition period, number of egg masses, number of eggs, and male and female longevity of *Spodoptera frugiperda*.

	ABF extract concentration (mg L ⁻¹ diet)					P	F
	0	250	500	1000	2000		
Larval period, d*	14.00 ± 4.31	13.60 ± 4.24	13.10 ± 3.20	12.80 ± 4.01	12.75 ± 3.93	0.3257	1.1664
Pupal weight, g*	0.219 ± 0.02	0.215 ± 0.03	0.223 ± 0.03	0.218 ± 0.02	0.222 ± 0.02	0.5564	0.7537
Pupal period, d*	7.02 ± 4.03	5.98 ± 4.22	7.70 ± 3.76	6.83 ± 3.88	6.20 ± 4.48	0.1602	1.6561
Pupal survival, %*	75.41 ± 0.43	75.41 ± 0.43	80.00 ± 0.40	65.00 ± 0.48	63.33 ± 0.49	0.0574	2.3154
Oviposition period, d*	9.93 ± 3.91	11.00 ± 3.24	11.13 ± 2.64	10.70 ± 4.45	10.42 ± 4.90	0.9296	0.2139
Number of egg masses*	9.64 ± 3.73	10.33 ± 2.83	10.40 ± 2.23	10.60 ± 4.65	9.58 ± 4.17	0.9344	0.2053
Number of eggs*	2752.93 ± 1197.45	2533.78 ± 733.38	3158.06 ± 1672.09	2215.10 ± 880.76	2504.27 ± 1094.99	0.3891	1.0518
Male longevity, d*	13.64 ± 1.91	14.00 ± 2.06	11.66 ± 2.74	13.55 ± 1.44	12.67 ± 3.01	2.0805	0.0955
Female longevity, d*	14.93 ± 4.62	14.56 ± 4.42	16.27 ± 4.62	15.64 ± 3.96	15.17 ± 5.10	0.9164	0.2368

Data are mean (n = 60) ± standard deviation. *No significant difference in means by the one-way ANOVA at 5% probability.

Table 3. Sex ratio in *Spodoptera frugiperda* developed from caterpillars fed artificial diet supplemented with different concentrations of acerola bagasse flour (ABF) extract.

ABF extract concentration		
(mg L ⁻¹ diet)	n	Sex ratio***
0	43	0.44
250	36	0.47
500	49	0.41
1000	40	0.58
2000	38	0.39
<i>P</i> *		0.496
χ^2 **		3.38

P* value of the chi-square test. **Chi-square value. *No significant difference in means by the one-way ANOVA at 5% probability.

When added to the artificial diet, the phenolic compounds present in ABF caused an increase in larval mortality and lengthening of the pre-pupal stage; however, they did not have a negative effect on other biological characteristics evaluated for *S. frugiperda*. It is possible that the results will be more pronounced if the phenolic substances contained in the ABF extract are used in other concentration ranges.

Given that there are no available research data on the use of ABF in pest control, the results obtained in this study complement those of Santos et al. (2013) and Alves et al. (2014), who used natural products such as cassava leaf powder and jabuticaba skin flour, respectively, to control *S. frugiperda* caterpillars.

CONCLUSIONS

Acerola bagasse flour acetone extract, in which the phenolic compounds such as gallic acid, catechin, epigallocatechin gallate, *p*-coumaric acid, salicylic acid, and quercetin were identified, decreased the survival of *S. frugiperda* under laboratory conditions. Future studies should examine their potential use in field conditions and investigate the effect of isolated phenolic compounds identified in the ABF extract.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the grants provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LITERATURE CITED

- Agostini-Costa, T.S., A. Lima, e M.V. Lima. 2003. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. *Química Nova* 26:763-765.
- Alves, A.P.C., A.D. Corrêa, D.S. Alves, A.A. Saczk, J.B.R. Lino, and G.A. Carvalho. 2014. Toxicity of the phenolic extract from jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) fruit skins on *Spodoptera frugiperda*. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74:200-204.
- Alves, D.S., D.F. Oliveira, G.A. Carvalho, H.M. Jr. Santos, D.A. Carvalho, M.A.I. Santos, et al. 2011. Plant extracts as an alternative to control *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology* 40:123-128.

- Barbehenn, R., and P. Constabel. 2011. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72:1551-1565.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, F.P. Giolo, M.J. Zotti, and G.J. Stefanello Junior. 2005. Compared biology of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in corn and rice leaves. *Neotropical Entomology* 34:743-750.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, M.J. Zotti, S.D. Nörnberg, T.R. Magalhães, et al. 2006. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. *Ciência Rural* 36:15-20.
- Casmuz, A., M.L. Juárez, M.G. Socías, M.G. Murúa, S. Prieto, S. Medina, et al. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69:209-231.
- Chen, M.S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15:101-114.
- Emater. 2002. Área de proteção ambiental do Município de Perdões. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater), Unidade de Consultoria e Projetos, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
- Filgueiras, C.C., P.R.S. Farias, M. das G. Cardoso, J.D. Vendramim, E.M.L.S. Ramos, and F.R. de O. Cantão. 2011. Bioactivity of aqueous extracts of *Clibadium Sylvestre* (Aubl.) Baill. and *Derris amazonica* Killip on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae). *Ciência e Agrotecnologia* 35:1059-1066.
- Heil, M., B. Baumann, C.K. Andary, E. Linsenmair, and D. McKey. 2002. Extraction and quantification of “condensed tannins” as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften* 89:519-524.

- Jadhav, D.R., N. Mallikarjuna, A. Rathore, and D. Pokle. 2012. Effect of some flavonoids on survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). *Asian Journal Agricultural Science* 4:298-307.
- Lafka, T.I., V. Sinanoglou, and E.S. Lazos. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry* 104:1206-1214.
- Mamede, M.E.O., e G.M. Pastore. 2004. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. *Boletim Centro de Processamento de Alimentos* 22:233-252.
- Marques, T.R., A.D. Corrêa, J.B.R. Lino, C.M.P. de Abreu, and A.A. Simão. 2013. Chemical components and functional properties of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) residue flour. *Food Science and Technology* 33:526-531.
- Melo, P.S., K.B. Bergamaschi, A.P. Tiveron, A.P. Massarioli, T.L.C. Oldoni, M.C. Zanús, et al. 2011. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural* 41:1088-1093.
- Mesbah, H.A., A.S. Saad, A.K. Mourad, F.A. Taman, and I.B. Mohamed. 2007. Biological performance of quercetin on the cotton leaf-worm larvae, *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) and prevailing natural enemies in the Egyptian cotton fields. *Communications in Agricultural Applied Biological Science* 72:611-622.
- Múrua, M.G., J. Molina-Ochoa, and P. Fidalgo. 2009. Natural distribution of parasitoids of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Argentina. ***Journal Insect Science* 9:1-17.**
- Parra, J.R.P. 2007. Técnicas de criação dos insetos para programas de controle biológico. P. 134. ESALQ/FEALQ, Piracicaba, Brasil.
- R Development Core Team. 2014. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Rani, P.U., and S. Pratyusha. 2013. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. anti-oxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura* F. feeding. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 16:131-136.
- Ritz, C., and J. Strebig. 2015. Package 'drc': Analysis of dose-response curves. Version 2.5-12. <http://dssm.unipa.it/CRAN/web/packages/drc/index.html> (accessed 10 January 2015).
- Rodríguez, H.C., e J.D. Vendramim. 1996. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Manejo Integrado de Plagas* 42:14-22
- Santos, M.A.I., A.D. Corrêa, A.P.C. Alves, A.A. Simão, D.S. Alves, R.L. Oliveira, et al. 2013. Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas cortadeiras. *Semina: Ciências Agrárias* 34:3501-3512.
- Sarmiento, R.A., R.W.S. Aguiar, R.A.S.S. Aguiar, S.M.J. Vieira, H.G. Oliveira, and A.M. Holtz. 2002. Biology review, occurrence and control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) in corn in Brazil. *Bioscience Journal* 18:41-48.
- Schaller, A. (ed.) 2008. *Induced plant resistance to herbivory*. p. 462. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Schoonhoven, L.M., J.J.A. Van Loon, and M. Dicke (eds.) 2005. *Plants as insect food: not the ideal*. p. 83-120. *Insect plant biology*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Simões, C.M.O., E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, and P.R. Petrovick. 2007. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 1102 p. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Souza, J.R., G.A. Carvalho, A.P. Moura, M.H.G. Couto, and J.B. Maia. 2014. Toxicity of some insecticides used in maize crop on *Trichogramma*

- pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) immature stages. Chilean Journal of Agricultural Research 79:234-239.
- Therneau, T.M.A. 2013. Package for survival: Survival analysis. Version 2.37-7. <http://CRAN.R-project.org/package=survival> (accessed 10 January 2013).
- Tirelli, A.A., D.S. Alves, G.A. Carvalho, R.R. Sâmia, S.S. Brum, e M.C. Guerreiro. 2010. Efeito de frações tânicas sobre parâmetros biológicos e nutricionais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Ciência e Agrotecnologia 34:1417-1424.
- Torrecillas, S.M., e J.D. Vendramim. 2001. Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. Scientia Agricola 58:27-31.
- Urrea-Bulla, A., M.M. Suárez, and B. Moreno-Murillo. 2004. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. Fitoterapia 75:392-394.
- Vandock, K.P., M.J. Mitchell, and C.F. Fioravanti. 2012. Effects of plant flavonoids on *Manduca sexta* (tobacco hornworm) fifth larval instar midgut and fat body mitochondrial transhydrogenase. Archive of Insect Biochemistry and Physiology 80:15-25.
- War, A.R.W., M.G. Paulray, T. Ahmad, A.A. Buhroo, B. Hussain, S. Ignacimuthu, et al. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signaling & Behavior 7:1306-1320.
- Zhu, Y.C., C.A. Blanco, M. Portilla, J.A. Adamczyk, R. Luttrell, and F. Huang. 2015. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Pesticide Biochemistry and Physiology 122:15-21.

APÊNDICE A – ARTIGO 1 e 3

Figura 1A Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica. Concentração de cada padrão.....	119
Tabela 1A Gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos.....	120
Tabela 2A Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos.....	120
Tabela 3A Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas*.....	121
Tabela 4A Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos em mg L^{-1}	122

APÊNDICE B – ARTIGO 2

Tabela 1B Resumo da análise de variância do peso do fígado, da gordura hepática e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de ratos <i>Wistar</i> submetidos aos tratamentos*, durante 21 dias.....	123
Tabela 2B Resumo da análise de variância de parâmetros bioquímicos de ratos <i>Wistar</i> submetidos aos tratamentos*, durante 21 dias.....	124

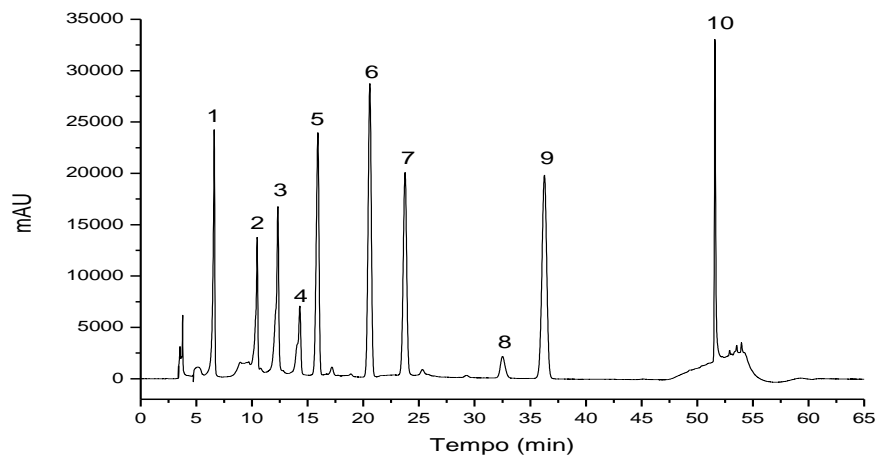


Figura 1A Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica. Concentração de cada padrão: 1) Ácido gálico; 2) Catequina; 3) Galato de epigallocatequina; 4) Epicatequina; 5) Ácido siríngico; 6) Ácido *p*-cumárico; 7) Ácido ferúlico; 8) Ácido salicílico; 9) Resveratrol; 10) Quercetina.

Tabela 1A Gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	Fase móvel*	
	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)
0,01	100	0
5	70	30
25	60	40
43	55	45
50	0	100
65	0	100

Fase móvel: Solvente A – solução de ácido acético 2% em água; Solvente B – metanol: água: ácido acético (70: 28: 2% v/v)

Tabela 2A Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos

Composto	Tempo de retenção (t_R) minutos*
Ácido gálico	6,58 ± 0,01
Catequina	10,37 ± 0,06
Galato de epigallocatequina	12,11 ± 0,02
Epicatequina	13,96 ± 0,03
Ácido sirínico	15,66 ± 0,20
Ácido <i>p</i> -cumárico	20,18 ± 0,03
Ácido ferúlico	26,16 ± 0,01
Ácido salicílico	32,11 ± 0,02
Resveratrol	35,37 ± 0,03
Quercetina	51,39 ± 0,01

*Média de três repetições ± desvio padrão.

Tabela 3A Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas*.

Composto	a	b	R^2
Ácido gálico	-2555,5523	32956,77159	0,9995
Catequina	-2844,07672	13117,20972	0,9929
Galato de epigallocatequina	-5646,6605	13319,04931	0,9932
Epicatequina	-3482,14097	10519,19966	0,9934
Ácido siríntrico	-246,53924	49788,02845	0,9997
Ácido <i>p</i> -cumárico	617,58655	82859,96026	0,9997
Ácido ferúlico	-1264,04995	52493,96131	0,9998
Ácido salicílico	-1045,64447	8830,09805	0,9985
Resveratrol	-4284,57642	61793,53306	0,9985
Quercetina	-657,4062	6,11298 x 10 ⁶	0,9982

*Regressão linear: $y = a + bx$

Tabela 4A Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos em mg L⁻¹

Composto	LD	LQ
Ácido gálico	0,127455	0,386228
Catequina	0,715183	2,167222
Galato de epigalocatequina	1,110149	3,364087
Epicatequina	0,691351	2,095003
Ácido sirínico	0,156859	0,475330
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,128980	0,390849
Ácido ferúlico	0,133291	0,403913
Ácido salicílico	0,231250	0,700757
Resveratrol	0,373745	1,141651
Quercetina	0,001810	0,005784

Tabela 1B Resumo da análise de variância do peso do fígado, da gordura hepática e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de ratos *Wistar*, submetidos aos tratamentos*, durante 21 dias

	GL	Quadrado médio		
		Peso do fígado	Gordura hepática	TBARS
Tratamento	5	12,14**	80,61**	0,0003**
Resíduo	30	15,19	67,89	0,0002
Total	35			
CV%		9,35	15,73	18,51

**Significativo a 1% de probabilidade. ^{ns}Não significativo *Tratamentos: G1- Água; G2- Água e CCl₄; G3- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal (PA); G4- EMBA contendo 0,5 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄; G5- EMBA contendo 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄ e G6- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄.

Tabela 2B Resumo da análise de variância de parâmetros bioquímicos de ratos *Wistar*, submetidos aos tratamentos*, durante 21 dias

	GL	Quadrado médio					
		AST	ALT	GGT	Albumina	SOD	CAT
Tratamento	5	3587,60**	5702,70**	28,93**	9,16**	235,77**	3,11**
Resíduo	30	963,40	130,70	0,81	4,98	73,89	2,55
Total	35						
CV%		9,55	4,07	8,64	9,39	5,04	21,07

**Significativo a 1% de probabilidade. ⁿ Não significativo *Tratamentos: G1- Água; G2- Água e CCl₄; G3- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg peso de animal (PA); G4- EMBA contendo 0,5 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄; G5- EMBA contendo 1,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄ e G6- EMBA contendo 5,0 g de compostos fenólicos/70 kg PA e CCl₄.