

**UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DE  
CÂNCER DE FRUTOS DE *Inga edulis* Martius**

**ARIELE ABREU VENTURINI POLESE**

**VILA VELHA**

**MAIO/2019**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DE  
CÂNCER DE FRUTOS DE *Inga edulis* Martius**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

**ARIELE ABREU VENTURINI POLESE**

**VILA VELHA**  
**MAIO/2019**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P763c

Polese, Ariele Abreu Venturini.

Composição química e atividade quimiopreventiva de câncer de frutos de *Inga edulis Martius* / Ariele Abreu Venturini Polese. – 2019.

54 f. : il.

Orientadora: Denise Coutinho Endringer.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Câncer – Prevenção.  
3. Quimioterapia. I. Endringer, Denise Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

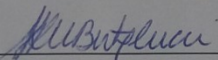
ARIELE ABREU VENTURINI POLESE

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DE  
CÂNCER DE FRUTOS DE INGA *Edulis martius***

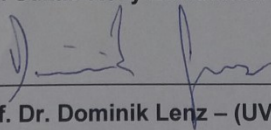
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 03 de maio de 2019,

Banca Examinadora:



\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Suzan Kelly Bertolucci – (UFLA)**



\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Dominik Lenz – (UVV)**



\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer – (UVV)**

**Orientadora**

Dedico esta Dissertação ao meu pai celestial, meu marido Marcelo Fanttini Polese, minha preciosa família e amigos, que foram essenciais em toda minha trajetória e para esta conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

O caminho percorrido para a realização desta pesquisa foi árduo, porém cheio de desafios, oportunidades e alegrias. A troca de experiências e as amizades foram essenciais para a conclusão dessa jornada.

Agradeço a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos, dando-me sabedoria, coragem, força, por me sustentar e não me deixar cair quando as forças pareciam se esvaír e pelas oportunidades que me permitiram ter grandes experiências e um grande aprendizado.

Agradeço à Universidade Vila Velha, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos e minha capacitação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo –FAPES, pelo apoio financeiro para a realização dos trabalhos.

A minha orientadora, Denise Coutinho Endringer pela excelente orientação, por todos os ensinamentos, confiança, apoio e conselhos dados e estímulos durante todos esses anos. Sua sabedoria, humildade, paciência, perfeccionismo ao ensinar e motivação que foram essenciais para a conclusão dessa jornada. Obrigada por ser uma pesquisadora exemplar e uma pessoa admirável. É uma honra inestimável ter sido sua aluna e orientanda.

Aos meus pais, Julio e Regina, que sempre me apoiaram e me ajudaram para a realização de todos meus sonhos e objetivos de vida. Obrigada, amo vocês e sou eternamente grata.

A Marcelo, meu marido, companheiro, amigo que me deu uma força extra nessa caminhada. Muito obrigada por tudo, te amo.

A minha amiga Érica, pelo apoio, amizade incondicional, carinho e pelos conselhos e sempre ter palavras reconfortantes e estimulantes.

Aos meus queridos colegas, Ana Cláudia, Flávia, Mariana, por todos os momentos que compartilhamos no laboratório, pela ajuda, amizade, carinho, incentivo e conselhos que me deram.

Aos meus queridos companheiros de laboratório por todas as experiências compartilhadas.

Ao professor Dr. Levy Gomes de Carvalho, Dr. Marcio Fronza e Dr. Rodrigo

Scherer pela disposição em ajudar em deixar seus laboratórios à disposição do meu trabalho.

À UVV e todos os professores e funcionários do PPGCF e biopráticas; à CAPES, FAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, que me deu força, fé, condições físicas, intelectuais, de saúde, perseverança e dedicação para lutar e conseguir atingir meus objetivos profissionais e pessoais, pois sem Ele nada poderia estar agradecendo. Obrigada meu Deus.

Obrigada a todos!!!

“Sem sonhos a vida não tem brilho, sem metas os sonhos não têm alicerces, sem prioridades os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir”.

Augusto Cury



# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	16
3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS .....	17
3.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL .....	17
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS .....	18
3.5 QUANTIFICAÇÃO TOTAL DO CONTEÚDO FENÓLICO .....	18
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINA MONOMÉRICA TOTAL .....	18
3.7 DETERMINAÇÃO DO SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH.....	18
3.8 DETERMINAÇÃO DO SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE ABTS .....	18
3.9 MÉTODO FRAP (PODER ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO FÉRRICA).....	19
3.10 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> .....	19
3.11 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DE NAD (P) H: QUINONA REDUTASE .....	20
3.12 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO FATOR NUCLEAR KB (NF-KB) .....	20
3.13 INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM MACRÓFAGOS MURINOS RAW264.7 (ATCC® -TIB™) .....	20
3.14 EMISSÃO DE ESPECTROMETRIA ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO .....	21
3.14.1 DIGESTÃO DA AMOSTRA.....	21
3.14.2 DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS .....	21
3.15 ESI-FT-ICR MS.....	23
3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	45

AGRADECIMENTOS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Coeficientes de correlação da concentração de elementos com o Teor de Cinzas Totais. 29
- Figura 2** PCA (*scores e loadings*) dos elementos das sementes de *Inga edulis* Martius distribuídas em três diferentes acessos do Espírito Santo. Os vetores em azul representam a contribuição do elemento para esse gráfico. Piúma (S1, S2 e S3); Cachoeiro de Itapemirim (S4) e Linhares (S5). 32
- Figura 3** PCA (*scores e loadings*) dos elementos dos pericarpos de *Inga edulis* Martius distribuídas em três diferentes acessos do Espírito Santo. Os vetores em azul representam a contribuição do elemento para esse gráfico. Piúma (P1, P2 e P3); Cachoeiro de Itapemirim (P4) e Linhares (P5). 34
- Figura 4** PCA (*scores e loadings*) dos pericarpos e sementes de *Inga edulis* Martius distribuídas em três diferentes acessos do Espírito Santo. Os vetores em azul representam a contribuição do elemento para este gráfico. Piúma (P1, P2 , P3, S1, S2 e S3); Cachoeiro de Itapemirim (P4 e S4) e Linhares (P5 e S5). 36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Parâmetros instrumentais e acessórios utilizados na determinação por ICP-OES.	22
<b>Tabela 2</b>	Valores de LD e LQ para o teor total dos elemento investigados.	23
<b>Tabela 3</b>	Dados morfométricos dos frutos de <i>Inga edulis</i> Martius.	25
<b>Tabela 4</b>	Composição centesimal dos pericarpos e sementes de frutos <i>Inga edulis</i> Martius.	26
<b>Tabela 5</b>	Concentração média ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) dos macronutrientes quantificados por ICP-OES dos pericarpos e sementes de frutos <i>Inga edulis</i> Martius.	27
<b>Tabela 6</b>	Concentração média ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) dos micronutrientes e contaminantes quantificados por ICP-OES dos pericarpos e sementes de frutos <i>Inga edulis</i> Martius.	28
<b>Tabela 7</b>	Teores de antocianinas, flavonoides, polifenóis, taninos e capacidade antioxidante dos pericarpos e sementes de frutos <i>Inga edulis</i> Martius.	37
<b>Tabela 8</b>	Compostos químicos identificados pelo ESI (-) FT-IRC MS das sementes de frutos <i>Inga edulis</i> Martius.	40
<b>Tabela 9</b>	Compostos químicos identificados pelo ESI (-) FT-IRC MS dos pericarpos de frutos <i>Inga edulis</i> Martius.	41
<b>Tabela 10</b>	Determinação da citotoxicidade por sulforodamina B (SRB).	43
<b>Tabela 11</b>	Atividade quimiopreventiva dos pericarpos e sementes de frutos <i>Inga edulis</i> Martius.	44

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABTS – 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)

ANOVA – Análise de Variância

AOAC – Association of Oficial Analytical Chemists

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio Padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

EPM – Erro Padrão da Média

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FRAP – Poder antioxidante de redução férrica

g – Grama

IAA – Índice de Atividade Antioxidante

IR50 - Índice de Redução 50%

L – Litros

LPS - Lipopolissacarídeo

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NCI – Instituto Nacional do Câncer

NF-κB - Fator nuclear kappa B

nm - Nanômetro

NO - Óxido Nítrico

QR – Quinona Redutase

SRB - Sulforodamina B

TCA - Ácido tricloroacético

TPCK - Np-Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona

TPTZ – Tripiridiltriazina

## RESUMO

POLESE, Ariele Abreu Venturini Polese, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, maio de 2019. **Composição química e atividade quimiopreventiva de câncer de frutos de *Inga edulis* Martius.** Orientadora: Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer.

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo, onde ocorre o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Na busca pela identificação de novas fontes de quimiopreventivos e antioxidantes, este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar compostos polifenólicos para avaliar suas atividades antioxidantes e determinar a capacidade quimiopreventiva dos pericarpos e sementes de frutos *Inga edulis* Martius. Os frutos foram coletados na localidade de Piúma (Pericarpo P1, P2, P3 e sementes S1, S2 e S3); Cachoeiro de Itapemirim (Pericarpo P4 e semente S4) e Linhares (Pericarpo- P5 e Semente S5). Foi determinada a composição centesimal (umidade, cinzas, proteínas, carboidratos e lipídeos), teores de antocianinas, flavonoides e fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), atividade quimiopreventiva *in vitro* (quinona redutase, NF-κB e óxido nítrico), identificação das moléculas por ESI (-) FT-ICR MS, a concentração média dos elementos analisados por ICP-OES e Análise por Componentes Principais (PCA). A viabilidade celular foi determinada pelo método sulforodamina B (SRB). Os resultados demonstraram que o *Inga edulis* possui quantidades significativas de carboidratos e de proteínas nos pericarpos e sementes. Na capacidade antioxidante, todas as amostras apresentaram presença de antocianinas, flavonoides, polifenóis e taninos. As amostras P1 (49,72 mg/g; 32,60 mg/g) e P3 (54,56 mg/g; 37,03 mg/g) apresentaram maior teor de polifenóis e taninos, respectivamente. No ensaio de ABTS, FRAP e DPPH a amostra P3 foi a que apresentou melhor atividade nos três métodos (35,44 µg/g; 17,51 µg/g; 38,07 µg/g). Por ESI (-) FT-ICR MS foi possível identificar 6 moléculas presentes nas amostras de sementes e 12 moléculas presentes nas amostras de pericarpos. Os resultados do presente estudo indicam que não há acúmulo de metais pesados em nenhuma das amostras. As amostras mostraram-se ativas para inibição da síntese de óxido nítrico (iNOs), em macrófagos RAW264.7 Todos os extratos foram considerados inibidores leves do NF-κB. Tais resultados indicam que as amostras analisadas apresentam propriedades antioxidantes e quimiopreventivas que poderão ser utilizadas como possíveis agentes supressores da carcinogênese.

**Palavras-chaves:** ICP-OES, ensaios *in vitro* de quimioprevenção de câncer, NF-KB, ESI-FT-ICR MS.

## ABSTRACT

POLESE, Ariele Abreu Venturini, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, May 2019. **Chemical composition and chemopreventive activity of cancer of fruits of *Inga edulis* Martius.** Advisor: Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer.

The development of cancer is a complex process where the disordered growth of cells that invade tissues and organs occurs. In the search for the identification of new sources of chemopreventives and antioxidants, this work aimed to identify and quantify polyphenolic compounds to evaluate their antioxidant activities and to determine the chemopreventive capacity of the pericarp and fruit seeds *Inga edulis* Martius. The fruits were collected in the locality of Piúma (Pericarp P1, P2, P3 and seeds S1, S2 and S3); Cachoeiro de Itapemirim (Pericarp P4 and seed S4) and Linhares (Pericarp P5 and Seed S5). The centesimal composition (moisture, ashes, proteins, carbohydrates and lipids) was determined, anthocyanins, flavonoids and total phenolics, antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP), *in vitro* chemopreventive activity (quinone reductase, Nf-kB and nitric oxide), identification of the molecules by ESI (-) FT-ICR MS and the mean concentration of elements analyzed by ICP-OES and Principal Component Analysis (PCA). Cell viability was determined by the sulforhodamine B (SRB) method. The results showed that *Inga edulis* has significant amounts of carbohydrates and proteins in the pericarp and seeds. In the antioxidant capacity, all samples showed presence of anthocyanins, flavonoids, polyphenols and tannins. The P1 samples (49.72 mg/g; 32.60 mg/g) and P3 (54.56 mg/g; 37.03 mg/g) presented higher content of polyphenols and tannins, respectively. In the ABTS, FRAP and DPPH tests, the P3 sample showed the best activity in all three methods (35.44 µg/g; 17.51 µg/g; 38.07 µg/g). The ESI (-) FT-ICR MS identified 6 molecules present in the seed samples and 12 molecules present in the pericarp samples. Samples were active for inhibition of nitric oxide synthesis (iNOs) in macrophages RAW264.7 All extracts were considered mild inhibitors of NF-κB. These results indicate that the analyzed samples present antioxidant and chemopreventive properties that can be used as possible suppressive agents for carcinogenesis.

**Key words:** ICP-OES, *in vitro* cancer chemoprevention assays, NF-kB, ESI (-) FT-ICR MS

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com a finalidade terapêutica acompanha o homem ao longo do tempo, sendo assim parte de sua cultura (Cragg & Newman, 2013). No Brasil esse uso tem influências indígena, africana e europeia. Mesmo com novos e modernos medicamentos, boa parte da população ainda faz uso de plantas medicinais, seja associado ou não ao medicamento (Nascimento Junior et al., 2016).

Estima-se que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento faz o uso de plantas no cuidado primário com a saúde (Nascimento Junior et al., 2016)

O conhecimento popular sobre as plantas medicinais serve de ponto de partida para o desenvolvimento de pesquisas e novos fármacos, com o objetivo de prevenir e tratar doenças (Coutinho et al., 2017). Há muitas espécies de plantas ainda não identificadas e não estudadas (Subramani et al., 2017; Zeni et al., 2017).

Entre as muitas possibilidades de exploração de espécies de plantas disponíveis na biodiversidade brasileira, destacamos a família Fabaceas, representada por mais de 727 gêneros e 19.325 espécies (de Amorim et al., 2016).

A árvore *Inga edulis* Martius (Fabaceas), é uma leguminosa, nativa da América Tropical e amplamente cultivada e distribuída na Amazônia e na América Central, sendo comum em regiões próximas a rios e lagos (Dias, Souza & Rogez, 2010). O termo *I. edulis* é de origem indígena e significa ensopado, embebido, isso se deve a sua polpa aquosa, comestível e aromática, de cor esbranquiçada e adocicada, rica em sais minerais e de sabor exótico, podendo ser consumida in natura ou processada, como geleia (Arévalo-Pinedo et al., 2006; Falcão & Clemente, 2000). O fruto é de cor esverdeada, cilíndrica e comprida, suas sementes são negras, em número variável por fruto, revestida por uma polpa branca (Falcão & Clemente, 2000).

A altura média da árvore pode chegar a atingir de 15 a 20 metros de altura em locais abertos e até 40 metros de altura na floresta. Possui rápido crescimento e aos três anos, inicia-se a floração e a frutificação (Falcão & Clemente, 2000)

Na medicina popular, o fruto *Inga edulis* Martius é utilizado como anti-diarréico infusão das folhas como anti-inflamatório e no tratamento da artrite reumatóide (Lim, 2012; Silva et al., 2007; Souza et al., 2007) . Essas atividades foram relacionadas à elevada atividade antioxidante, em parte proveniente da composição rica em flavonoides, ácidos fenólicos e catequinas (Silva et al., 2007a; Souza et al., 2007). A

polpa do fruto é usada para o preparo de um xarope utilizado na medicina caseira contra bronquites e a decocção da casca é empregada na cura de feridas e diarreias (Falcão & Clemente, 2000). Na Colômbia, sua polpa é utilizada para a produção de bebida alcoólica (Lim, 2012). Possui propriedades tais como: antimicrobiana, anticonvulsivante, anti-viral, antioxidante, antidepressivo e cicatrizante de feridas, (Costa Júnior et al., 2012; Mourão Júnior & Souza Filho, 2010), porém seus frutos são poucos cultivados, explorados e estudados (Costa Júnior et al., 2012; Mourão Júnior & Souza Filho, 2010).

A demanda por informações de espécies florestais arbóreas como alternativas de renda e como espécies viáveis para o modelo de agroecologia vem crescendo (Funari & Ferro, 2005). O *Inga edulis* Martius vem sendo usado como componente agroflorestal para sombrear cultivos econômicos, como café, cacau, cupuaçu, dentre outros, e sua biomassa pode ser aproveitada como forragem e adubo verde. Esta planta é resistente a condições precárias, como acidez e à exposição excessiva à luz (Falcão & Clemente, 2000; Silva et al., 2012).

Os Sistemas Agroflorestais (SAF's) são sistemas onde se utiliza da terra e tecnologias nas quais espécies lenhosas perenes (árvores, arbustos e palmeiras) são deliberadamente usadas na mesma unidade de manejo associadas com cultivos agrícolas e/ou animais (Altieri & Nicholls, 2011; Gama-Rodrigues & Willy, 2012). Os SAF's obtêm-se uma ferramenta importante para a agricultura familiar no combate à pobreza rural, por potencializarem o uso da mão-de-obra disponível na propriedade. Além disso, podem melhorar a qualidade de vida do trabalhador rural, à medida que garante a sustentabilidade econômica da comunidade envolvida neste sistema (Cidin et al., 2014; de Almeida & Valle, 2007; Leite et al., 2013).

Os SAF's devem ser planejados tomando em conta as características locais de clima, solo e topografia de cada região. De forma sustentável garante o aumento da renda familiar contanto com um maior envolvimento de toda sua família (Paludo & Costabeber, 2012; Vieira Filho & Silveira, 2012). O aumento da biodiversidade dos SAF's integra um modelo ecológico promissor, uma vez que possibilitam o não uso de agroquímicos (Altieri & Nicholls, 2011).

O câncer, um processo complexo, pode ser definido como uma enfermidade multicausal crônica, onde células anormais apresentam crescimento desordenado e incontrolável, invadindo tecidos e órgãos, possuindo subdivisões de vários tipos, variando conforme o tecido do órgão originário e o mecanismo de desenvolvimento



da doença (Instituto Nacional do Câncer - NCI, 2015). Os fatores de risco relacionados ao câncer podem ser encontrados no ambiente físico, ser herdados ou representar hábitos ou costumes próprios de um determinado ambiente social e cultural (Perin & Zanardo, 2013). A prevenção primária e secundária são estratégias promissoras que devem ser empregadas para reduzir a mortalidade pela doença. A prevenção primária consiste em evitar o contato com agentes carcinogênicos exógenos (Sporn & Suh, 2000). A prevenção secundária, chamada quimioprevenção de câncer, há cerca de duas décadas tem sido considerada uma estratégia fundamental para diminuir a incidência de câncer e mortalidade por esta doença (Sporn & Suh, 2000).

A quimioprevenção está relacionada à inibição, atraso ou reversão do processo da carcinogênese por meio da ingestão de substâncias oriundas da alimentação ou fármacos sintéticos (Sporn & Suh, 2000).

Estudos têm indicado que constituintes fitoquímicos obtidos de frutas e vegetais, como substâncias fenólicas, terpenóides e substâncias naturais anti-oxidantes (carotenoides, flavonoides) mostraram-se favoráveis à inibição e tratamento de certos tipos de câncer e de doenças degenerativas, como as doenças cardíacas (Gengaihi et al., 2014; Rabi & Bishayee, 2009), redução do estresse oxidativo e retardo do envelhecimento (Rossi et al., 2016). As substâncias fenólicas são conhecidas por apresentarem diversas atividades bioativas, como ação antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e ação antioxidante (Avila et al., 2016). Adicionalmente, substâncias fenólicas podem preservar os alimentos contra a ação de microorganismos e oxidação lipídica (Caleja et al., 2017). Gengaihi et al. (2014) evidenciaram que os compostos antioxidantes são os principais atuantes na redução significativa de ações prejudiciais de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutralizá-los e impedir algumas doenças como o diabetes.

Segundo o NCI (2015), uma dieta rica em vegetais e frutas é capaz de prevenir novos casos de câncer. Especificamente, observa-se um aumento no número das publicações científicas com plantas medicinais refletindo sua valorização para a busca de novas opções terapêuticas e/ou novas moléculas pioneiras para obtenção de novos fármacos (Subramani et al., 2017). A hipótese deste estudo é que o *Inga edulis* Martius por sua ação anti-inflamatória e antioxidante atuará como quimiopreventivo de câncer, inibindo o processo de carcinogênese. Portanto, este trabalho tem como objetivo identificar e quantificar compostos polifenólicos nos

pericarpos e sementes de frutos *I. edulis*, assim como avaliar seus potenciais antioxidantes e quimiopreventivos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar e quantificar compostos polifenólicos nos pericarpos e sementes de frutos *Inga edulis* Martius, assim como avaliar seus potenciais antioxidantes e quimiopreventivos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar química e fisico-quimicamente frutos de *Inga edulis* Martius, quanto ao teor de polifenóis totais, taninos, antocianinas, flavonoides e composição centesimal;
- Avaliar o potencial antioxidante de frutos dos respectivos extratos de *Inga edulis* Martius;
- Avaliar a capacidade quimiopreventiva de câncer de extratos etanólicos de frutos de *Inga edulis* Martius.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material vegetal

Os frutos de *Inga edulis* Martius utilizados neste trabalho foram coletados de três acessos, localizados nos municípios do estado do Espírito Santo, Brazil, Piúma (20°50'04.1"S 40°43'58.1"W - amostra P1 e S1; 20°50'08.1"S 40°45'02.0"W- amostra P2 e S2 e 20°51'30.9"S 40°49'05.9"W – amostra P3 e S3), na Fazenda Experimental do Incaper, em Cachoeiro de Itapemirim (20°44'43"S 41°17'29"W – amostra P4 e S4), em Linhares (19°22'05.9"S 040°16'18.8" W - amostra P5 e S5). A coleta dos frutos ocorreu entre os meses de junho e agosto. Todos foram congelados a -20° C até o uso. As amostras dos pericarpos foram denominadas P1, P2, P3 (Piúma), P4 (Cachoeiro de Itapemirim) e P5 (Linhares) e as sementes S1, S2, S3 (Piúma), S4 (Cachoeiro de Itapemirim) e S5 (Linhares). Os espécimes foram devidamente identificados pela botânica Luana Silva Braucks Calazans, herborizados e depositados no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES (Vitória - ES, Brasil), sob o número VIES-40743 (Piúma), 40744-VIES (Cachoeiro de

Itapemirim) e 40745-VIES (Linhares). Foram coletados aproximadamente 15 a 20 frutos por árvore. O pericarpo foi removido manualmente, a polpa foi separada da semente de forma manual e higiênica. A polpa foi descartada. A análise morfológica e morfométrica dos frutos foram realizadas, sendo observado o tipo de fruto, cor, dimensões, deiscência e número de sementes por fruto. Procedeu-se com a separação dos pericarpos e sementes. Posteriormente, os pericarpos e sementes foram submetidos à secagem em estufa com circulação forçada de ar, na temperatura de 40° C, por 24 horas. Após este processo, a pesagem das sementes secas foi realizada novamente. Em seguida, as cascas foram pulverizadas em moinho de facas, modelo MA 680 e as sementes pulverizadas em moinho de bolas, modelo MA 350. As amostras foram transferidas para vidros separados, identificados e protegidos da luz e armazenados a -20° C para serem submetidas ao processo de extração.

### **3.2 Obtenção de extratos**

O material pulverizado foi extraído (por sonicação a 60 Hz), por dois ciclos de 60 minutos cada, empregando-se 150 mL de etanol. Após extração, o solvente foi removido a 55° C com auxílio de rota-vapor e para a desidratação completa do extrato, este foi submetido à liofilização utilizando um liofilizador série LT DIM (LT, versão 3.0 / 2014) a 80° C e uma pressão de 0,000400 mmHg por 48 horas. Em seguida foi armazenado em congelador à -20° até o momento do uso. Foram preparados extratos dos pericarpos e sementes dos frutos coletados.

### **3.3 Determinação da composição centesimal**

A determinação do teor de cinzas, umidades, proteínas e lipídeos dos pericarpos e sementes de *Inga edulis* foram realizados de acordo com AOAC (2016). As amostras foram padronizadas em 3,5 g para ambos os materiais vegetais. Para umidade a amostra foi submetida em cápsula de porcelana (cadinho), previamente tarados. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até peso constante. A cinza foi obtida através do aquecimento em mufla, com temperatura próxima a 550-570° C. A determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método Kjeldahl e a determinação do teor de lipídeos foi realizada pelo método de Goldfish. O carboidrato total foi calculado pela diferença (100 – soma das demais frações da composição centesimal). Os valores de todos os componentes foram expressos em porcentagem (%).

### 3.4 Quantificação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com (Krepsky et al., 2012), com modificações. Uma curva de calibração de quercetina foi construída para concentrações de 1 a 12  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $R^2$  0,997). Os resultados foram expressos como mg equivalentes de quercetina / g do extrato.

### 3.5 Quantificação total do conteúdo fenólico

O teor de polifenóis e taninos foram determinados de acordo com o descrito por (Krepsky et al., 2012), com modificações, seguindo o método de Folin-Ciocalteu. Uma curva de calibração de ácido gálico foi construída para concentrações variando de 6,2 - 150  $\mu\text{g} \text{ mL}$  ( $R^2 = 0,9991$ ). Os resultados foram expressos como mg equivalentes de ácido gálico /g do extrato.

### 3.6 Quantificação de antocianina monomérica total

O teor total de antocianina monomérica dos extratos do *Inga* foi determinados por meio de um protocolo espectrofotométrico de pH diferenciado, descrito por (Giusti & Wrolstad, 2001). A absorbância final foi calculada empregando-se a equação: Absorbância final =  $(A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 1 - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 4,5$ , e o teor total de antocianinas pela equação: Teor total de antocianinas =  $(A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$ . Onde, A = absorbância final, MW = massa molecular (449,2), DF = fator de diluição, e  $\epsilon$  (absortividade) = 26900. Os resultados foram expressos como mg equivalentes de antocianina /g do extrato.

### 3.7 Determinação do sequestro do radical livre DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de atividade sequestrante usando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Uma curva de calibração de quercetina foi construída para concentrações variando de 1,6 a 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $R^2$  0,988) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  equivalentes de quercetina.  $\text{g}^{-1}$ . As medições foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como o índice de atividade antioxidante (IAA) classificada como muito fraca ( $\text{IAA} < 0,1$ ), fraca ( $0,1 < \text{IAA} < 0,5$ ), moderada ( $0,5 < \text{IAA} < 1,0$ ), forte ( $1,0 < \text{IAA} < 2,0$ ) e muito forte ( $\text{IAA} > 2,0$ ) de acordo com o índice desenvolvido por (Scherer & Godoy, 2009).

### 3.8 Determinação do sequestro do radical livre ABTS

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método colorimétrico de redução do ácido (2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (Re et al., 1999). Uma curva de calibração de quercetina foi construída para concentrações variando de 0,8 a

100 µg / mL ( $R^2$  0,988). As medições foram realizadas em triplicata e os resultados representou o  $IR_{50}$  (concentração que reduz 50% dos radicais livres) que são expressos em µg equivalentes de quercetina.  $g^{-1}$ .

### **3.9 Método FRAP (Poder antioxidante de redução férrica)**

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método que se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo  $Fe^{3+}$  / tripiridiltriazina (TPTZ), para formar  $Fe^{2+}$ , de intensa cor azul (Benzie & Strain, 1996). Uma curva de calibração de quercetina foi construída para concentrações variando de 0,8 a 100 µg / mL ( $R^2$  0,985). As medições foram realizadas em triplicata e os resultados representou o  $IR_{50}$  (concentração que reduz 50% dos radicais livres) que são expressos em µg equivalentes de quercetina.  $g^{-1}$ ..

### **3.10 Avaliação da citotoxicidade *in vitro***

Para a avaliação da citotoxicidade (Houghton et al., 2007; Skehan et al., 2007; Vichai & Kirtikara, 2006) dos extratos nos ensaios de quimioprevenção de câncer foi empregado o método de coloração com sulforodamina B (SRB), recomendado pelo NCI (2015). Foram empregados as linhagens celulares OVCAR-3 (ATCC® HTB-161™) (ovário humano), L929 (ATCC® CRL-6364™) (fibloblastos), MCF-7 (ATCC® HTB-22™) (câncer de mama humano) e EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) (endotelial). As células foram semeadas na densidade de  $2 \cdot 10^4$   $mL^{-1}$ . A determinação da citotoxicidade foi realizada empregando-se o extrato nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg.  $mL^{-1}$  em triplicata para determinação do  $IC_{50}$ . Dimetilsufóxido na concentração de 0,5 % foi utilizado como controle negativo e camptotecina (10 µM) foi usada como controle positivo (Wu et al., 2011). As placas foram incubadas, por 72 horas, em estufa de  $CO_2$ . Após incubação, as células foram fixadas com adição de 50 µL de solução de TCA a 20 %, seguindo-se incubação na geladeira por 30 minutos. A microplaca foi, então, lavada em água corrente, com fluxo baixo, por 2 minutos. Logo após, foi seca em estufa ventilada por 30 minutos. Após secagem, foram adicionados 50 µL de SRB a 0,4 %. Incubou-se, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida a microplaca foi lavada com ácido acético a 1 % de 4 a 5 vezes. Foi seca em estufa ventilada e acrescentaram 200 µL de solução de TRIS base 10 mM. Na sequência, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas, no comprimento de onda de 515 nm.

### 3.11 Determinação da indução de NAD (P) H: quinona redutase

A atividade da quinona redutase (QR) foi avaliada como descrito por (Pezzuto et al., 2005). A indução da QR foi avaliada usando-se as células de Hepa 1c1c7 (ATCC CRL-2026) em placa de 96 poços na densidade de  $2 \cdot 10^4$  células.  $\text{mL}^{-1}$  em 200  $\mu\text{L}$  de Dulbecco's modified Eagle's meio (DMEM contendo 100 IU.  $\text{mL}^{-1}$  penicilina e 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  estreptomicina a 37 °C em atmosfera umidecida contendo 5 %  $\text{CO}_2$  (I Sigma-USA). Após o período de adesão de 24 horas, a indução da atividade enzimática foi determinada usando o extrato de pericarpos e sementes de *Inga edulis* na concentração de 20  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . A redução mediada por menadiol dependente do NADPH do brometo (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi medido por determinação da absorbância a 595 nm. A razão de indução da quinona redutase (IR) representa a atividade específica na enzima no tratamento (extrato) comparado ao controle negativo DMSO. Bromoflavona foi utilizada como controle positivo ( $\text{IC}_{50}$  53.71 nM).

### 3.12 Ensaio de inibição do fator nuclear $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )

O ensaio de inibição de NF- $\kappa\text{B}$  foi conduzido usando o método repórter luciferase como descrito por (Homhual et al., 2006). Resumidamente, para o ensaio, linhagem celular 293-NF- $\kappa\text{B}$  (linha celular 293 derivada de rim humano, 293, 12-PTA-5554), transfectada com o gene repórter de NF- $\kappa\text{B}$  luciferase, foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células.  $\text{mL}^{-1}$  em 200  $\mu\text{L}$  DEMEM. Extratos etanólicos foram testados na concentração de 20  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Após o tratamento, as células foram incubadas por mais 6 horas. Posteriormente, o ensaio luciferase empregando-se o kit Luc assay system (Promega®). A atividade da luciferase foi monitorada através do leitor de microplacas, com absorção a 515 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem da atividade inibitória do NF- $\kappa\text{B}$ . Utilizou-se TPCK (Na-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)  $\text{IC}_{50}$  3.8 nM como controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.13 Inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos murinos-RAW264.7 (ATCC® TIB-71™)

O nível de nitrito foi avaliado como NO produto estável, estimado como descrito por (Park et al., 2011). Resumidamente, as células RAW264.7 cultivadas em meio DMEM High foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $50 \times 10^4$  células.  $\text{mL}^{-1}$  e distribuídas em 200  $\mu\text{L}$  por poço, incubadas a 37° C, 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Após esse período, o meio foi substituído por meio DMEM isento

de vermelho de fenol e as células receberam extrato na concentração de 20  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Após 30 minutos, as células foram artificialmente induzidas à inflamação por LPS (lipopolissacarídeo) 1  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Incubadas então, por 20 horas. Após este período, o sobrenadante foi removido e a produção de NO foi espectrofotometricamente determinada pela medida do nitrito, um produto oxidativo do NO. O Nitrito foi determinado pela reação de Griess, misturando-se 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante com 180  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess. Absorbância foi medida no comprimento de onda de 540 nm. Curva de nitrito de sódio foi construída como controle (100-1.56  $\mu\text{M}$ ).

### **3.14 Emissão de espectrometria óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)**

#### *3.14.1 Digestão da Amostra*

Todas as amostras foram secas em estufa a 60° C por 72h. Posteriormente foram submetidas à decomposição ácida por radiação micro-ondas MICROWAVE GO. Para a decomposição das amostras de casca e semente, foram pesados cerca de 0,2 g de cada amostra, adicionou-se 1,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado destilado, 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 6,0 mL de H<sub>2</sub>O. Após adição dos reagentes, as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos para uma pré-decomposição. Em seguida, foram submetidas à radiação micro-ondas empregando-se um programa de aquecimento que consistiu de duas etapas. Primeiramente, uma rampa de aquecimento de 10 min até atingir 100° C, seguido por 10 min de condição isotérmica. Em segundo, outra rampa de aquecimento de 10 min até alcançar 180° C, também permanecendo no final por 10 min de condição isotérmica. Após resfriamento, as amostras foram avolumadas para 15,0 mL com água ultrapura.

#### *3.14.2 Determinação dos Elementos*

Para a determinação dos elementos foi utilizado o Espectrômetro Óptico com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) da marca Thermo Scientific, modelo ICAP 6000 série, com visão axial e radial. O sistema de introdução de amostra foi composto de nebulizador concêntrico acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica e bomba peristáltica. Foi utilizado corpo de tocha EMT Duo (Thermo Fisher Scientific® Inc., Massachusetts, EUA). Nesse equipamento, o gás de purga utilizado no sistema óptico, assim também como o gás carregador, auxiliar e manutenção do plasma foi o Argônio com pureza 99,998%. As condições experimentais para ICP-OES estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros instrumentais e acessórios utilizados na determinação por ICP-OES.

<b>Parâmetros</b>	<b>ICP-OES</b>
Potencia de radiofrequência	1200 W
Vazão do gás principal	12 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás auxiliar	0,50 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás de nebulização	0,50 L min <sup>-1</sup>
Nebulizador	Concêntrico Meinhard®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Vista de observação	Axial e radial
Vazão da amostra	0,6 mL min <sup>-1</sup>

Os padrões de calibração para construir a curva analítica (ICP-OES) dos elementos foram preparados em concentrações de HNO<sub>3</sub> 6% (v/v) a partir de diluições adequadas de soluções estoque de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, sendo a concentração de ácido a mesma utilizada na decomposição das amostras. Todos os padrões foram adquiridos de Absolute Standards (Absolute Standards®, Inc. Connecticut, EUA) com rastreabilidade NIST e certificados ISO GUIDE 34. As figuras de validação do método estão apresentadas na Tabela 2.



**Tabela 2.** Valores de LD e LQ para o teor total dos elementos investigados.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	r <sup>2</sup>	LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Al	394,401	0,99992	0,147	0,490
As	193,759	0,99961	0,117	0,390
B	249,678*	0,99973	0,517	1,722
Ba	455,403*	0,99963	0,027	0,089
Ca	315,887*	0,99945	0,498	1,661
Cd	214,438	0,99977	0,003	0,010
Co	228,616	0,99986	0,015	0,049
Cr	267,716	0,99966	0,026	0,086
Cu	324,754*	0,99954	0,296	0,987
Fe	259,940*	0,99924	0,161	0,538
K	766,490*	0,99923	4,077	13,59
Mg	279,079*	0,99936	1,289	4,297
Mn	257,610	0,99974	0,004	0,013
Mo	202,030	0,99972	0,016	0,052
Na	589,592*	0,99320	0,794	4,146
Ni	231,604	0,99976	0,022	0,074
P	213,618	0,99971	0,162	0,541
Pb	220,353	0,99983	0,070	0,232
S	182,034	0,99941	0,163	0,543
Se	196,090	0,99956	0,143	0,477
V	292,402	0,99972	0,027	0,090
Zn	206,200	0,99971	0,007	0,023

\*visão radial

\*\*LD: limite de detecção

\*\*\*LQ: limite de quantificação

### 3.15 ESI (-) FT-ICR MS

Para identificar as moléculas, presentes no extrato aquoso liofilizado do estudo, 10  $\mu\text{L}$  de extrato de *Inga edulis* foram dissolvidos em 1000  $\mu\text{L}$  de solução de

metanol / água (50% v / v). Os extratos foram infundidos diretamente a uma taxa de fluxo de 2  $\mu\text{L h}^{-1}$  na fonte ESI(-). O espectro de massa (modelo 9.4 T Solarix, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha) foi ajustado para o modo de ionização negativo, ESI (-), num intervalo de massa de  $m / z$  200-1400. As condições da fonte ESI foram as seguintes: uma pressão de gás nebulizador de 2,0 bar, uma tensão capilar de 3,8 kV e uma temperatura de transferência capilar de 200° C. O acúmulo de tempo dos íons foi de 0,005 s. Os espectros de massa ESI (-) FT-ICR MS foram adquiridos acumulando 32 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo em quatro conjuntos de dados de domínio de tempo mega-pontos. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o software Data Analysis (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). As composições elementares dos compostos foram determinadas medindo os valores  $m/z$ . As estruturas propostas para cada fórmula foram atribuídas usando o banco de dados Chemspider ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)). O grau de insaturação para cada molécula pode ser deduzido diretamente de seu valor DBE de acordo com a equação  $\text{DBE} = c - h / 2 + n / 2 + 1$ , onde  $c$ ,  $h$ , e  $n$  são os números de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente, na fórmula molecular.

### 3.16 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad 5 (San Diego, CA, EUA 176). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e/ou desvio padrão (DP). Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), e a significância da diferença entre as médias determinada por teste post-hoc pelo método de Tukey, com significância aceita quando  $p < 0,05$ .

Foram construídos três modelos de PCA: dos teores de elementos das sementes do *Inga edulis*, dos teores de elementos dos pericarpos do *Inga edulis* e dos pericarpos e sementes do *Inga edulis*. As variáveis (concentração de elementos) foram pré-tratadas com auto-escalamento para agregar o mesmo peso a todas variáveis para construção do modelo. Em todos os modelos, utilizaram 21 variáveis: Alumínio (Al), Boro (B), Bário (Ba), Cádmi (Cd), Cobalto (Co), Crômio (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Sódio (Na), Níquel (Ni), Fósforo (P), Chumbo (Pb), Enxofre (S), Selênio (Se), Vanádio (V) e Zinco (Zn). A partir da construção do modelo PCA, pôde-se construir gráficos de *scores* e *loadings* para avaliação dos resultados.

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização morfométrica de frutos é fundamental na identificação e caracterização botânica de espécies, na compreensão de desenvolvimento, além de subsidiar informações relevantes ao melhoramento vegetal das espécies (Abud et al., 2018). Na morfometria dos frutos de *Inga edulis* Martius (Tabela 3) foi determinado o comprimento dos frutos, número de sementes e peso dos frutos. Os frutos coletados dos três acessos (Piúma, Cachoeiro de Itapemirim e Linhares) apresentaram diferenças estatísticas em seus resultados morfométricos. Os frutos *I.edulis* de Piúma (1 e 3) apresentaram peso e comprimento superior aos demais frutos. Estas diferenças morfométricas podem ser explicadas devido às características físicas e físico-químicas dos frutos que sofrem influência de fatores do meio, tais como o clima, o relevo, a temperatura, a humidade do ar, a radiação, o tipo de solo, dentre outro (Nascimento et al., 2014).

**Tabela 3** – Dados morfométricos dos frutos de *Inga edulis* Martius.

Amostras	Peso (kg)	Comprimento (mm)	Número de sementes
<b>Inga 1</b>	0,25±0,14 <sup>a</sup>	0,70±0,19 <sup>a</sup>	11,47±3,31
<b>Inga 2</b>	0,13±0,02 <sup>b</sup>	0,49±0,07 <sup>b</sup>	15,53±2,47
<b>Inga 3</b>	0,18±0,04 <sup>a</sup>	0,69±0,12 <sup>a</sup>	13,60±4,25
<b>Inga 4</b>	0,19±0,06 <sup>a</sup>	0,45±0,08 <sup>b</sup>	12,41±3,93
<b>Inga 5</b>	0,14±0,03 <sup>b</sup>	0,51±0,06 <sup>b</sup>	15,06±1,78

Resultados expressos como a média ± DP para triplicados. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Amostras 1 a 3 (n15 - Piúma); amostra 4 e 5 (n17 – Cachoeiro de Itapemirim e Linhares). DP – desvio padrão.

A principal finalidade na determinação da composição centesimal é quantificar os teores de umidade, cinzas, proteínas, carboidratos, lipídios, fibras, vitaminas e minerais (Park & Antônio, 2006). Os resultados da composição centesimal dos pericarpos e sementes de *Inga edulis* estão presentes na Tabela 4. Observa-se que os pericarpos e sementes dos frutos *I. edulis* analisados são ricos em carboidratos, e proteínas e pobre em lipídeos. De acordo com Balaji et al., 2013, a semente de *Tamarindus* apresenta 16,58 % de proteínas e 7,84 % de lipídeos, resultados bem diferentes dos encontrados neste trabalho. Isso se deve, talvez, devido ao clima da região ou espécie de planta. Os lipídeos são importantes fontes calóricas, o baixo teor no presente estudo confere ou indica ao fruto um baixo valor energético.

**Tabela 4** - Composição centesimal dos pericarpos e sementes de frutos *Inga edulis* Martius.

Amostras	Lipídeos %	Proteínas %	Umidade %	Cinzas %	Carboidratos Totais * %
<b>P1</b>	0,51±0,14 <sup>a</sup>	2,72±0,16 <sup>d</sup>	7,63±0,15 <sup>b</sup>	3,66±0,02 <sup>b</sup>	85,48±0,79 <sup>b</sup>
<b>P2</b>	0,37±0,16 <sup>b</sup>	6,80±0,13 <sup>b,c</sup>	7,30±0,08 <sup>b</sup>	3,53±0,06 <sup>b</sup>	82,00±0,27 <sup>c,d</sup>
<b>P3</b>	0,45±0,07 <sup>b</sup>	5,59±0,11 <sup>c</sup>	8,39±0,06 <sup>b</sup>	4,16±0,04 <sup>a,b</sup>	81,41±0,69 <sup>c</sup>
<b>P4</b>	0,61±0,33 <sup>a</sup>	4,76±0,29 <sup>c</sup>	3,10±1,60 <sup>c</sup>	3,97±0,66 <sup>a,b</sup>	87,56±1,23 <sup>a</sup>
<b>P5</b>	0,43±0,14 <sup>b</sup>	7,14±0,11 <sup>b</sup>	1,45±0,03 <sup>d</sup>	4,37±0,11 <sup>a</sup>	86,61±0,19 <sup>b</sup>
<b>S1</b>	0,24±0,12 <sup>b</sup>	10,72±0,19 <sup>a</sup>	11,95±0,05 <sup>a</sup>	2,47±0,01 <sup>c,d</sup>	74,62±0,17 <sup>e</sup>
<b>S2</b>	0,88±0,20 <sup>a</sup>	10,54±0,54 <sup>a</sup>	12,63±0,04 <sup>a</sup>	2,52±0,02 <sup>c,d</sup>	73,43±0,55 <sup>e</sup>
<b>S3</b>	0,51±0,03 <sup>a,b</sup>	10,71±0,70 <sup>a</sup>	12,51±0,16 <sup>a</sup>	2,61±0,06 <sup>c,d</sup>	73,66±0,72 <sup>e</sup>
<b>S4</b>	0,51±0,19 <sup>a,b</sup>	10,80±0,48 <sup>a</sup>	2,49±0,08 <sup>d</sup>	2,84±0,10 <sup>c</sup>	83,36±0,49 <sup>b,d</sup>
<b>S5</b>	0,32±0,15 <sup>b</sup>	9,97±0,89 <sup>a</sup>	2,75±0,04 <sup>d</sup>	2,19±0,05 <sup>d</sup>	84,77±1,12 <sup>b</sup>

Resultados expressos como a média ± DP\* para triplicados. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas (p <0,05). \* Obtido por diferença. DP – desvio padrão.

De acordo com a Tabela 4, os pericarpos e sementes da região de Piúma (P1, P2, P3, S1, S2 e S3) apresentam maior teor de umidade quando comparada com as demais regiões. Essa diferença pode ser influenciada pelo grau de maturação do fruto, quanto mais maduro maior teor de umidade.

A composição centesimal dos pericarpos e sementes de *Inga edulis* indicam que as amostras apresentam teor de cinzas, variando de 4,37 % a 3,53 % entre os pericarpos e de 2,84 % a 2,19 % para as sementes (Tabela 4). A determinação de cinzas fornece uma indicação da riqueza da amostra em elementos minerais. Assim, a cinza de um material de origem vegetal ou animal, é o ponto de partida para a análise de minerais específicos. Os elementos minerais reconhecidos como essenciais são comumente divididos entre microelementos (boro, cobalto, cromo, cobre, ferro, manganês, molibidênio, níquel, chumbo, selênio, vanádio e zinco) e macroelementos (cálcio, potássio, magnésio, sódio, fósforo e enxofre). Outras frutas foram avaliadas quanto a sua composição centesimal e frutas com estrutura morfológica semelhante, com vagem, como tamarindo, apresentou teor de cinzas de 3,59 % para semente (Balaji et al., 2013).

**Tabela 5** – Concentração média ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) dos macronutrientes quantificados por ICP-OES dos pericarpos e sementes de frutos *Inga edulis* Martius.

Elementos/ Classificação	P1	P2	P3	P4	P5	S1	S2	S3	S4	S5
Cálcio (Ca)	4404±158,10 <sup>b</sup>	3551±64,39 <sup>c</sup>	3574±265,10 <sup>c</sup>	5409±193,52 <sup>a</sup>	2930±74,08 <sup>d</sup>	4065±262,80 <sup>b,c</sup>	3235±376,52 <sup>c,d</sup>	2126±39,78 <sup>e</sup>	3544±24,67 <sup>c</sup>	2367±22,06 <sup>d</sup>
Potássio (K)	11910±311,80 <sup>c</sup>	11426±222,31 <sup>c</sup>	16278±1026 <sup>b</sup>	15750±576,73 <sup>b</sup>	18826±154,21 <sup>a</sup>	7495±430,52 <sup>e</sup>	10564±1202 <sup>c,d</sup>	7875±75,02 <sup>d,e</sup>	9367±203,71 <sup>d</sup>	7459±182,31 <sup>e</sup>
Magnésio (Mg)	923,80±29,55 <sup>b,c</sup>	858,7±21,45 <sup>b,c</sup>	964,40±75,50 <sup>b</sup>	553,10±22,15 <sup>d</sup>	637,3±21,89 <sup>c,d</sup>	1004±59,23 <sup>b</sup>	1401±163,35 <sup>a</sup>	953,60±11,51 <sup>b</sup>	754,30±10,74 <sup>c</sup>	1569±42,74 <sup>a</sup>
Sódio (Na)	77,83±4,00 <sup>c</sup>	158,90±31,62 <sup>b</sup>	59,13±5,47 <sup>c</sup>	73,67±2,32 <sup>c</sup>	243,30±15,46 <sup>a</sup>	72,67±4,15 <sup>c</sup>	67,03±3,62 <sup>c</sup>	11,10±16,37 <sup>d</sup>	67,83±1,77 <sup>c</sup>	9,23±6,90 <sup>d</sup>
Fósforo (P)	1218±41,88 <sup>c</sup>	918,30±18,48 <sup>d</sup>	1317±96,77 <sup>b,c</sup>	1553±57,71 <sup>b</sup>	1498±20,65 <sup>b</sup>	1822±111,51 <sup>a</sup>	1756±204,91 <sup>a,b</sup>	1349±19,35 <sup>b,c</sup>	1656±33,11 <sup>a,b</sup>	1537±51,47 <sup>b</sup>
Enxofre (S)	745,90±21,56 <sup>c</sup>	728,80±11,68 <sup>c</sup>	774,00±0,61 <sup>c</sup>	813,90±34,03 <sup>c</sup>	832,7±13,03 <sup>c</sup>	1650±113,23 <sup>a</sup>	1698±197,12 <sup>a</sup>	1397±23,76 <sup>b</sup>	1395±28,92 <sup>b</sup>	1716±48,34 <sup>a</sup>

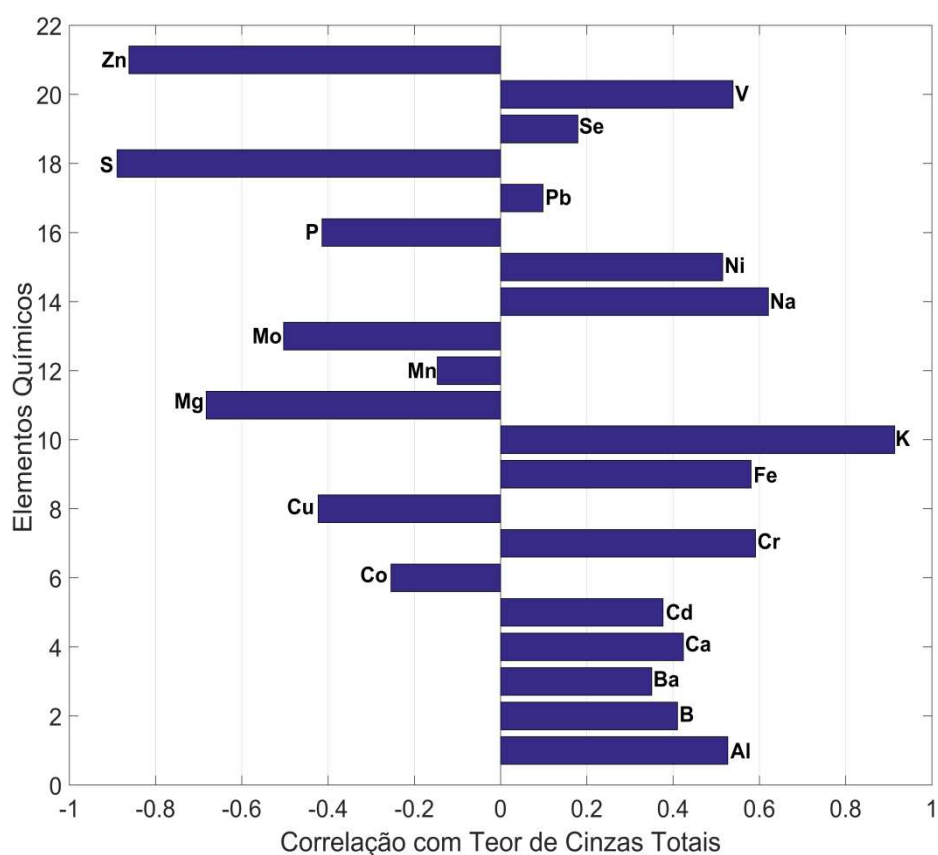
Resultados expressos como a média  $\pm$  DP\* para triplicados. Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). \*DP – desvio padrão.

**Tabela 6** – Concentração média (mg.kg<sup>-1</sup>) dos microelementos e contaminantes quantificados por ICP-OES dos pericarpos e sementes de frutos *Inga edulis* Martius.

Elementos/ Classificação	P1	P2	P3	P4	P5	S1	S2	S3	S4	S5
Boro (B)	10,64±1,07 <sup>b</sup>	18,53±0,32 <sup>c</sup>	16,13±190 <sup>c</sup>	13,52±0,77 <sup>a</sup>	8,34±0,35 <sup>d</sup>	10,05±0,65 <sup>b,c</sup>	11,87±1,38 <sup>c,d</sup>	10,28±1,13 <sup>e</sup>	9,94±0,37 <sup>c</sup>	7,10±0,24 <sup>d</sup>
Cobalto (Co)	0,26±0,01 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>d</sup>	0,03±0,00 <sup>d</sup>	0,06±0,01 <sup>c,d</sup>	0,06±0,00 <sup>c,d</sup>	0,43±0,03 <sup>a</sup>	0,08±0,00 <sup>c,d</sup>	0,02±0,00 <sup>d</sup>	0,09±0,01 <sup>c</sup>	0,07±0,01 <sup>c,d</sup>
Crômio (Cr)	0,30±0,02 <sup>c,d</sup>	0,06±0,01 <sup>d</sup>	0,56±0,02 <sup>b</sup>	0,46±0,09 <sup>b,c</sup>	1,22±0,07 <sup>a</sup>	0,24±0,03 <sup>c,d</sup>	0,29±0,04 <sup>c,d</sup>	0,16±0,01 <sup>d</sup>	0,43±0,10 <sup>b,c</sup>	0,32±0,02 <sup>c</sup>
Cobre (Cu)	7,36±0,20 <sup>b</sup>	6,03±0,25 <sup>b</sup>	10,56±0,58 <sup>a</sup>	9,20±0,42 <sup>a,b</sup>	7,75±0,22 <sup>a,b</sup>	10,21±0,43 <sup>a</sup>	9,19±0,98 <sup>a,b</sup>	10,88±2,54 <sup>a</sup>	10,36±0,30 <sup>a</sup>	10,45±0,11 <sup>a</sup>
Ferro (Fe)	124,50±11,05 <sup>b</sup>	53,49±9,69 <sup>c,d</sup>	167,80±9,59 <sup>a</sup>	68,26±7,90 <sup>c</sup>	37,51±3,72 <sup>d</sup>	43,06±2,84 <sup>d</sup>	35,55±4,00 <sup>d</sup>	2678±0,64 <sup>d</sup>	34,19±1,55 <sup>d</sup>	28,86±1,87 <sup>d</sup>
Manganês (Mn)	30,55±1,08 <sup>c</sup>	23,77±0,60 <sup>c,d</sup>	50,27±3,78 <sup>a</sup>	18,13±0,87 <sup>d</sup>	20,19±0,68 <sup>d</sup>	42,05±3,78 <sup>b</sup>	39,26±4,84 <sup>b</sup>	37,55±0,65 <sup>b</sup>	17,00±0,12 <sup>d</sup>	24,96±0,98 <sup>c,d</sup>
Molibdênio (Mo)	0,04±0,00 <sup>d</sup>	0,63±0,02 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>d</sup>	0,19±0,01 <sup>c</sup>	0,07±0,00 <sup>d</sup>	0,33±0,02 <sup>c</sup>	1,61±0,19 <sup>a</sup>	0,39±0,00 <sup>c</sup>	0,69±0,01 <sup>b</sup>	0,30±0,01 <sup>c</sup>
Níquel (Ni)	2,31±0,58 <sup>b</sup>	1,57±0,35 <sup>b</sup>	4,86±0,95 <sup>a,b</sup>	7,53±4,31 <sup>a</sup>	2,31±0,65 <sup>b</sup>	0,39±0,04 <sup>b</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup>	0,53±0,00 <sup>b</sup>	2,83±0,01 <sup>b</sup>	0,59±0,01 <sup>b</sup>
Selênio (Se)	0,70±0,07 <sup>b</sup>	1,12±0,01 <sup>a</sup>	0,95±0,06 <sup>a,b</sup>	0,86±0,18 <sup>a,b</sup>	0,83±0,03 <sup>a,b</sup>	0,76±0,18 <sup>b</sup>	0,96±0,07 <sup>a,b</sup>	0,51±0,06 <sup>c</sup>	0,82±0,10 <sup>b</sup>	0,88±0,09 <sup>a,b</sup>
Vanádio (V)	0,19±0,06 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>c,d</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>	0,08±0,03 <sup>c</sup>	0,01±0,00 <sup>c,d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,02±0,00 <sup>c,d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,01±0,00 <sup>c,d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>
Zinco (Zn)	9,44±0,04 <sup>c</sup>	12,90±0,33 <sup>c</sup>	12,04±1,57 <sup>c</sup>	10,15±0,90 <sup>c</sup>	11,33±0,59 <sup>c</sup>	28,34±1,30 <sup>a</sup>	28,82±3,27 <sup>a</sup>	24,30±2,22 <sup>a,b</sup>	21,62±0,21 <sup>b</sup>	22,28±0,65 <sup>b</sup>
<b>Contaminantes</b>										
Alumínio (Al)	125,40±12,14 <sup>a</sup>	19,45±3,35 <sup>b</sup>	125,60±6,40 <sup>a</sup>	13,32±3,48 <sup>b,c</sup>	12,54±1,23 <sup>b,c</sup>	0,36±0,63 <sup>c</sup>	1,77±0,12 <sup>c</sup>	1,48±0,40 <sup>c</sup>	0,78±0,15 <sup>c</sup>	1,37±1,53 <sup>c</sup>
Bário (Ba)	15,18±0,67 <sup>e</sup>	6,52±0,25 <sup>g</sup>	11,13±0,96 <sup>f</sup>	39,34±2,08 <sup>b</sup>	49,79±1,93 <sup>a</sup>	13,10±1,14 <sup>e,f</sup>	7,61±0,98 <sup>g</sup>	6,62±0,07 <sup>g</sup>	27,11±0,34 <sup>d</sup>	33,61±1,41 <sup>c</sup>
Cádmio (Cd)	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
Chumbo (Pb)	0,15±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,16±0,05 <sup>a</sup>	0,05±0,09 <sup>a</sup>	0,07±0,06 <sup>a</sup>	0,10±0,10 <sup>a</sup>	0,17±0,07 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>

Resultados expressos como a média ± DP\* para triplicados. Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas (p <0,05). \*DP – desvio padrão.

O gráfico de correlação das propriedades com Teor de Cinzas Totais, Figura 1, apresenta o quanto relacionado o teor de cinzas totais está com a propriedade, variando de 0 a 1. As variáveis mais correlacionadas com o teor de cinzas totais (norma do coeficiente de correlação ( $r$ ) maior que 0,8) foram o Zinco, Enxofre e Potássio, sendo que o Zn e S possuem correlação inversa e o K direta. Outros elementos também possuem correlação média ( $|r| > 0,6$ ), Magnésio correlacionado inversamente e Sódio correlacionado diretamente com a variável Teor de Cinzas Totais.



**Figura 1.** Coeficientes de correlação da concentração de elementos com o Teor de Cinzas Totais.

Os resultados dos procedimentos analíticos ICP-OES para determinação quantitativa dos macroelementos e microelementos dos pericarpos e sementes dos frutos *Inga edulis* Martius estão descrito nas Tabelas 5 e 6.

A avaliação dos dados quantificada por ICP-OES detectou maiores concentrações de elementos para Cálcio, Ferro, Potássio, Magnésio, Fósforo e Enxofre nas amostras analisadas.

O potássio foi o elemento, entre os analisados, que apresentou teores mais elevados, tanto na fração do pericarpo e sementes dos frutos *Inga edulis* Martius (Tabela 5). As frutas normalmente são ricas em potássio, principalmente os pericarpos (Gondim et al. 2005). Comparando-se com os resultados do presente trabalho, esta afirmativa se confirma. Com destaque para as amostras P3 ( $16278 \pm 1026$  mg / kg), P4 ( $15750 \pm 576,73$  mg / kg) e P5 ( $18826 \pm 154,20$  mg / kg). Abaixo do potássio, o cálcio, fósforo e magnésio foram os elementos mais abundantes nos pericarpos e sementes dos frutos *Inga edulis* Martius.

O magnésio foi detectado em maior concentração nas amostras S2 ( $1401 \pm 163.30$  mg / kg) e S5 ( $1569 \pm 42.74$  mg / kg) (Tabela 5). Os valores detectados neste trabalho são superiores aos encontrados para este elemento no extrato de *Tamarindus indica* L. (Mg  $1035 \pm 21$  mg / kg) (Ebrahim et al., 2012). Essas diferenças provavelmente são devidas a diversos fatores, como grau de maturidade, fertilização do solo, condição geográfica e clima. A deficiência de Magnésio e cálcio no organismo pode acarretar em câibras musculares, cólicas gastrointestinais, espasmo do coração e tremor. Estudos feitos por Ohira et al. (2009) comprovaram que a baixa ingestão de magnésio pode aumentar o risco de acidente vascular cerebral e afetar a vasoconstrição do músculo liso.

O chumbo e o cádmio estão significativamente abaixo dos limites da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1999), onde estabelece limites para as concentrações de chumbo e cádmio não podendo ser superiores a 10 e 0,3 mg / kg. Nas amostras analisadas, o cádmio não foi detectado, o valor médio de chumbo presente nas amostras (0,07 mg / kg) estão abaixo do limite proposto pela OMS. Isso indica a possibilidade do uso seguro dessa planta para consumo.



A Análise por Componentes Principais (PCA) das sementes de *Inga edulis* Martius, Figura 2, apresenta cinco amostras originadas de três diferentes acessos do Espírito Santo (Piúma – S1, S2 e S3; Cachoeiro de Itapemirim – S4 e Linhares – S5). As sementes de *I. edulis* de Piúma (S1, S2 e S3) diferem das demais por meio do segundo Componente Principal, PC2, com variância explicada de 21,58 % (ou seja, este componente contém 21,58 % de toda informação contida na matriz de dados composta pelas variáveis). Os elementos: Manganês, Zinco, Bário, Níquel, Cromo, Ferro, Fósforo, Sódio e Cálcio possuem maiores influências na separação.

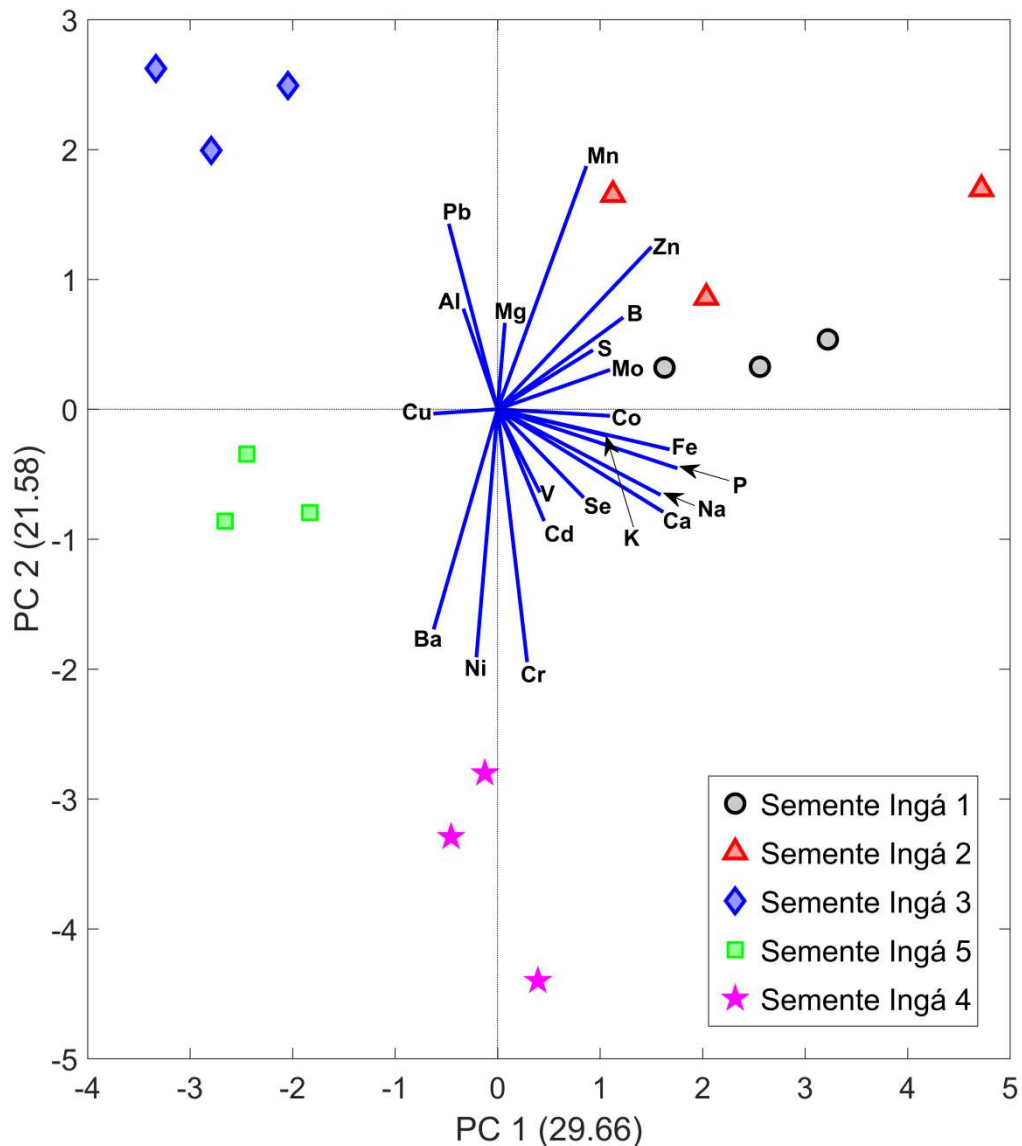
O teor de elementos químicos das sementes de *Inga edulis* de Piúma (S1, S2 e S3 e Cachoeiro de Itapemirim (S4) apresentam semelhanças em suas concentrações e formam um agrupamento natural no primeiro quadrante do gráfico dos scores (PC1 x PC2). Existem três agrupamentos formados pelas triplicatas das sementes: de Piúma (S3), Cachoeiro de Itapemirim (S4) e Linhares (S5) e outro formado pelas triplicatas da semente Piúma (S1 e S2), indicando que possuem variáveis que diferenciam a maioria das sementes.

Os *loadings* que apresentam alta relação com as sementes de Piúma (S1 e S2) são os elementos: Zinco, Manganês e Boro, ou seja, há maior correlação dessas sementes quando há aumento desses elementos na composição da semente. Para a semente de Piúma (S3), os elementos Chumbo e Alumínio possuem alta relação direta e o Cádmio, Cálcio, Sódio e Fósforo alta relação inversa, ou seja, há maior correlação entre as triplicatas da semente com a redução na concentração destes elementos.

Para a semente de Linhares (S5), os elementos Zinco e Molibdênio possuem alta relação inversa, enquanto para a semente de Cachoeiro de Itapemirim (S4), Níquel e Crômio possuem alta relação direta com as replicatas.

Alguns elementos possuem influências semelhantes ao conjunto de sementes, como o Sódio e Cálcio, aos quais também apresentam alta correlação direta entre si, ou seja, o aumento de um resulta no aumento do outro. Ademais, existem elementos que possuem correlação inversa entre si,

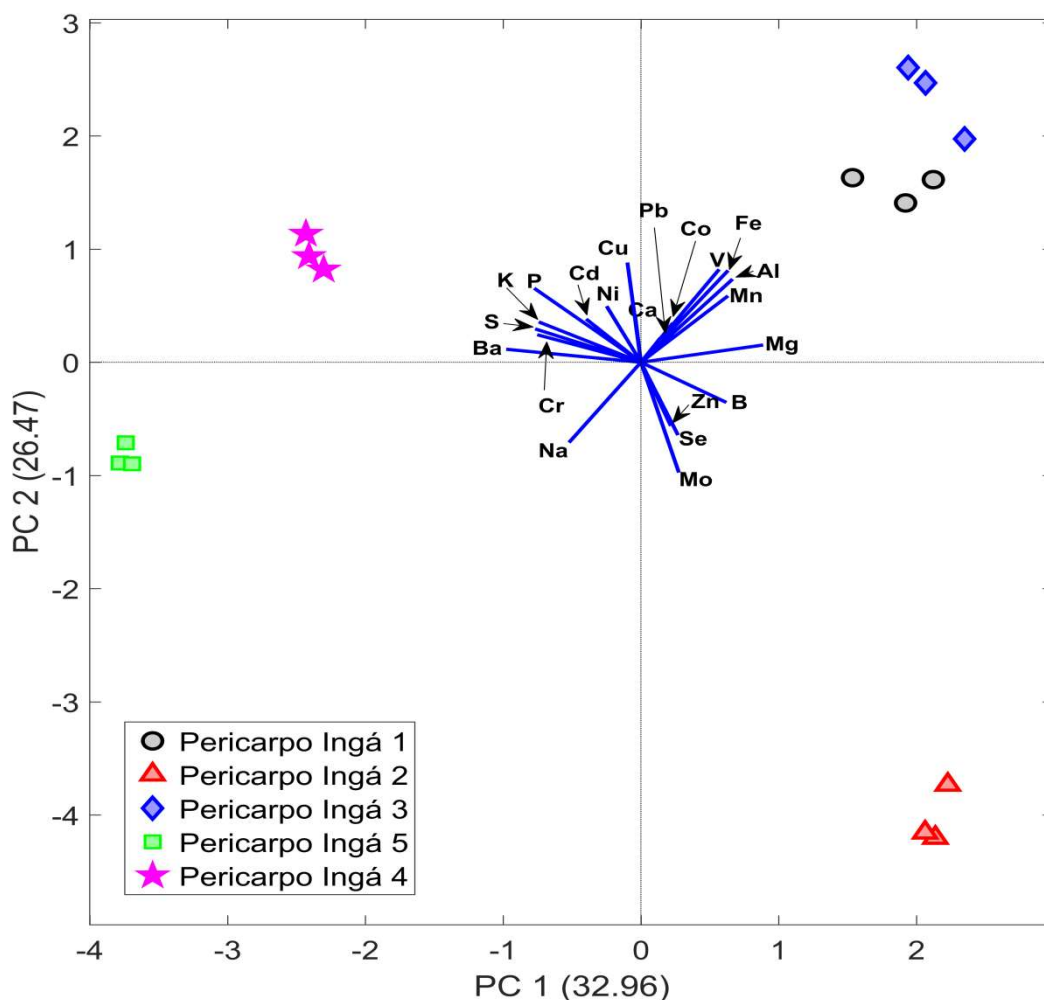
como o Manganês e Bário, onde a redução na concentração de um provoca um aumento médio do outro. Outros elementos quase não possuem correlações, são ortogonais, como é o caso do Manganês e do Cádmiio, os quais as alterações de um são indiferentes para o outro.



**Figura 2.** PCA (scores e loadings) dos elementos das sementes *Inga edulis* Martius distribuídas em três diferentes acessos do Espírito Santo. Os vetores em azul representam a contribuição do elemento para este gráfico. Piúma (S1, S2 e S3); Cachoeiro de Itapemirim (S4) e Linhares (S5).

O gráfico da PCA dos pericarpos *Inga edulis*, Figura 3, apresenta os agrupamentos das cinco amostras. O pericarpo de Piúma (P1 e P3) apresentam semelhanças e formam um agrupamento no primeiro quadrante (PC1 x PC2). Também nota-se a separação dos pericarpos de Piúma (P1, P2 e P3) das demais regiões, Cachoeiro de Itapemirim (P4) e Linhares (P5) por meio da PC1, com variância explicada de 32,96 %. Além disso, observa-se que cada quadrante da PCA possui um agrupamento, indicando a alta distinção entre os agrupamentos.

O agrupamento de Piúma (P1 e P3) estão fortemente ligados com o aumento de Ferro, Vanádio, Alumínio, Manganês e com a diminuição do Sódio. O pericarpo de Piúma (P2) apresenta influência positiva dos elementos Molibdênio, Zinco e Selênio e influencia inversa do Níquel. O pericarpo de Linhares (P5) sofre forte influência inversa do Manganês. O pericarpo de Cachoeiro de Itapemirim (P4) apresenta influência direta dos elementos Selênio, Potássio e Fósforo e inversa do Boro.



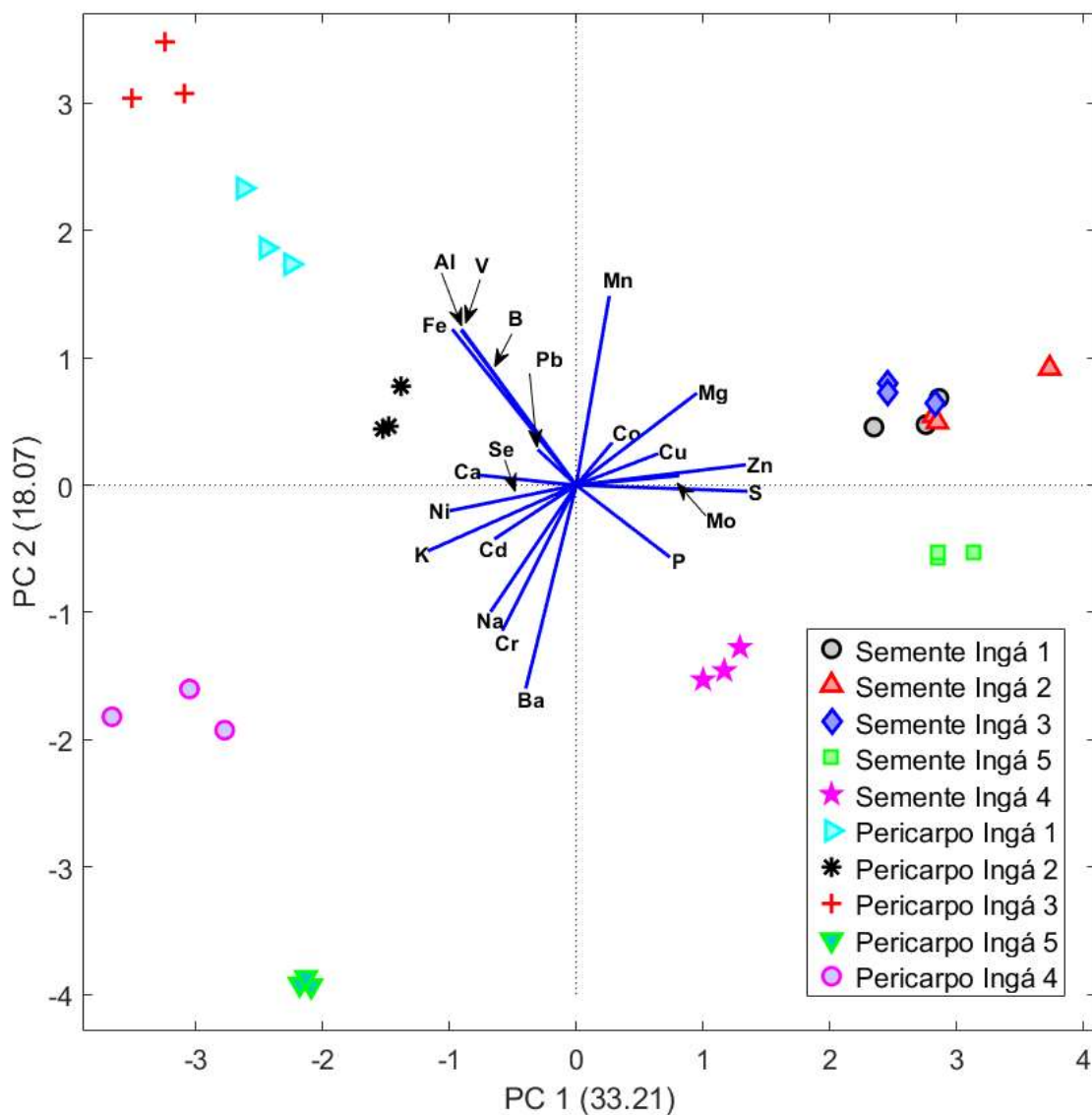
**Figura 3.** PCA (scores e loadings) dos elementos dos pericarpos de *Inga edulis* Martius distribuídas em três diferentes acessos do Espírito Santo. Os vetores em azul representam a contribuição do elemento para este gráfico. Piúma (P1, P2 e P3); Cachoeiro de Itapemirim (P4) e Linhares (P5).

O gráfico da PCA das sementes e dos pericarpos de *Inga edulis* Martius, Figura 4, apresenta sete agrupamentos distintos. A PC1 (variância explicada de 33,21 %) separa os pericarpos das sementes e a PC2 (variância de 18,07 %) separa os pericarpos e sementes da Região de Piúma (P1, P2, P3, S1, S2 e S3) das demais regiões, Cachoeiro de Itapemirim (P4 e S4) e Linhares (P5 e S5). As sementes de Piúma (S1, S2 e S3) apresentam-se em um agrupamento. As sementes de Cachoeiro de Itapemirim (S4) e Linhares (S5) também se apresentam em outros dois agrupamentos.

Os pericarpos da região de Piúma (P1, P2 e P3) possuem maior influência das mesmas variáveis, embora tenham sido agrupadas distintamente, sendo que Alumínio, Ferro e Vanádio influenciam diretamente e o Fósforo possui influência inversa. Em concordância com a PCA dos pericarpos, Figura 3, Ferro, Vanádio, Alumínio continuam influenciando diretamente.

Os pericarpos de Cachoeiro de Itapemirim (P4) apresentam alta influência direta do Cádmio e Potássio e influência inversa do Magnésio. Os pericarpos de Linhares (P5) sofrem influência direta do Sódio, Crômio e Bário e inversa do Manganês e Magnésio. Em concordância com a Figura 2, o Manganês continua influenciando inversamente.

As sementes de Piúma (S1, S2 e S3) estão no mesmo agrupamento e apresentam influência direta de Zinco, Molibdênio, Cobre e Magnésio e inversa de Cádmio, Níquel e Potássio. Comparando com a Figura 1, duas destas variáveis permanecem com alta influência (Zinco e Magnésio) e Cádmio continua exercendo influência inversa. A semente de Linhares (S5) apresenta influência positiva do Enxofre e inversa do Cádmio. A semente de Cachoeiro de Itapemirim (S4) apresenta influência direta de Fósforo inversa do Ferro, Alumínio e Vanádio.



**Figura 4.** PCA (scores e loadings) dos pericarpos e sementes de *Inga edulis* Martius distribuídas em três diferentes acessos do Espírito Santo. Os vetores em azul representam a contribuição do elemento para este gráfico. Piúma (P1, P2 e P3; S1, S2 e S3); Cachoeiro de Itapemirim (P4 e S4) e Linhares (P5 e S5).

**Tabela 7** – Teores de antocianinas, flavonoides, polifenóis, taninos e capacidade antioxidante dos pericarpos e sementes de frutos *Inga edulis* Martius.

Amostras	Antocianinas mg/g	Flavonoides mg/g	Polifenóis mg/g	Taninos mg/g	ABTS IR <sub>50</sub> (µg/g)	FRAP IR <sub>50</sub> (µg/g)	DPPH IR <sub>50</sub> (µg/g)	IAA
<b>P1</b>	36,38±4,65 <sup>a</sup>	12,34±0,00 <sup>b</sup>	49,72±2,32 <sup>b</sup>	32,60±2,52 <sup>b</sup>	120,50±2,93 <sup>c,d</sup>	63,68±1,85 <sup>d</sup>	175,60±5,83 <sup>e</sup>	Fraco
<b>P2</b>	30,62±9,63 <sup>a,b</sup>	12,34±0,00 <sup>b</sup>	30,56±0,83 <sup>C</sup>	24,18±0,92 <sup>C</sup>	130,50±4,50 <sup>c,d</sup>	46,20±0,09 <sup>d</sup>	144,20±4,66 <sup>e</sup>	Fraco
<b>P3</b>	14,20±3,63 <sup>b</sup>	27,64±1,65 <sup>a</sup>	5450±0,87 <sup>a</sup>	37,03±1,76 <sup>a</sup>	35,44±2,15 <sup>d</sup>	17,51±2,06 <sup>d</sup>	38,07±0,20 <sup>e</sup>	Forte
<b>P4</b>	17,81±5,55 <sup>b</sup>	13,30±1,65 <sup>b</sup>	2385±2,34 <sup>d</sup>	14,11±1,67 <sup>e</sup>	60,49±3,77 <sup>d</sup>	51,33±0,34 <sup>d</sup>	72,80±0,60 <sup>e</sup>	Moderado
<b>P5</b>	27,55±3,63 <sup>a,b</sup>	15,21±0,00 <sup>b</sup>	23,66±2,20 <sup>d</sup>	19,90±1,70 <sup>d</sup>	55,20±0,55 <sup>d</sup>	32,18±1,29 <sup>d</sup>	41,63±2,55 <sup>e</sup>	Forte
<b>S1</b>	15,67±3,46 <sup>b</sup>	12,34±2,87 <sup>b</sup>	31,32±2,38 <sup>c</sup>	14,04±0,82 <sup>e</sup>	827,00±69,29 <sup>b</sup>	487,20±47,66 <sup>b</sup>	1291,00±51,90 <sup>c</sup>	Muito fraco
<b>S2</b>	19,51±1,48 <sup>b</sup>	12,34±0,00 <sup>b</sup>	19,97±1,29 <sup>d</sup>	1,65±0,17 <sup>f</sup>	865,50±58,57 <sup>a,b</sup>	543,90±66,92 <sup>b</sup>	2316,00±107,90 <sup>a</sup>	Muito fraco
<b>S3</b>	13,44±1,42 <sup>b</sup>	17,12±1,65 <sup>b</sup>	12,69±0,70 <sup>e</sup>	1,06±0,03 <sup>f</sup>	976,70±107,20 <sup>a</sup>	719,90±47,32 <sup>a</sup>	562,00±30,81 <sup>d</sup>	Muito fraco
<b>S4</b>	11,90±1,68 <sup>b</sup>	14,25±1,65 <sup>b</sup>	10,53±0,77 <sup>e</sup>	2,58±0,13 <sup>f</sup>	201,40±13,33 <sup>c</sup>	162,00±3,55 <sup>c</sup>	1869,00±287,00 <sup>b</sup>	Muito fraco
<b>S5</b>	13,44±1,42 <sup>b</sup>	14,25±1,65 <sup>b</sup>	11,23±0,76 <sup>e</sup>	2,18±0,19 <sup>f</sup>	243,80±24,52 <sup>c</sup>	176,40±4,60 <sup>c</sup>	329,70±17,95 <sup>d,e</sup>	Fraco
<b>QE</b>					11,36±0,34	8,90±0,19	49,85±4,97	Fraco

Resultados expressos como a média ± DP\* para triplicados. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas (p < 0,05). QE: quercetina.\* DP: desvio padrão. IR<sub>50</sub> – concentração que reduz 50% dos radicais livres. IAA: índice de atividade antioxidante para o DPPH, segundo Scherer e Godoy, (2009).

Todas as amostras de *Inga edulis* Martius analisadas (pericarpos e sementes) apresentaram presença de antocianinas, flavonoides, polifenóis totais e taninos (Tabela 7). Rydlewski et al. (2017) avaliando sementes de *I. edulis*, não identificaram presença de antocianinas, ao contrário do presente estudo. As amostras com maiores teores de antocianinas foram os pericarpos de Piúma (P1, P2) e Linhares (P5) (Tabela 7). A presença de antocianinas e flavonoides pode explicar a maior atividade antioxidante nos ensaios de ABTS, FRAP e DPPH (Tabela 7).

Os polifenóis são compostos fitoquímicos bem conhecidos encontrados em muitas plantas e compartilham efeitos benéficos contra uma ampla variedade de patologias, incluindo inflamação, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (Furlan & Rodrigues, 2016). Dentre as amostras analisadas, os pericarpos de Piúma (P1 e P3) apresentaram maior teor de polifenóis entre as amostras estudadas e maiores que o descrito para cascas de *Inga edulis* ( $48,3 \pm 1,8$  mg / g) (Souza et al., 2008). Como esperado, os maiores valores de taninos são das amostras P1 e P3.

Os teores de flavonoides presentes nas sementes das amostras analisadas (Tabela 7) são superiores aos valores descritos anteriormente por (Rydlewski et al., 2017) para sementes da mesma espécie, *Inga edulis* ( $2,59 \pm 0,69$  mg / g). Plantas contendo flavonoides têm sido relatadas como possuindo fortes atividades antioxidantes (Badami et al., 2003). Além, dos flavonoides possuírem um valor terapêutico devido às suas propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas e ao potencial de diminuir as complicações cardiovasculares (Chang et al., 2006).

A determinação do efeito de eliminação de ERO pelos antioxidantes é importante, pois os radicais livres produzidos através do metabolismo podem estar associados ao aparecimento do câncer e outras doenças crônicas. Na determinação da atividade antioxidante, foram utilizados os seguintes métodos, sequestro dos radicais ABTS e DPPH e capacidade de redução do ferro – FRAP. A amostra do pericarpo de Piúma (P3) foi a que apresentou melhor atividade nos três métodos (ABTS:  $35,44 \pm 2,15$   $\mu$ g / mL; FRAP:  $17,51 \pm 2,06$   $\mu$ g / mL e DPPH:  $38,07 \pm 0,20$   $\mu$ g / mL;). Foi também, a amostra que



apresentou maior concentração de flavonoides, polifenóis e taninos. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os extratos de *Inga edulis* possuem capacidade de atuar como antioxidante, prevenindo o estresse oxidativo que acarretará em possíveis distúrbios (Birasuren et al., 2013).

**Tabela 8** - Compostos químicos identificados pelo ESI (-) FT-ICR MS das sementes de frutos *Inga edulis* Martius.

	m/z mensurado	m/z teórico	Fórmula Molecular [M-H] <sup>-</sup> ou [M+Cl] <sup>-</sup>	DBE	Erro (ppm)	Sementes Ingá					Constituinte proposto	Referência
						S1	S2	S3	S4	S5		
<b>1</b>	188.03527	188.03532	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>	8	0.24	ND	ND	D	ND	ND	Ácido quinurênico	Marchi, 2007
<b>2</b>	225.11323	225.11323	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub>	4	0.01	D	ND	ND	ND	ND	Ácido tuberônico	Oudjedi, 2018
<b>3</b>	279.23294	279.23295	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	3	0.05	ND	ND	ND	ND	D	Ácido linoleico	Pang, 2018
<b>4</b>	341.10892	341.10894	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2	0.12	D	ND	ND	ND	D	Sacarose	Elliott, 2002
<b>5</b>	371.13479	371.13476	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub>	6	-0.08	D	ND	ND	ND	ND	Seringina	Ramsewak, 1999
<b>6</b>	377.08563	377.08512	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> ClO <sub>11</sub>	1	-0.04	D	D	D	D	ND	Sacarose / Cl	

\*DBE: número de instauração da molécula

\*\*ND: não detectado

\*\*\*D: detectado

**Tabela 9** - Compostos químicos identificados pelo ESI (-) FT-ICR MS dos pericarpos de frutos *Inga edulis* Martius.

	m/z mensurado	m/z teórico	Fórmula Molecular [M-H] <sup>-</sup> ou [M+Cl] <sup>-</sup>	DBE	Erro (ppm)	Pericarpos Ingá					Constituinte proposto	Referência
						PI1	P2	P3	P4	P5		
<b>1</b>	165.04043	165.04046	C <sub>5</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>	1	0.18	ND	ND	ND	D	ND	Arabonic acid	Clauß, 2011
<b>2</b>	179.05613	179.05611	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	1	-0.09	ND	ND	D	ND	ND	Frutose ou glicose	Kill, 2016
<b>3</b>	191.05617	191.05611	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	2	-0.47	ND	ND	D	ND	ND	Ácido quínico	Kill, 2016
<b>4</b>	191.01972	191.01973	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	3	0.02	ND	ND	ND	D	ND	Ácido cítrico	Mocan, 2018
<b>5</b>	205.03531	205.03538	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	3	0.30	ND	ND	ND	ND	D	Homocitricacid	Altieri, 2008
<b>6</b>	255.23286	255.23295	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	1	0.35	ND	ND	ND	ND	D	n-Hexadecanoicacid	Parthasarathy, 2019
<b>7</b>	285.06153	285.06159	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	6	0.23	ND	ND	ND	ND	D	Uralenneoside	De Cerio, 2017
<b>8</b>	341.10894	341.10894	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2	0.12	ND	ND	D	D	D	Sacarose	Kill, 2016
<b>9</b>	377.08585	377.08561	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> ClO <sub>11</sub>	1	-0.64	ND	ND	ND	D	D	Sacarose / Cl	
<b>10</b>	521.17224	521.17232	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>11</sub>	2	0.15	ND	ND	ND	ND	D	Aduto sacarose e glicose	
<b>11</b>	683.22507	683.22515	C <sub>24</sub> H <sub>43</sub> O <sub>22</sub>	3	-0.31	ND	ND	ND	ND	D	Aduto sacarose e sacarose	
<b>12</b>	719.20185	719.20350	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> ClO <sub>22</sub>	2	-0.04	D	D	ND	D	D	Aduto sacarose, sacarose e Cl	

\*DBE: número de instauração da molécula

\*\*ND: não detectado

\*\*\*D: detectado

Foram identificados 6 moléculas presentes nas amostras de sementes (Tabela 8). O composto 1, íon  $[C_{10}H_6NO_3]^-$  de  $m/z$  188 foi identificado como Ácido quinurênico (Marchi et al., 2007). Essa molécula apresenta atividades biológicas comprovadas na literatura, tais como: propriedades fisiológicas no sistema nervoso central, incluindo propriedades antioxidantes, além de suprir as respostas imunológicas antitumorais e promover a sobrevivência e a mutabilidade das células tumorais através da interação com o hidrocarboneto de arila (AhR) de uma maneira autócrina ou parácrina (Qi et al., 2014). O composto 2, íon  $[C_{12}H_{17}O_4]^-$  de  $m/z$  225, foi identificado como Tuberonic acid, este composto foi identificado em folhas de sálvia e de louro da Argélia (Oudjedi et al., 2018). O composto 3, íon  $[C_{18}H_{31}O_2]^-$  de  $m/z$  279, foi identificado como Ácido linoleico (Pang et al., 2018). Um isômero do ácido linoleico, o ácido linoleico conjugado (CLAN), se destaca por apresentar efeitos benéficos a saúde, tais como, efeitos anticarcinogênico, redução na deposição de gordura corporal, estimulação da função imune, atividade antioxidante e redução da glicose sanguínea (Fuke et al., 2014; Santos-Zago et al., 2008). O composto 4, íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$  de  $m/z$  341, foi identificado como sacarose, o composto 5, íon  $[C_{17}H_{23}O_9]^-$  de  $m/z$  371, foi identificado como Seringina (Ramsewak et al., 1999), dentre as suas propriedades podemos destacar a eliminação de radicais livres, inibição da apoptose, efeito antidiabético e anti-inflamatório (Rao US et al., 2015) e o composto 6, íon  $[C_{12}H_{22}ClO_{11}]^-$  de  $m/z$  377, foi identificado como um aduto de sacarose e cloro.

Nas amostras de pericarpo de *Inga edulis* Martius, foram identificados 12 compostos (Tabela 9). O composto 1, íon  $[C_5H_{19}O_6]^-$  de  $m/z$  165 foi identificado como arabonic acid, encontrado na amostra P4, o composto 2, íon  $[C_6H_{11}O_6]^-$  de  $m/z$  179, foi identificado como frutose ou glicose, o composto 3, íon  $[C_7H_{11}O_6]^-$  de  $m/z$  191, foi identificado como ácido quínico, ambos presentes na amostra P3, o composto 4, íon  $[C_6H_7O_7]^-$  de  $m/z$  191, foi identificado como ácido cítrico, presente na amostra P4. O composto 5, íon  $[C_7H_9O_7]^-$  de  $m/z$  205, foi identificado como homocitric acid, o composto 6, íon  $[C_{16}H_{31}O_2]^-$  de  $m/z$  255, identificado como hexadecanoic acid e o composto 7, íon  $[C_{12}H_{13}O_8]^-$  de  $m/z$  285 foi identificado como uralenneoside, encontram-se presentes na amostra P5.

O composto 8, íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$  de  $m/z$  341, foi identificado como Sacarose, presente nas amostras P3, P4 e P5. O composto 9, íon  $[C_{12}H_{22}ClO_{11}]^-$  de  $m/z$  377, foi identificado como aduto de sacarose e cloro, presente nas amostras P4 e P5. O composto 10, íon  $[C_{18}H_{33}O_{11}]^-$  de  $m/z$  521, foi identificado como aduto sacarose e glicose e o composto 11, íon  $[C_{24}H_{43}O_{22}]^-$  de  $m/z$  683, foi identificado como aduto sacarose e encontra-se presente na amostra P5, e o composto 12, íon  $[C_{24}H_{44}ClO_{22}]^-$  de  $m/z$  719, foi identificado como aduto sacarose, sacarose e cloro e encontra-se presente nas amostras P1, P2, P3, P4 e P5.

**Tabela 10** – Determinação da citotoxicidade por sulforodamina B (SRB).

O ensaio SRB é adotado pelo Instituto Nacional do Câncer para avaliações em larga escala e descoberta de novas drogas antitumorais (NCI, 2015). Consiste em um método colorimétrico adequado para a avaliação da viabilidade celular (Houghton et al., 2007).

Linhagem celular (2x10 <sup>4</sup> /mL, 72h) IC <sub>50</sub> ±DV (µg / mL)				
Amostras	EA,hy926	L929	MCF7	OVACR-3
P1	>50	>50	>50	>50
P2	>50	>50	>50	>50
P3	>50	>50	>50	>50
P4	>50	>50	>50	>50
P5	>50	>50	>50	>50
S1	1,54±0,02	>50	>50	>50
S2	>50	>50	>50	>50
S3	<12,5	>50	<12,5	>50
S4	<12,5	>50	<12,5	>50
S5	14,95±8,24	>50	>50	>50

\*IC<sub>50</sub>: concentração que inibe 50% do crescimento celular (µg/mL). \*\*DV: desvio padrão

A viabilidade celular *in vitro* das amostras foi analisada em diferentes concentrações e em diferentes linhagens celulares: EA,hy926 (endotelial – não cancerosa), L929 (fibroblastos – não cancerosa), MCF-7 (câncer de mama humano - cancerosa) e OVCAR-3 (ovário humano - cancerosa). As amostras

P1 a P5 e a S2 na linhagem, EA,hy926 (endotelial), não apresentaram citotoxicidade na concentração avaliada. Na linhagem L929 (fibroblastos) e na OVCAR-3 (ovário humano), nenhuma das amostras apresentou citotoxicidade. Na linhagem MCF-7 (câncer de mama humano), apenas as amostras S3 e S4 apresentaram citotoxicidade.

**Tabela 11** - Atividade quimiopreventiva dos pericarpos e sementes dos frutos *Inga edulis* Martius.

Amostras	NO (% inibição da síntese de iNOs)	NF-κB (% inibição)	Quinona redutase (IR)
P1	48,09±4,30 <sup>a</sup>	31,60±5,50 <sup>a</sup>	1,00±0,00
P2	56,03±4,36 <sup>a</sup>	27,30±1,04 <sup>a</sup>	1,00±0,00
P3	51,80±4,72 <sup>a</sup>	40,44±7,80 <sup>a</sup>	1,00±0,00
P4	54,27±6,09 <sup>a</sup>	37,00±5,90 <sup>a</sup>	1,00±0,00
P5	50,82±2,60 <sup>a</sup>	28,62±5,40 <sup>a</sup>	1,00±0,00
S1	57,03±6,70 <sup>a</sup>	35,00±0,60 <sup>a</sup>	1,00±0,00
S2	50,27±2,84 <sup>a</sup>	24,84±4,12 <sup>a</sup>	1,00±0,00
S3	51,40±4,27 <sup>a</sup>	32,32±11,50 <sup>a</sup>	1,00±0,00
S4	50,77±0,32 <sup>a</sup>	32,50±3,70 <sup>a</sup>	1,00±0,00
S5	48,75±3,19 <sup>a</sup>	30,80±3,90 <sup>a</sup>	1,00±0,00

Resultados expressos como a média ± DP para triplicados. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). \*DP: desvio padrão.

Para determinar o potencial quimiopreventivo, vários bioensaios *in vitro* de curto prazo foram realizados (Tabela 11).

No estágio inicial da carcinogênese a indução da enzima NAD(P)H: quinona redutase (QR) pode oferecer proteção contra espécies químicas tóxicas e reativas (Pezzuto et al., 2005). Portanto, a enzima NAD(P)H é considerada um importante biomarcador de quimioprevenção. Para avaliar a atividade quimiopreventiva das amostras de *Inga edulis* Martius, foi avaliada sua capacidade de indução da QR. As amostras analisadas não induziram a QR (Tabela 11).

As amostras analisadas mostraram-se ativas para inibição da síntese de óxido nítrico (iNOs), em macrófagos RAW264.7, com porcentagens média de 51,92 %, (Tabela 11). Yang et al, (2009) demonstraram que dos 260 extratos

testados de diferentes plantas, 122 extratos apresentaram atividade inibitória potente, acima de 25% em relação à produção de NO.

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é responsável pelas respostas inflamatórias e imunes, possui uma ação preventiva de câncer quando sua inibição ocorre acima de 50 %. Considera-se que os agentes quimiopreventivos de câncer devam ser capazes de atuar de forma específica na inibição do NF- $\kappa$ B, sendo assim, os extratos podem ser considerados como inibidores leves do NF- $\kappa$ B (Tabela 11). A regulação incorreta de NF- $\kappa$ B tem sido ligado ao cancro, doenças inflamatórias, auto-imunes e infecção viral (Pal et al., 2014).

## 5.CONCLUSÃO

Os pericarpos e as sementes dos frutos de *Inga edulis* Martius possuem alto teor de carboidratos, quantidades significativas de proteínas, e baixo teor de lipídeos. Os dados apresentados neste estudo mostraram que os extratos de *I. edulis* avaliados apresentaram diferentes composições de polifenóis, flavonóides e antocianinas. Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, todos os extratos apresentam expressiva atividade antioxidante. A amostra do pericarpo de Piúma (P3) apresenta elevada atividade antioxidante nos métodos ABTS, FRAP e DPPH, demonstrando que possui capacidade de atuar como antioxidante. Os dados por ESI (-) FT-ICR MS foi possível identificar compostos presentes nas amostras analisadas. Compostos estes, que possuem atividades biológicas importantes para a saúde humana, tais como: antioxidante, anticarcinogênica e anti-inflamatória. A partir da análise por componentes principais (PCA) foi possível identificar tendências que discriminem os pericarpos e sementes. As sementes de Piúma (S1, S2 e S3) apresentaram maior concentração média dos metais: zinco, molibdênio, cobre e magnésio e menor concentração média de níquel e potássio. O chumbo presente nas amostras está dentro do padrão aceitável pela Organização Mundial de Saúde. Os pericarpos e sementes avaliadas neste trabalho mostraram efeito de quimioprevenção por inibição da produção de óxido nítrico (NO) em células estimuladas por LPS e inibição leve do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B ativado. Tais resultados indicam que as amostras analisadas apresentam

propriedades antioxidantes e quimiopreventivas que poderão ser utilizadas como possíveis agentes supressores da carcinogênese.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## REFERENCIAS

- Abud, H. F., Araujo, R. F., Pinto, C. M. F., Araujo, E. F., Araujo, A. V., & Santos, J. A. dos. (2018). Caracterização morfológica dos frutos de pimentas malagueta e biquinho. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 8(2), 29–39.
- Altieri, M. A., & Nicholls, C. I. (2011). O potencial agroecológico dos sistemas agroflorestais na América Latina. *Agriculturas*, 8(2), 31–34.
- AOAC. Official Methods of Analysis. (2016). Gaithersburg, Maryland, USA. International. 20 ed.
- Arévalo-Pinedo, A., Santos, F. L. dos, Arévalo, Z. D. S., Zuniga, A. D. G., & Pinedo, R. A. (2006). Desorption isotherms for murici (*Byrsonima sericea*) and inga (*Inga edulis*) pulps. *Journal of Food Engineering*, 76, 611–615. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.011>
- Avila, P. E. A., Murrieta, M. S. V., Hernández, M. O. F., & Cortéz, M. del S. L. (2016). Relationship between the elemental composition of grapeyards and bioactive compounds in the Cabernet Sauvignon grapes *Vitis vinifera* harvested in Mexico. *Food Chemistry*, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.future.2016.12.038>
- Badami, S., Gupta, M. K., & Suresh, B. (2003). Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 85, 227–230. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00021-7)
- Balaji, M., Chandrasekaran, D., Ravi, R., Purushothaman, M. R., & Pandiyan, V. (2013). Chemical composition of decorticated tamarind seed meal. *Indian Journal of Poultry Science*, 48(1), 33–36.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 76, 70–76.



- Birasuren, B., Kim, N. Y., Jeon, H. L., & Kim, M. R. (2013). Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of *agriophyllum pungens* seed extracts from Mongolia. *Preventive Nutrition and Food Science*, 18(3), 188–195. <https://doi.org/10.3746/pnf.2013.18.3.188>
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants : Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342–346.
- Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., & Liu, Y. C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.061>
- Cidin, A. C., Corrêa, F. L. de O., Pequeno, P. L. L., Almeida, C. M. V. C. de, Muller, M. W., Macedo, R. G. de, & Gama-Rodrigues, A. C. (2014). Avaliação da Fertilidade do Solo em Sistema Agroflorestal. *ResearchGate*, 21(1), 65–72.
- Costa Júnior, J. S., Ferraz, A. B. F., Sousa, T. O., Silva, R. A. C., Lima, S. G. De, Feitosa, C. M., ... Saffi, J. (2012). Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart . Seed. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00924.x>
- Coutinho, P. N., Pereira, B. P., Pereira, A. C. H., Porto, M. L., Assis, A. L. E. M. de., Destefani, A. C., Pereira, T. M. C. (2017). Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.06.008>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural Products: A continuing source of novel drug leads. *National Institutes Of Health*, (6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008.NATURAL>
- de Almeida, A.-A. F., & Valle, R. R. (2007). Ecophysiology of the cacao tree. *Review*, 19(4), 425–448. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400011>
- De Amorim, L. D. M., De Sousa, L. de O. F., Oliveira, F. F. M., Camacho, R. G. V., & De Melo, J. I. M. (2016). Fabaceae na Floresta Nacional (FLONA) de Assú, semiárido potiguar, nordeste do Brasil. *Rodriguesia*, 67(1), 105–123. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667108>
- Dias, A. L. de S., Souza, J. N. S. de, & Rogez, H. (2010). Enriquecimento de Compostos Fenólicos de Folhas de *Inga edulis* por Extração em Fase Sólida: Quantificação de seus Compostos Majoritários e Avaliação da Capacidade Antioxidante. *Química Nova*, 33(1), 38–42.

- Ebrahim, A. M., Eltayeb, M. H., Khalid, H., Mohamed, H., Abdalla, W., Grill, P., & Michalke, B. (2012). Study on selected trace elements and heavy metals in some popular medicinal plants from Sudan. *Journal of Natural Medicines*, 66, 671–679. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0630-6>
- Falcão, M. de A., & Clemente, C. R. (2000). Fenologia e produtividade do ingá-cipó (*Inga edulis*) na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 30(2), 173–180.
- Fuke, G., Novack, M. M. E., Cauduro, L., & Nornberg, J. L. (2014). Eficácia do ácido linoléico conjugado (CLA) na saúde humana. *Revista Do Centro Do Ciências Naturais e EXatas-UFSM*, 18, 36–46.
- Funari, C. S., & Ferro, V. O. (2005). Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 178–182. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2005000200018>
- Furlan, A. da S., & Rodrigues, L. (2016). Consumo de polifenóis e sua associação com conhecimento nutricional e atividade física. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 22(6), 461–464. <https://doi.org/10.1590/1517-869220162206163766>
- Gama-Rodrigues, A. C., & Willy, M. M. (2012). Sistemas Agroflorestais com Cacaueiro. *ResearchGate*, 1–22.
- Gengaihi, S. El, Ella, F. M. A., Shalaby, E., & Doha, H. (2014). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Different Grape Wastes. *Journal of Food*, 5(2), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000296>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1–13.
- Gondim, J. A. M., Moura, M. D. F. V., Dantas, A. S., Medeiros, R. L. S., & Santos, K. M. (2005). Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 825–827.
- Homhual, S., Bunyaphatsara, N., Kondratyuk, T., Herunsalee, A., Chaukul, W., Pezzuto, J. M., ... Zhang, H. (2006). Bioactive dammarane triterpenes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza* L. *Journal of Natural Products*, 69, 421–424.
- Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. J., & Lee, C. C. (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 42(4), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.003>
- Krepesky, P. B., Isidório, R. G., Filho, J. D. de S., Côrtes, S. F., & Braga, F. C. (2012). Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine*, 19, 953–957.

- Leite, P. B., Maciel, L. F., Opretzka, L. C. F., Soares, S. E., & Bispo, E. da S. (2013). Compostos fenólicos , metilxantinas e atividade antioxidante em massa de cacau e chocolates produzidos a partir de cultivarews resistentes e não resistentes a “vassoura de bruxa.” *Ciências Agrotécnica*, 37(3), 244–250.
- Lim, T. . (2012). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*.
- Marchi, I., Rebelo, R. A., & Fernandes, F. A. (2007). Artigo, 30(4), 763–767.
- Mourão Júnior, M., & Souza Filho, A. P. . (2010). Diferenças no padrão da atividade alelopática em espécies da Família Leguminoae. *Sociedade Brasileira Da Ciência Das Plantas Daninhas*, 28, 939–951.
- Nascimento Junior, B. J., Tinel, L. O., Rodrigues, L. . A., Freitas, T. O. N., Nunes, X. P., & Amorim, E. L. C. (2016). Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil . *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 18(1), 57–66. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_031](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_031)
- Nascimento, R. S. M., Cardoso, J. A., & Coccozza, F. D. M. (2014). Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes ) no oeste da Bahia. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Amiental*, 18(8), 856–860.
- NCI - Instituto Nacional do Câncer (2015). Disponível em: <http://www.cancer.gov.br/about-cancer/what-is-cancer>. Acesso em março de 2019.
- Ohira, T., Peacock, J. M., Iso, H., Chambless, L. E., Rosamond, W. D., & Folsom, A. R. (2009). Serum and Dietary Magnesium and Risk of Ischemic Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *American Journal of Epidemiology*, 169(12), 1437–1444. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp071>
- Oudjedi, K., Manso, S., Nerin, C., Hassissen, N., Zaidi, F., & Zaidi, F. (2018). New active antioxidant multilayer food packaging films containing Algerian Sage and Bay leaves extracts and their application for oxidative stability of fried potatoes. *Food Control*, 1–46.
- Pal, S., Bhattacharjee, A., Ali, A., Mandal, N. C., Mandal, S. C., & Pal, M. (2014). Chronic inflammation and cancer: Potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 11(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-11-23>
- Paludo, R., & Costabeber, J. A. (2012). Sistemas agroflorestais como estratégia de desenvolvimento rural em diferentes biomas brasileiros. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 7(2), 63–76.

- Pang, W., Liu, S., He, F., Li, X., Saira, B., Zheng, T., ... Pei, X. (2018). Anticancer activities of *Zanthoxylum bungeanum* seed oil on malignant melanoma. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.012>
- Park, K. J. & Antônio, C. G. Análise de materiais biológicos. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. Disponível em: <http://www.passeidireto.com/arquivo/2755114/analise-de-materiais-biologicos>. Acesso em 12 de abril de 2019.
- Park, E., Kondratyuk, T. P., Morrell, A., Kiselev, E., Conda-sheridan, M., Cushman, M., ... Pezzuto, J. M. (2011). Induction of Retinoid X Receptor Activity and Consequent Upregulation of p21 WAF1/CIP1 by Indenoisoquinolines in MCF7 Cells. *Cancer Prevention Research*, 4(April), 592–607. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0004>
- Perin, L., & Zanardo, V. P. S. (2013). Alimentos Funcionais : Uma Possível Proteção Para O Desenvolvimento Do Cancer. *Perspectiva*, 37(137), 93–101.
- Pezzuto, J. M., Kosmeder II, J. W., Park, E.-J., Lee, S. K., Guendet, M., Gills, J., ... Kinghorn, D. (2005). Characterization of Natural Product Chemopreventive Agents. *Cancer Chemoprevention*, 2, 3–37.
- Qi, Y., Li, S., Pi, Z., Song, F., Lin, N., Liu, S., & Liu, Z. (2014). Metabonomic study of adjuvant-induced arthritis in rats using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 11–19. <https://doi.org/10.1039/c4mb00131a>
- Rabi, T., & Bishayee, A. (2009). Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115, 223–239. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0118-y>
- Ramsewak, R. S., Nair, M. G., DeWitt, D. L., Mattson, W. G., & Zasada, J. (1999). Phenolic glycosides from *Dirca palustris*. *Journal of Natural Products*, 62, 1558–1561. <https://doi.org/10.1021/np9903595>
- Rao US, M., Zin, T., Abdurrazakb, M., & Ahmad, B. A. (2015). Chemistry and pharmacology of syringin, a novel bioglycoside: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(3), 20–25.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237.
- Rossi, S. P., Windschuetl, S., Matzkin, M. E., Rey-ares, V., Terradas, C., Ponzio, R., ... Frungieri, M. B. (2016). Reactive oxygen species (ROS) production triggered by prostaglandin D2 (PGD2) regulates lactate dehydrogenase (LDH) expression/activity in TM4 Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2, 1–46. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.021>.This

- Rydlewski, A. A., Morais, D. R. De, Rotta, E. M., Claus, T., Vagula, J. M., Cristina, M., ... Visentainer, J. V. (2017). Bioactive compounds , antioxidant capacity , and fatty acids in different parts of four unexplored fruits. *Journal of Food Quality*, 1–9.
- Santos-Zago, L. F., Botelho, A. P., & Oliveira, A. C. de. (2008). Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. *Revista de Nutrição*, 21(2), 195–221. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732008000200008>
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index ( AAI ) by the 2 , 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Silva, E. M., Pompeu, D. R., Larondelle, Y., & Rogez, H. (2007). Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. *Separation and Purification Technology*, 53, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.07.012>
- Silva, E. M., Souza, J. N. . S., Rogez, H., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (2007a). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012–1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055>
- Silva, L. L., Gomes, B. S., Sousa-Neto, B. P., Oliveira, J. P. C., Ferreira, E. L. F., Chaves, M. H., & Oliveira, F. A. (2012). Effects of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in a mouse model of pruritus. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.023>
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... Boyd, M. R. (2007). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>
- Souza, J. N. S., Silva, E. M., da Silva, M. N., Arruda, M. S. P., Larondelle, Y., & Rogez, H. (2007). Identification and Antioxidant Activity of Several Flavonoids of *Inga Edulis* Leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(6), 1276–1280.
- Souza, J. N. S., Silva, E. M., Loir, A., Rees, J.-F., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2008). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chemistry*, 106, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.011>
- Sporn, M. B., & Suh, N. (2000). Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 525–530.
- Subramani, R., Narayanasamy, M., & Feussner, K.-D. (2017). Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *Biotech*, 7(172), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0848-9>

- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Vieira Filho, J. E. R., & Silveira, J. M. F. J. da. (2012). Mudança tecnológica na agricultura: uma revisão crítica da literatura e o papel das economias de aprendizado. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 50(4), 721–742. <https://doi.org/10.1590/s0103-20032012000400008>
- Wu, C.-D., Kuo, Y.-S., Wu, H.-C., & Lin, C.-T. (2011). MicroRNA-1 induces apoptosis by targeting prothymosin alpha in nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of Biomedical Science*, 1–10.
- Yang, E. J., Yim, E. Y., Song, G., Kim, G. O., & Hyun, C. G. (2009). Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(4), 245–249. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0022-2>
- Zeni, A. L. B., Parisotto, A. V., Mattos, G., & Helena, E. T. de S. (n.d.). Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau , Santa Catarina , Brasil. *Temas Livres*, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1413-81232017228.18892015>