



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**Valor nutricional, perfil de compostos bioativos e atividade antioxidante de
genótipos de açaí (*Euterpe oleracea*)**

PRISCILA DO CARMO MARCHIORO RAUPP TORMA

Porto Alegre

2016

PRISCILA DO CARMO MARCHIORO RAUPP TORMA

**Valor nutricional, perfil de compostos bioativos e atividade antioxidante de
genótipos de açaí (*Euterpe oleracea*)**

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

Orientador: Prof.º Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Co-orientadora: Prof.ª Dra. Paula Rossini Augusti

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Torma, Priscila do Carmo Marchioro Raupp

Valor nutricional, perfil de compostos bioativos e atividade antioxidante de genótipos de açaí (Euterpe oleracea) / Priscila do Carmo Marchioro Raupp Torma. -- 2016.

131 f.

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Coorientador: Paula Rossini Augusti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Açaí. 2. Antocianinas. 3. Carotenoides. 4. Antioxidantes. 5. Melhoramento genético. I. Rios, Alessandro de Oliveira, orient. II. Augusti, Paula Rossini, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autor: Priscila do Carmo Marchioro Raupp Torma (Engenheira de Alimentos/UNISINOS)

Título da dissertação: Valor nutricional, perfil de compostos bioativos e atividade antioxidante de genótipos de açaí (*Euterpe oleracea*)

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

Aprovada em: ____/____/____

Homologada em: ____/____/____

Pela banca examinadora:

Por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Orientador
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dra. Rosane Rech
Coordenadora
PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dra. Paula Rossini Augusti
Co-orientadora
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor
ICTA/UFRGS

Banca: Prof. Dra. Juliane Elisa Welke
Doutora em Química - UFRGS
PPGCTA/UFRGS

Banca: Prof^a. Dr^a. Vanuska Lima da Silva
Doutora em Ciências dos Alimentos - USP
Professora Adjunta - UFRGS

Banca: Prof^a. Dr^a. Greicy Marafiga Conterato
Doutora em Bioquímica Toxicológica - UFSM
Professora Adjunta - UFSC

AGRADECIMENTOS

O meu maior agradecimento a Deus, que me direciona pelas estradas da vida e que me dá forças todos os dias para seguir o caminho do aprendizado e progresso.

Aos meus pais, Nelson e Cleide, que sempre se dedicaram e fizeram o seu melhor com amor e compreensão. Também agradeço aos meus queridos irmãos Marcelo e Rodrigo, pelos momentos de parceria, diversão e amor.

Agradeço de forma muito especial a meu esposo Adilson, que sempre esteve ao meu lado, com seu amor, compreensão, respeito, companheirismo e que transformou minha vida com o presente da maternidade. Também agradeço à minha filha Helena, que com seu jeitinho meigo, diz que tem orgulho de sua mãe. Amo demais essa família que estou aprendendo a construir a cada dia.

Aos meus familiares e amigos que com paciência e compreensão auxiliam nas idas e vindas do dia a dia. Aos meus amigos da família Novo Amanhecer que com amor, caridade e fé transformam minha vida e trazem leveza para os momentos angustiosos. Michele, você tem participação especial e fundamental nesta etapa.

Aos meus colegas do Laboratório de Compostos Bioativos (Laboratório 211), que com o passar do tempo se transformaram em amigos. Muitas lembranças ficarão guardadas em meu coração.

Ao meu orientador Alessandro, obrigada pelo apoio e auxílio em todos os momentos. Também a minha querida co-orientadora Paula, por toda a dedicação do início ao fim e pelas palavras de apoio e motivação. Agradeço também as dicas da professora Simone. Vocês são profissionais modelos que inspiram os apaixonados pela pesquisa e docência; e me auxiliaram muito no meu processo de desenvolvimento pessoal e profissional.

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição para esse trabalho.

Ao apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) para a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de concluir esta etapa em um curso de tamanha excelência.

Por final quero agradecer a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente me auxiliaram; e torceram por mim em mais esta conquista!

*Para dias bons: sorrisos
Para dias ruins: paciência
Para todos os dias: fé*

RESUMO

O açai (*Euterpe oleracea*) é um fruto proveniente do açazeiro, uma palmeira nativa da Amazônia Brasileira, considerado uma “superfruta” devido ao seu alto valor nutricional, com destaque para as antocianinas, associadas a efeitos benéficos à saúde. Uma vez que genótipos de frutos desenvolvidos por programas de melhoramento têm sido avaliados a fim de identificar frutos com composição fitoquímica melhorada e potencial antioxidante, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do melhoramento genético na composição química, perfil de compostos bioativos e atividade antioxidante de seis genótipos de açai (*E. oleracea*). Análises de composição química, perfil de antocianinas e carotenoides e de atividade antioxidante em diversos sistemas *in vitro* (método ABTS, oxidação da glutathione, teste da desoxirribose e células SH-SY5Y) foram realizadas em 6 genótipos e 1 amostra comercial utilizada como padrão. Com relação a composição química, de maneira geral, os genótipos apresentaram elevados teores de lipídeos (36,30 – 47,44%), fibras totais (11,31 – 15,88%), proteínas (7,78-9,50%) e cinzas (3,49 – 4,44%). Adicionalmente, as antocianinas cianidina 3-glicosídeo (12-43%) e cianidina 3-rutinosídeo (57-88%) foram identificadas nos genótipos avaliados e o genótipo L22P13 apresentou um incremento de 85% no teor de antocianinas totais. Com relação ao perfil de carotenoides, luteína, zeaxantina, α -caroteno e β -caroteno foram os principais carotenoides identificados nos genótipos avaliados, sendo que os genótipos BRS-PAMISTA e L22P13 apresentaram os teores mais elevados de carotenoides totais (125,39 μ g/g e 118 μ g/g). Com relação a atividade antioxidante, todos os genótipos reduziram a geração do radical ABTS em maior ou menor grau, embora diferenças significativas entre os genótipos e a amostra comercial não tenham sido observadas ($IC_{50} = 73,98 - 175,7$ vs. 121,7 μ g/g). Entretanto, houve associação moderada e inversa entre a geração do radical ABTS e níveis de antocianinas e carotenoides. Ausência de diferenças significativas entre os extratos hidroetanólicos dos genótipos e a amostra comercial também foi observada no ensaio da desoxirribose ($IC_{50} = 361,5 - 497,7$ vs. 520,1 μ g/g). Em cultura de células SH-SY5Y, os extratos hidroetanólicos na concentração de 50 μ g/mL apresentaram um efeito protetor contra as espécies reativas geradas pelo H_2O_2 (ensaio DCFH-DA) e esse resultado foi associado ao teor de antocianinas dos extratos. Os resultados apontam genótipos promissores, com elevados teores de antocianinas e carotenoides, com potencial atividade antioxidante *in vitro* e um possível efeito protetor de células frente as espécies reativas.

Palavras-chaves: antocianinas; carotenoides; melhoramento genético; antioxidantes; células SH-SY5Y.

ABSTRACT

The *açaí* (*Euterpe oleracea*) is a fruit of the *açaizeiro*, a native palm of the Brazilian Amazon, considered a "superfruit" due to its high nutritional value, especially anthocyanins, associated with beneficial health effects. Since fruit genotypes developed by breeding programs have been evaluated to identify fruits with improved phytochemical composition and antioxidant potential, the aim of this study was to investigate the effect of genetic improvement in the chemical composition, bioactive compounds profile and antioxidant activity of six *açaí* (*E. oleracea*) genotypes. The analysis of chemical composition, anthocyanins and carotenoids profile and antioxidant activity in various *in vitro* systems (ABTS method, glutathione oxidation, deoxyribose test and SH-SY5Y cells) were performed in six genotypes of *açaí* and one commercial sample that was used as standard. Regarding the chemical composition, in general, the genotypes showed high levels of lipids (36.30 – 47.44%), total fiber (11.31 – 15.88%), protein (7.78-9.50%) and ashes (3.49 – 4.44%). In addition, the anthocyanins cyanidin 3-glucoside (12-43%) and cyanidin 3-rutinoside (57-88%) were identified in evaluated genotypes and L22P13 genotype showed an increase of 85% in total anthocyanin content. Regarding the carotenoid profile, lutein, zeaxanthin, α -carotene and β -carotene were the main carotenoid identified in genotypes, being that BRS-PA_{MISTA} and L22P13 genotypes showed the highest levels of total carotenoids (125.39 $\mu\text{g/g}$ and 118 $\mu\text{g/g}$). Regarding the antioxidant activity, all genotypes reduced ABTS radical generation in greater or lesser extension, although there were no significant differences between hydroethanolic extracts of different genotypes and the commercial sample ($\text{IC}_{50} = 73.98 - 175.7$ vs. 121.7 $\mu\text{g/g}$). However, an inverse and moderate association between radical ABTS generation and anthocyanins and carotenoids content was observed. Absence of significant differences between hydroethanolic extracts of evaluated genotypes and the commercial sample was observed also in the deoxyribose assay ($\text{IC}_{50} = 361.5$ to 497.7 vs. 520.1 $\mu\text{g/g}$). In culture of SH-SY5Y cells, hydroethanolic extracts at concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ had a protective effect against the reactive species generated by H_2O_2 (DCFH-DA assay) and this result was associated with the anthocyanins content of the extracts. The results showed promising genotypes with high levels of anthocyanins and carotenoids with antioxidant potential *in vitro* and a possible protective effect of cells against reactive species.

Keywords: anthocyanins; carotenoids; genetic improvement; antioxidants; SH-SY5Y cells.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** – (A) *E. oleracea*; (B) cachos de açaí; (C) fruto e semente do açaí.....20
- Figura 2** – Fluxograma geral do processamento do fruto do açaizeiro para obtenção de açaí do tipo A, B ou C congelado.....23
- Figura 3** – Estruturas dos compostos fenólicos identificados na polpa liofilizada de açaí (*E. oleracea*).....29
- Figura 4** – Estrutura química geral do cátion flavilium e principais antocianidinas geradas a partir de modificações de sua estrutura.....30
- Figura 5** – Estrutura de alguns dos principais carotenoides presentes em vegetais.....32
- Figura 6** – Espécies reativas geradas no decorrer do metabolismo aeróbico. (1) Radical hidroperoxil; (2) radical superóxido; (3) peróxido de hidrogênio; (4) radical hidroxil.....33
- Figura 7** – Principais EROs e reações de remoção de EROs pelos antioxidantes endógenos. $O_2^{\cdot-}$ = radical superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $\cdot OH$ = radical hidroxil; SOD = superóxido dismutase; GPx = glutathione peroxidase; GR = glutathione reductase; GSH = glutathione reduzida; GSSG = glutathione dissulfeto; Trx = tioredoxina; TrxR = tioredoxina reductase.....36
- Figura 8** – Representação da localização e orientação dos carotenoides no núcleo hidrofóbico das membranas celulares.....38

CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 9** – Esquema geral das análises realizadas para seis genótipos de açaí e uma amostra comercial.....47

CAPÍTULO 3: MANUSCRITO 1

- Figure 1.** Principal component analysis (PCA) of *açaí* genotypes. Proximate composition and physicochemical characteristics (A) and bioactive compounds and antioxidant activity (B)....76

CAPÍTULO 3: MANUSCRITO 2

Figure 1. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on ABTS radical generation (ABTS assay). (A) = Commercial sample; (B) = L09P09; (C) = L22P13; (D) = BRS-PA_{MISTA}; (E) = L11P09; (F) = L06P13; (G) = L04P16. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *Different from control (p<0.05); &Different from Trolox group (p<0.05). Control = ABTS radical in the absence of extracts; Vehicle = ABTS radical incubated in the presence of vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution) equivalent to the higher extract concentration tested; Trolox = ABTS radical incubated in the presence of 5 μ g/mL of Trolox[®] (standard antioxidant); *Açaí* extract = ABTS radical incubated with *açaí* hydroethanolic extracts in concentrations ranging from 0.5 – 50 μ g/mL.....95

Figure 2. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on hydroxyl radical generation (Deoxyribose assay). (A) = Commercial sample; (B) = L09P09; (C) = L22P13; (D) = BRS-PA_{MISTA}; (E) = L11P09; (F) = L06P13; (G) = L04P16. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *Different from control (p<0.05); #Different from Trolox group (p<0.05). Control = Maximum deoxyribose oxidation (absence of extract); Vehicle = deoxyribose incubated in the presence of vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution) equivalent to the higher extract concentration tested; Trolox = deoxyribose incubated in the presence of 75 μ g/mL of Trolox[®] (standard antioxidant); *Açaí* extract = deoxyribose incubated with *açaí* hydroethanolic extracts in concentrations ranging from 0.5 – 50 μ g/mL.....98

Figure 3. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on intracellular reactive species production (DCFH assay) in SH-SY5Y cells. (A) = Commercial sample; (B) = L09P09; (C) = L22P13; (D) = BRS-PA_{MISTA}; (E) = L11P09; (F) = L06P13; (G) = L04P16. Data are expressed as means \pm SEM (n=6). *Different from untreated cells (p<0.05); #Different from H₂O₂-treated cells (p<0.05). Untreated = cells incubated without *Açaí* extract/vehicle/Trolox[®] or 500 μ M H₂O₂; Vehicle = cells incubated with vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution equivalent to higher extract concentration tested) in the presence of 500 μ M H₂O₂. Trolox = cells incubated with 250 μ M Trolox[®] (standard antioxidant) in the presence of 500 μ M H₂O₂; *Açaí* extract = cells incubated with *açaí* hydroethanolic extracts (0.5 – 50 μ g/mL) in the presence of 500 μ M H₂O₂.....102

Figure 4. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on qualitative morphology (A-H) and viability (I, 200x) of SH-SY5Y cells. (A) = Untreated; (B) = Commercial sample; (C) = L09P09; (D) = L22P13; (E) = BRS-PA_{MISTA}; (F) = L11P09; (G) = L06P13; (H) = L04P16. SRB assay data are expressed as means \pm SEM (n=6). Untreated = cells incubated without *Açaí* extract/vehicle/Trolox[®]; Trolox = cells incubated with 250 μ M Trolox[®] (standard antioxidant); *Açaí* extract = cells incubated with the higher concentration of *açaí* hydroethanolic extracts (50 μ g/mL). Vehicle = cells incubated with vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution) equivalent to concentration present in 50 μ g/mL; Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% of CO₂ in air at 37 °C until be treated with *açaí* hydroethanolic extracts at 50 μ g/mL, vehicle or Trolox[®]. After 1 h incubation at 37 °C, cells had morphology evaluated and viability quantified (Material and methods section). Observe in A and B (control and commercial samples, respectively) preserved architecture of cells with small neurites (fine cytoplasmic extensions, white circles) and cell clumps (white arrows). In frames (C-G), morphology of cells treated with hydroethanolic extracts from *açaí* genotypes remains unchanged, similar to untreated cells, as confirmed by the SRB assay (I). In frame H, we can observe that cells treated with hydroethanolic extract from *açaí* genotype L04P16 are rounded (red circles) and the neuritic processes seem to be stopped (red arrows). Besides, cells started to detach from the culture plate.....105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Composição de 100g da polpa de açaí (tipo grosso) liofilizada.....25

CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 2 – Dados comerciais, faixas de concentração, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos padrões de carotenoides.....50

CAPÍTULO 3: MANUSCRITO 1

Table 1 – Proximate composition (g/100g of dry weight) and physicochemical characteristics of *açaí* genotypes and commercial sample.....66

Table 2 – Anthocyanins content in different *açaí* genotypes and commercial sample (mg/100g of dry weight).....68

Table 3 – Carotenoids content in different *açaí* genotypes and commercial sample ($\mu\text{g/g}$ of dry weight).....70

Table 4 – Phenolic compounds and antioxidant activity in different *açaí* genotypes and commercial sample (dry weight).....73

CAPÍTULO 3: MANUSCRITO 2

Table 1 – Bioactive compounds content in hydroethanolic extracts of *açaí* genotypes and commercial sample (dry weight).....92

Table 2 - IC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$) for different antioxidant assays.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AT	Acidez Titulável
CAT	Catalase
CLAE / HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCFH	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2'7' Diacetato de diclorofluoresceína
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	5,5'- ditiobis- (2-nitrobenzóico)
ERs	Espécies Reativas
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GAE	Equivalente de Ácido Gálico
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona dissulfeto
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
¹ O ₂	Oxigênio singlete
·OH	Radical hidroxil
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
RO·	Radical alcóxil
ROO·	Radical peróxil
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforrodamina B
SS	Sólidos Solúveis
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC / TE	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
Trolox	6-hidróxi-2,5,7,8 – tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
Trx	Tioredoxina
TrxR	Tioredoxina redutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 APRESENTAÇÃO.....	18
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA.....	19
4 REVISÃO.....	20
4.1 AÇAÍ (<i>E. oleracea</i>).....	20
4.1.1 Características do açaizeiro (<i>E. oleracea</i>).....	20
4.1.2 Formas de utilização do açaizeiro.....	21
4.1.3 Processamento dos frutos.....	21
4.1.4 Produção e comercialização.....	23
4.1.5 Composição centesimal e características físico-químicas do açaí.....	24
4.2 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	27
4.2.1 Compostos fenólicos.....	27
4.2.1.1 Antocianinas.....	30
4.2.2 Carotenoides.....	32
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	33
4.3.1 Espécies reativas e alterações oxidativas.....	33
4.3.2 Antioxidantes.....	35
4.3.3 Atividade biológica do açaí.....	39
4.4 PROGRAMA DE MELHORAMENTO DE FRUTOS.....	42
CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5.1 MATERIAL.....	46
5.1.1 Preparo do material.....	46
5.2 METODOLOGIA.....	47
5.2.1 Composição centesimal e características físico-químicas das polpas de açaí.....	47
5.2.2 Identificação e quantificação de antocianinas.....	48
5.2.3 Identificação e quantificação de carotenoides.....	49
5.2.4 Quantificação dos compostos fenólicos.....	50

5.2.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	51
5.2.5.1 Atividade antioxidante pelo método ABTS.....	51
5.2.5.2 Capacidade de remoção do radical hidroxil – teste da desoxirribose.....	52
5.2.5.3 Capacidade de proteção da glutatona (GSH).....	53
5.2.6 Avaliação do efeito neuroprotetor <i>in vitro</i>	53
5.2.6.1 Cultura de células.....	53
5.2.6.2 Ensaio da diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA).....	53
5.2.6.3 Viabilidade celular.....	54
5.2.7 Cálculo da concentração inibitória 50	55
5.2.8 Análise estatística	55
CAPÍTULO 3 – MANUSCRITOS	56
MANUSCRITO 1: Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of <i>açai</i> (<i>Euterpe oleracea</i>) genotypes.....	57
MANUSCRITO 2: <i>In vitro</i> antioxidant potential and protective effects of a hydroethanolic extract from <i>açai</i> (<i>Euterpe oleracea</i>) genotypes in human neuron-like cells (SH-SY5Y).....	81
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO	111
DISCUSSÃO GERAL	112
CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

Todas as formas de vida aeróbica estão sujeitas aos efeitos oxidantes, em função da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o metabolismo (WARNER, 1994). As EROs podem combinar-se com outros átomos formando outras espécies reativas, em especial as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (GIASSON et al., 2002). Em baixas concentrações, as EROs/ERNs atuam em importantes mecanismos de regulação celular (fagocitose, crescimento e sinalização intercelular) (RIBEIRO et al., 2005). Entretanto, o excesso de espécies reativas (ERs), pode gerar uma condição de estresse oxidativo, resultante do desequilíbrio entre as ERs e a ação de antioxidantes (endógenos e exógenos), o que provoca danos celulares em macromoléculas como as proteínas, lipídeos e DNA. Tais danos estão envolvidos na patogênese de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, diabetes e processos fisiológicos, como envelhecimento (VASCONCELOS et al., 2007; HALLIWELL, 2015).

Os antioxidantes são compostos que, em baixas concentrações, apresentam capacidade de inibir ou retardar a oxidação. Quando produzidos pelo próprio organismo, são chamados antioxidantes endógenos e podem agir enzimaticamente como exemplificado pela ação da superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e tioredoxina redutase (TrxR) ou não-enzimaticamente, como o tripeptídeo glutatona (GSH) (RIBEIRO et al., 2005). Por sua vez, os antioxidantes exógenos, provenientes da dieta, atuam de forma não-enzimática no organismo, sendo os principais as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos presentes em vegetais (DUGO; NEGIS; AZZI, 2011).

Uma dieta rica em vegetais tem sido relacionada a prevenção de várias doenças crônicas não transmissíveis, entre elas, diferentes tipos de câncer e doenças cardiovasculares, o que tem estimulado o consumo, bem como, os estudos para caracterizar diferentes compostos com propriedades antioxidantes e sua ação benéfica à saúde (YAHIA, 2010). A presença de compostos fenólicos, com destaque para as antocianinas, tem sido associada à prevenção de doenças cardiovasculares (CASSIDY et al., 2013), neurodegenerativas (VAUZOUR et al., 2010) e câncer (SCHANTZ et al., 2010). Adicionalmente, o consumo de carotenoides está associado a redução do desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer (LU et al., 2001), degeneração macular (BERNSTEIN et al., 2002) e formação de cataratas (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004).

O açaí (*Euterpe oleracea*) é uma fruta nativa da região norte do Brasil, sendo o Estado do Pará o maior extrativista e o responsável por aproximadamente 55% da produção nacional

(IBGE, 2014). O açaí é considerado um “superfruto” e o aumento no consumo nacional e internacional (YAMAGUCHI et al., 2015) está relacionado as suas propriedades nutricionais, com destaque para o teor de lipídeos (ácidos graxos insaturados), proteínas, fibras e minerais e teores de compostos antioxidantes, entre eles as antocianinas (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004) e os carotenoides (RIBEIRO et al., 2010). Vários estudos têm relacionado os compostos bioativos presentes no açaí ao potencial antioxidante (FELZENSZWALB et al., 2013), efeitos anti-inflamatório (POULOSE et al., 2012), anti-proliferativo (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; HOGAN et al., 2010) e cardioprotetor (ZAPATA-SUDO et al., 2014).

Além da polpa, a utilização artesanal e industrial do fruto e do açaizeiro é diversificada como, por exemplo, na produção de alimentos, corantes naturais, papel, extração do palmito, na indústria farmacêutica e cosmética (HOMMA, 2006; YAMAGUCHI et al., 2015).

O aumento do consumo em função de suas propriedades funcionais, a expansão comercial tanto para o mercado interno quanto externo, bem como a importância socioeconômica do açaí, estimulam a pesquisa e investimentos em programas de melhoramento genético (CARVALHO et al., 2010). Tais programas visam a obtenção de genótipos capazes de produzir frutos durante todos os meses do ano, plantas com maior rendimento e fruto com propriedades funcionais intensificadas (FARIAS NETO; RESENDE; OLIVEIRA, 2011). Desta forma, pesquisas para caracterização nutricional e funcional de genótipos são de extrema importância para a continuidade dos programas de melhoramento, para produtores e para os consumidores, que cada vez mais buscam uma dieta equilibrada, rica em alimentos com propriedades funcionais benéficas à saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química, perfil de compostos bioativos e a atividade antioxidante de diferentes genótipos de açaí (*E. oleracea*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os principais componentes nutricionais e características físico-químicas de diferentes genótipos de açaí;
- Identificar e quantificar antocianinas e carotenoides de diferentes genótipos de açaí;
- Quantificar compostos fenólicos dos genótipos em estudo;
- Caracterizar o extrato hidroetanólico de diferentes genótipos de açaí quanto ao teor de antocianinas e carotenoides;
- Avaliar a atividade antioxidante de extratos hidroetanólicos dos genótipos de açaí *in vitro*;
- Avaliar a capacidade neuroprotetora de extratos hidroetanólicos dos genótipos de açaí em células SH-SY5Y insultadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂);
- Avaliar a toxicidade dos extratos hidroetanólicos dos genótipos de açaí em células SH-SY5Y.

3 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada na forma de capítulos, sendo que no capítulo 1 será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os assuntos inerentes a essa dissertação; no capítulo 2 serão descritas metodologias empregadas durante a realização do trabalho; no capítulo 3 serão apresentados os dois manuscritos originados a partir dos resultados obtidos e no capítulo 4 uma discussão geral e conclusão do trabalho.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

4 REVISÃO

4.1 AÇAÍ (*E. oleracea*)

4.1.1 Características do açazeiro (*E. oleracea*)

O Açá (*E. oleracea*) é proveniente da família *Arecaceae*, sendo que a palmeira é conhecida como açazeiro e apresenta mais de 25 estipes por touceira, de 15 a 20 m de altura e de 12 a 18 cm de diâmetro (Figura 1A e 1B). Cada estipe pode produzir de 3 a 8 cachos de frutos por ano, sendo que cada fruto pesa em média 1,5 gramas, onde 85% deste corresponde ao caroço e 15% representa a polpa (Figura 1C) (SILVA; SOUZA; BERNI, 2005; NOGUEIRA, 2006).

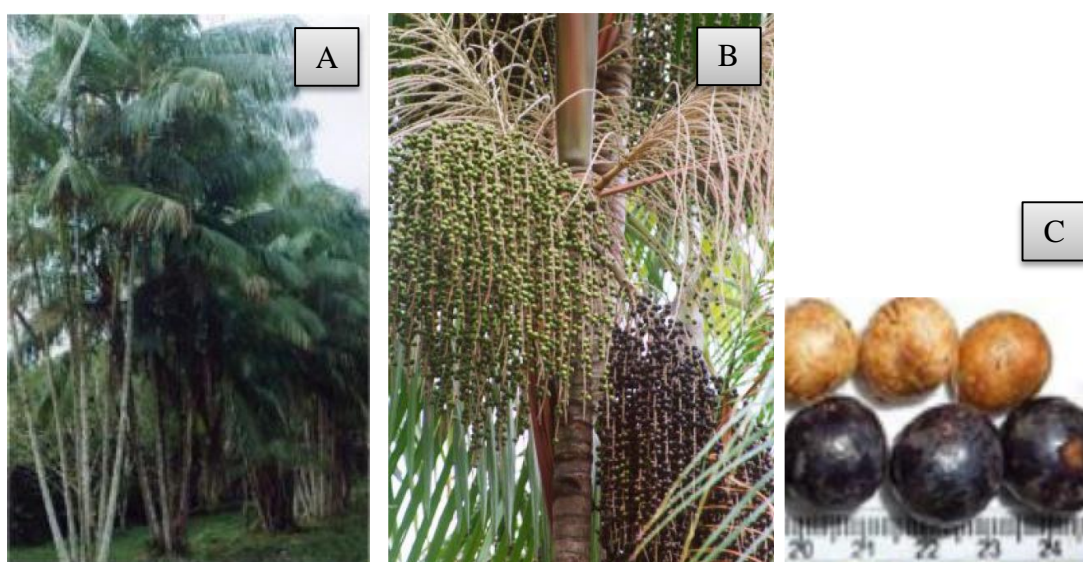


Figura 1 – (A) *E. oleracea*; (B) cachos de açá; (C) fruto e semente do açá.

Fonte: Adaptado de SILVA; SOUZA; BERNI, 2005

A ocorrência do açazeiro se dá em ecossistemas de várzea, também podendo ocorrer em áreas de terra firme, principalmente quando localizadas próximas às várzeas e igapós. As condições favoráveis ao seu desenvolvimento são temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar elevadas (NOGUEIRA, 2006).

No Brasil, o açazeiro é nativo do estuário amazônico, sendo populações espontâneas encontradas nos Estados do Pará, Maranhão, Mato Grosso, Tocantins, Amapá. Também são encontrados na América central (Panamá), e em países da América do Sul, como Equador, Colômbia, Venezuela, Suriname e Guiana (NOGUEIRA, 2006; LORENZI et al., 2006).

4.1.2 Formas de utilização do açazeiro

A importância socioeconômica do açazeiro está relacionada ao seu potencial integral de aproveitamento da matéria-prima, com uma utilização diversificada pela população, bem como pelas indústrias de alimentos, corantes naturais, cosméticos, fármacos, entre outras (HOMMA, 2006).

O principal aproveitamento dos frutos é a extração da polpa ou simplesmente açai (como é conhecido popularmente). Quando utilizado no consumo alimentar, representa o alimento base para as populações ribeirinhas, misturado com farinha de mandioca e associado a peixes, camarão ou carne. A polpa de açai pode ser consumida também como bebida, porém sua utilização se dá em sorvetes, licores, doces, néctares e geleias, e para a extração de corantes (NOGUEIRA, 2006).

As fibras provenientes do caroço são utilizadas em móveis, placas acústicas, xaxim, compensados, indústria automobilística. O caroço, também pode ser processado como alimento funcional para misturar ao trigo na fabricação de produtos de panificação, adicionado ao café, extração de óleo comestível, na fabricação de medicamentos, ração animal, geração de vapor, carvão vegetal e adubo orgânico (NOGUEIRA, 2006).

O palmito do açai também é comercializado, sendo que a produção no Pará representa, aproximadamente, 90% da produção de palmito do país. Adicionalmente, esse produto também possui grande inserção nos mercados consumidores dos Estados Unidos e na Europa (POLL et al., 2013).

As folhas do açazeiro são utilizadas para coberturas de casas dos habitantes do interior da região. Adicionalmente, os 30% dos estipes adultos que podem ser cortados a cada 5 anos, são destinados à indústria do papel, para a fabricação de pasta e polpa de celulose (HOMMA, 2006).

4.1.3 Processamento dos frutos

O governo do Estado do Pará, através do decreto estadual nº 326, de 20 de janeiro de 2012, define o açai como o fruto da palmeira conhecida como açazeiro, cujo nome científico é *E. oleracea* Mart, fruta nativa da Região Amazônica, pequena, redonda e de cor azul-noite, quase negra, que ganhou fama como fonte natural de energia por todo o Brasil e pelo mundo. A polpa acrescida de água obtida do atrito dos frutos é denominada “açai” sendo esta muito

consumida no Estado do Pará e classificada pelos estabelecimentos artesanais como fino ou popular, médio e grosso, conforme a adição de água.

O Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA) classifica o produto obtido a partir do fruto do açaí de acordo com a adição ou não de água nas etapas do processamento e seus quantitativos (% sólidos totais), através da Instrução normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000, que aprova o regulamento técnico de padrão de identidade e qualidade para a polpa. Desta maneira a polpa de açaí é classificada em: (i) grosso, especial ou tipo A para uma polpa com teor de sólidos totais > 14%; (ii) médio, regular ou tipo B para um teor de sólidos totais entre 11 e 14%; (iii) fino, popular ou tipo C para a polpa com teor de sólidos totais entre 8 e 11%; (iv) integral ou polpa de açaí quando não ocorre a adição de água e não ocorre o processo de filtração na preparação.

O processo de obtenção da polpa consiste na imersão do fruto em água morna por um tempo determinado, com o objetivo de amolecer o mesocarpo do fruto antes da etapa de despulpamento, sendo este realizado com o auxílio de equipamentos ou manualmente, com adição ou não de água; em seguida o produto obtido é peneirado e está pronto para o consumo (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004; CARVALHO, 2007).

A preparação da polpa do açaí para ser comercializada, tanto nos mercados nacional e internacional, se difere do preparo para o pronto consumo, pois demanda algumas etapas adicionais no processamento, com o objetivo de conservar as características nutricionais e sensoriais deste produto por um prazo maior de validade, pois a polpa do açaí é altamente perecível, com tempo máximo de conservação de 12 horas, mesmo sob refrigeração (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004; MATTIETO, 2016). O fluxograma geral do processamento do fruto do açaizeiro para obtenção da polpa de açaí do tipo A, B ou C congelado está apresentado na Figura 2.

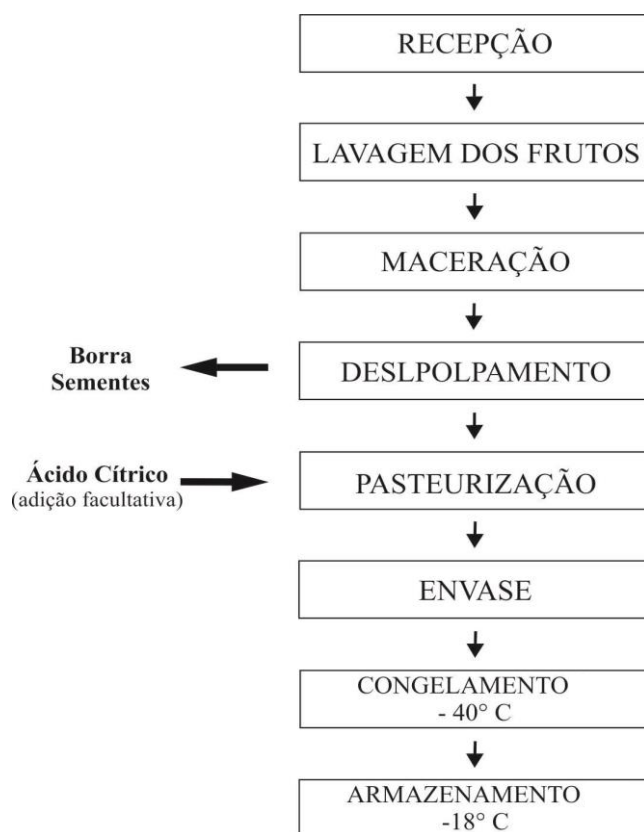


Figura 2 - Fluxograma geral do processamento do fruto do açaizeiro para obtenção de açaí do tipo A, B ou C congelado.

Fonte: MATTIETTO (2016).

A alta perecibilidade da polpa do açaí está relacionada a elevada carga microbiana causada por condições inadequadas de colheita, acondicionamento, transporte e processamento, juntamente com a degradação enzimática causada por peroxidases e polifenoloxidasas, o que resulta em mudanças sensoriais e nutricionais, como exemplo, a alteração da cor e aparecimento do sabor azedo. Por estes motivos o processo de congelamento torna-se uma opção viável de conservação da polpa (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004; CARVALHO, 2007), também podendo ser utilizado o processo de liofilização (MENEZES; TORRES; SRUR, 2008).

4.1.4 Produção e comercialização

A preservação da Amazônia motivada principalmente pela pressão internacional a partir da década de 90 e a busca por alternativas para evitar os desmatamentos e as queimadas, fizeram com que diversos produtos florestais não-madeireiros ganhassem importância na mídia mundial. Assim, os frutos regionais ganharam destaque, entre eles o açaí, que teve um forte crescimento no mercado nacional e atraiu o interesse internacional (HOMMA, 2006).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a quantidade extraída de frutos de açaí no ano de 2014 foi de 198.149 toneladas, originando um rendimento de R\$ 422.064.000,00, sendo o Estado do Pará o maior produtor nacional do fruto, responsável por 55,4% da extração (IBGE, 2014). Os dados da pesquisa do IBGE não incluem a açaí cultivado, apenas o produto proveniente do extrativismo (IBGE, 2014). Um balanço da produção do açaí cultivado no período de 2003 a 2012 divulgado pela Secretaria de Agricultura do Estado do Pará, aponta um aumento na produção do açaí de 257.282 toneladas no ano de 2003 para 817.246 toneladas no ano de 2012, gerando um valor de produção superior a 1 bilhão de reais (R\$ 1.159.738.291,00) (SEDAP, 2016). A cadeia produtiva do açaí mobiliza mais de 300 mil pessoas, em 54 municípios, sendo que a produção do fruto representa, aproximadamente, 70% da fonte de renda da população ribeirinha (PEQA, 2016).

A produção atual da polpa de açaí ainda apresenta-se deficiente frente a demanda existente. Estima-se que do total da produção de açaí, 60% é consumida no próprio Estado do Pará, 30% são consumidos pelos demais estados brasileiros e apenas 10% é exportada para outros países, entre eles Estados Unidos, Itália e Japão (POLL et al., 2013).

4.1.5 Composição centesimal e características físico-químicas do açaí

O crescimento do consumo do açaí pode ser atribuído as importantes propriedades nutricionais, uma vez que a polpa é rica em lipídeos, proteínas, fibras, vitaminas e minerais. (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004).

Lorenzi et al. (2006), em seu estudo sobre frutos brasileiros e exóticos que são cultivados, relataram a composição nutricional de diversos frutos, entre eles o açaí (*E. oleracea*). Ao considerar uma porção de 100 g de fruto em base seca, o valor calórico foi de 247,0 kcal, sendo os teores de proteínas, gorduras, cinzas e carboidratos iguais a 3,80 g, 12,20 g, 1,5 g e 36,6 g, respectivamente. A quantidade dos minerais cálcio, fósforo e ferro foram iguais a 118 mg, 58 mg e 11,8 mg, respectivamente enquanto as quantidades de vitaminas B1 e B2 foram de 0,36 mg e 0,10 mg, vitamina C de 9,0 mg e niacina de 0,40 mg.

Menezes, Torres e Srur (2008) avaliaram a composição físico-química da polpa de açaí (*E. oleracea*) liofilizada. A polpa utilizada foi classificada como tipo grosso (teor de sólidos > 14%) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. Verifica-se um elevado valor calórico de 489,39 kcal/100 g de polpa liofilizada, sendo que os autores atribuíram esse alto valor energético ao tipo de açaí utilizado, pois o açaí tipo grosso contém a maior concentração de nutrientes calóricos, evidenciado pelo alto teor de lipídeos (40,75%). Neste estudo, foram

identificados os ácidos graxos oléico (C_{18:1} - 52,70%), palmítico (C_{16:0} - 25,56%), palmitoléico (C_{16:1} - 3,54%), esteárico (C_{18:0} - 1,84) e linoléico (C_{18:2} - 0,95%) na fração lipídica da polpa liofilizada. Também pode-se observar um baixo valor de umidade de 4,92%, sendo que o teor de proteína foi de 8,13 g/100 g de polpa liofilizada. Dentre o perfil de minerais analisados, observou-se uma elevada quantidade de potássio (900 mg/100 g) e cálcio (330 mg/100 g) e uma importante concentração do mineral magnésio (124,4 mg/100 g), que atua no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos no organismo humano.

Tabela 1 – Composição de 100g da polpa de açai (tipo grosso) liofilizada.

Composição	Quantidade na matéria seca
Energia (kcal)	489,39
Umidade (%)	4,92
Cinzas (%)	3,68
Proteínas (g)	8,13
Lipídeos totais (g)	40,75
Carboidratos totais e fibras (g)	42,53
Sódio (mg)	28,5
Magnésio (mg)	124,4
Alumínio (mg)	0,36
Manganês (mg)	10,71
Cobalto (mg)	0,009
Níquel (mg)	0,28
Cobre (mg)	2,15
Zinco (mg)	2,82
Arsênio (mg)	< 0,004
Rubídio (mg)	5
Molibdênio (mg)	0,013
Fósforo (mg)	54,5
Cálcio (mg)	330
Selênio (mg)	< 0,02
Prata (mg)	< 0,0002
Cádmio (mg)	< 0,0002
Bário (mg)	0,34
Mercúrio (mg)	< 0,01
Chumbo (mg)	0,014
Tório (mg)	0,002
Urânio (mg)	< 0,0001
Potássio (mg)	900
Estrôncio (mg)	0,79
Antimônio (mg)	< 0,0002
Ferro (mg)	4,5

Fonte: Adaptado de MENEZES; TORRES; SRUR (2008).

Diversos estudos têm apresentado a composição centesimal da polpa de açai (*E. oleracea*) (PEREIRA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2002; ALEXANDRE; CUNHA;

HUBINGER, 2004; CANUTO et al., 2010; TONON; FREITAS; HUNBINGER, 2011; GORDON et al., 2012; BATISTA et al., 2016). No entanto, uma diversidade nos resultados tem sido observada e tais variações podem ser atribuídas a inúmeros fatores, entre eles os componentes genéticos dos frutos, o período da safra, tipo de solo e adubação, localização e condição climática do plantio e diferenças no método de extração da polpa (quantidade de água utilizada, tempo e temperatura de maceração) (LORENZI et al., 2006; CUNHA et al., 2013).

Outros parâmetros relacionados à qualidade, como pH, sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT) foram avaliados para o açaí. Em relação ao pH, os alimentos podem ser classificados como de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$), ácidos (pH de 4,0 a 4,5) e muito ácidos ($\text{pH} < 4,0$), sendo esta classificação em função do pH mínimo para a multiplicação de bactérias ($\text{pH} = 4,0$) e do *Clostridium botulinum* ($\text{pH} = 4,5$) (SANTOS et al., 2008). Para a polpa de açaí diferentes valores de pH foram relatados, incluindo polpas de baixa acidez com pH igual a 5,2 (PEREIRA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2002; ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004) e polpas muito ácidas com pH igual a 3,76 (SANTOS et al., 2008).

Os teores de SS variaram de 2,40 a 8,13 °Brix para a polpa de açaí no estudo de Santos et al. (2008), enquanto no estudo de Neves et al. (2015) e Pereira, Queiroz e Figueirêdo (2002) os teores de SS obtidos foram de 4,0 e 4,80 °Brix para a polpa de açaí, respectivamente. Este parâmetro está relacionado aos teores de açúcares presentes nos frutos e exerce um papel importante no sabor (SOUZA et al., 2012) também podendo ser usado como um indicador de maturidade dos frutos (VILAS BOAS et al., 2004).

Em relação a AT, a polpa de açaí variou de 0,21% (PEREIRA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2002) a 1,73% de ácido cítrico (NEVES et al., 2015). Geralmente os ácidos orgânicos diminuem com o amadurecimento do fruto, em decorrência de sua utilização como substrato na respiração ou sua conversão em açúcares (CHITARRA; CHITARRA, 2005) e também irão influenciar na qualidade sensorial.

Uma alta relação entre o conteúdo de SS e os ácidos orgânicos (SS/AT) indica um sabor doce. Neves et al. (2015) observaram uma baixa relação entre SS/AT (2,36) em frutos de açaí, o que indica um sabor mais ácido, devido a maiores teores de ácidos orgânicos e baixos teores de SS. Normalmente, frutos de sabor mais doce apresentam melhor aceitação dos consumidores no consumo *in natura* (SOUZA et al., 2012)

4.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos naturalmente presentes em vegetais são responsáveis por importantes ações biológicas, sendo sua utilização comum nos dias de hoje na medicina alternativa e nos suplementos alimentares. Entre os mecanismos de ação associados a estes compostos estão a ação antioxidante, a melhora do sistema imunológico e modulação hormonal (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; COZZOLINO, 2012).

Os compostos bioativos são constituintes extra nutricionais e ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos. Por possuírem muitas variações em sua estrutura química e por consequência na função biológica, estes compostos são divididos em compostos fenólicos, carotenoides, alcaloides, compostos azotados e compostos organossulfurados, sendo os mais estudados os compostos fenólicos e os carotenoides (FERREIRA; ABREU, 2007).

O açaí apresenta um alto teor de compostos bioativos, principalmente as antocianinas, flavonas e ácidos fenólicos (GORDON et al., 2012). Estes compostos são responsáveis pela alta atividade antioxidante associada a propriedades benéficas à saúde demonstradas por diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; YAMAGUCHI et al., 2015). A presença de antocianinas no açaí também possibilita seu uso como corante alimentar, o que é de extrema importância, já que a legislação e os consumidores, preocupados com o elevado consumo de aditivos artificiais, buscam novas alternativas viáveis de aditivos naturais (GORDON et al., 2012).

4.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes em frutas, raízes, bulbos, ervas, temperos, legumes, chá, café e vinho (KÄHKÖNEN et al., 1999), podendo ser divididos em flavonoides e não flavonoides. Por sua vez, os flavonoides podem ser subdivididos em flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas, flavonóis e antocianinas, enquanto o grupo não flavonoides compreende os ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (MANACH et al., 2005; LI et al., 2009). Na polpa de açaí os compostos fenólicos mais abundantes são as antocianinas, proantocianidinas, outros flavonoides e lignanas (GALLORI et al., 2004; KANG et al., 2010; KANG et al., 2011).

Ribeiro et al. (2010) identificaram e quantificaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a concentração total de compostos fenólicos na polpa de açaí (*E. oleracea*) e relataram valores de $424,9 \pm 8,8$ mg GAE/100 g de polpa, sendo os principais constituintes o ácido gálico ($20,7 \pm 0,9$ mg/100g) e o ácido benzóico ($9,1 \pm 0,8$ mg/100g). O total de

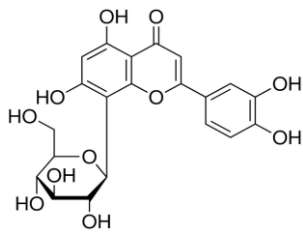
flavonoides foi de $55,9 \pm 0,6$ mg equivalentes de catequina (CE) por 100 g de polpa, sendo os principais constituintes taxifolina 3-rhaminosídeo ($30,3 \pm 0,4$ mg/100g), luteolina 8-glicosídeo ($7,3 \pm 0,1$ mg/100g), apigenina 6-glicosídeo ($5,2 \pm 0,2$ mg/100g) e catequina ($2,1 \pm 0,3$ mg/100g).

Rojano et al. (2011) e Kang et al. (2012) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos totais na polpa liofilizada de açaí (*E. oleracea*), através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e relataram valores de 31,72 mg GAE/g e 31,2 mg GAE/g, respectivamente. Gordon et al. (2012) avaliaram o conteúdo dos compostos fenólicos do açaí durante a maturação do fruto e observaram uma variação de 0,12 a 34,37 mg GAE/g.

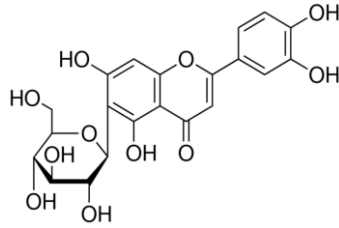
No estudo de Gallori et al. (2004) os compostos fenólicos da polpa liofilizada de açaí foram investigados por métodos cromatográficos, sendo que os compostos não-antocianicos identificados incluíram homoorientina, orientina, taxifolina deoxihexose e isovitexina. As quantidades destes compostos totalizaram 3,5 mg/g de polpa seca. Este estudo foi o primeiro relato da análise completa dos flavonoides em polpa de açaí (*E. oleracea*), sendo também pioneiro na identificação das três principais flavonas: homoorientina, orientina e isovitexina.

Kang et al. (2010), com o objetivo de identificar os principais compostos fenólicos na polpa liofilizada de açaí (*E. oleracea*), através de vários métodos cromatográficos, isolaram sete flavonoides, sendo eles orientina, homoorientina, vitexina, luteolina, chrisoeriol, quercetina e dihidrocaempferol. Os flavonoides vitexina e quercetina identificados neste estudo foram relatados pela primeira vez na polpa de açaí, uma vez que outros flavonoides como a orientina e a homoorientina já haviam sido identificados pelo estudo de Gallori et al. (2004). Em estudo complementar, Kang et al. (2011) identificaram outros cinco flavonoides em polpa de açaí (*E. oleracea*) liofilizada pelos métodos de cromatografia e espectrofotometria, sendo eles (2S,3S)-dihidrocaempferol 3-O- β -D-glicosídeo e seu isômero (2R,3R)-dihidrocaempferol 3-O- β -D-glicosídeo, isovitexina, velutina e 5,4'-dihidroxi-7,3',5'-trimetoxiflavona. Destes compostos apenas o flavonoide isovitexina já havia sido identificado (GALLORI et al., 2004).

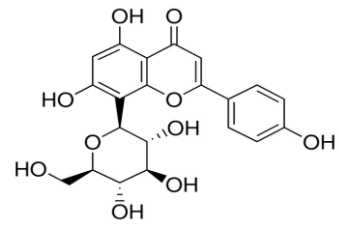
Na Figura 3 estão apresentadas as estruturas dos compostos fenólicos identificados na polpa liofilizada de açaí pelos estudos de Gallori et al. (2004), Kang et al. (2010) e Kang et al. (2011).



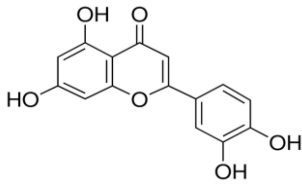
Orientina



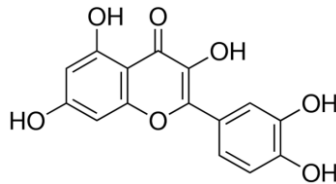
Homoorientina



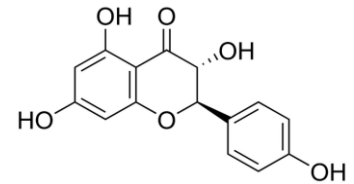
Vitexina



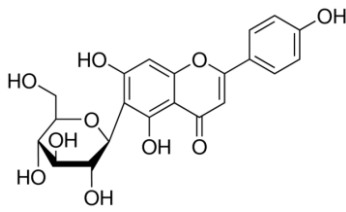
Luteolina



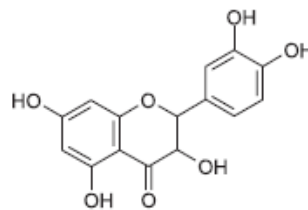
Quercetina



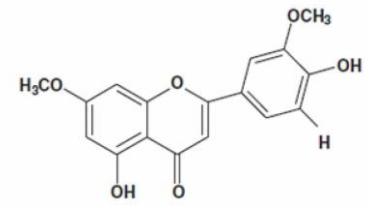
Dihidrocaempferol



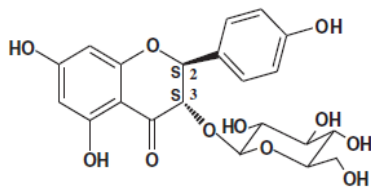
Isovitexina



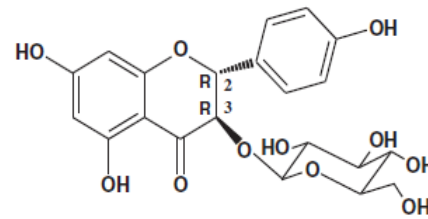
Taxofolina



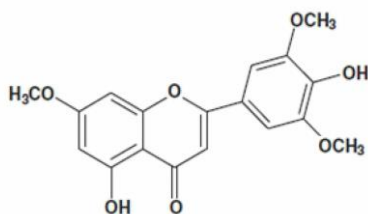
Velutina



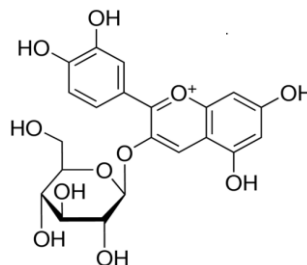
(2S,3S)-dihidrocaempferol 3-O-β-D-glicosídeo



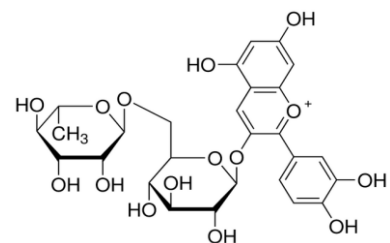
(2R,3R)-dihidrocaempferol 3-O-β-D-glicosídeo



5,4'-dihidroxi-7,3',5'-trimetoxiflavona



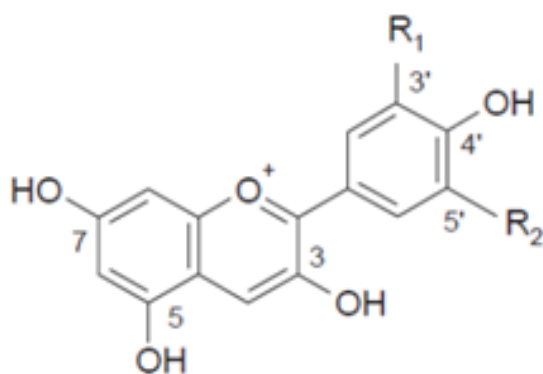
Cianidina 3-O-glicosídeo



Cianidina 3-O-rutinosídeo

Figura 3 – Estruturas dos compostos fenólicos identificados na polpa liofilizada de açai (*E. oleracea*).
 Fonte: Adaptado de GALLORI et al. (2004), KANG et al. (2010) e KANG et al. (2011).

Dentre estes, somente a cianidina 3-O-glicosídeo e a cianidina 3-O-rutinosídeo são compostos fenólicos antociânicos, pois apresentam em sua estrutura básica o 2-fenilbenzopirona do sal flavilium (Figura 4), sendo os demais compostos fenólicos não-antociânicos.



ANTOCIANIDINAS	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 4 – Estrutura química geral do cátion flavilium e principais antocianidinas geradas a partir de modificações de sua estrutura.

Fonte: Adaptado de OANCEA; STOIA; COMAN (2012).

4.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos responsáveis pelas cores azul, roxo, violeta, magenta, vermelho e laranja encontradas no reino vegetal. Estes pigmentos pertencem ao subgrupo dos flavonoides, que por sua vez pertencem ao grande grupo de substâncias orgânicas, denominadas de compostos fenólicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A estrutura química das antocianinas corresponde ao esqueleto carbônico C₆C₃C₆, sendo a estrutura básica o 2-fenilbenzopirona do sal flavilium, com diferenciação em relação: (i) número de grupos hidroxila e/ou grupos metoxi presentes; (ii) tipos, números e sítios de ligação dos açúcares na molécula (KONG et al. 2003).

As antocianinas são glicosídeos de antocianidinas, a forma aglicona da molécula, onde as de maior ocorrência são pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delfinidina, apresentadas na Figura 4 (KONG et al., 2003; GHAFOR; JUHAIMI, 2014).

A variação da cor verde para roxo escuro é observada no processo de maturação do fruto de açaí, sendo que no fruto maduro ocorre um valor mais elevado de compostos fenólicos, principalmente as antocianinas cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo, conforme descrito anteriormente na caracterização das polpas de açaí (*E. oleracea*) (ROGEZ et al., 2011; GORDON et al., 2012).

No estudo de Gallori et al. (2004), os compostos fenólicos da polpa liofilizada de açaí (*E. oleracea*) foram investigados por métodos cromatográficos, sendo que os resultados apresentaram como principais antocianinas, cianidina-3-O-glicosídeo e a cianidina-3-O-rutinosídeo, em um total de 0,5 mg por grama de polpa seca.

Schauss et al. (2006a) utilizando CLAE identificaram e quantificaram cinco antocianinas na polpa liofilizada de açaí (*E. oleracea*). Os resultados indicaram um teor total de antocianinas igual a 319 mg/ 100g de polpa, sendo elas cianidina 3-rutinosídeo (193 mg/ 100 g), cianidina 3-glicosídeo (117 mg/100 g), cianidina 3-sambubiosídeo (4 mg/100 g), peonidina 3-rutinosídeo (4 mg/100 g) e peonidina 3-glicosídeo (2 mg/100 g).

Rosso et al. (2008) utilizando CLAE para avaliar a composição de antocianinas a partir de duas amostras de polpa congelada de açaí (*E. oleracea*), quantificaram cianidina 3-O-glicosídeo (37,29 e 37,96 mg/100 g de polpa) e cianidina 3-O-rutinosídeo (245,21 e 265,73 mg/100 g de polpa), totalizando 282,5 e 303,7 mg de antocianinas em 100g da polpa de açaí.

Ribeiro et al. (2010) identificaram e quantificaram por CLAE a concentração total de antocianinas (252, 9 mg/100 g) da polpa congelada de açaí (*E. oleracea*), sendo os maiores componentes a cianidina 3-O-rutinosídeo (241,8 mg/100 g) e cianidina 3-O-glicosídeo (11,1 mg/100 g).

Rogez et al. (2011), quantificaram a concentração máxima de antocianinas de amostras de diversas localidades no Estado do Pará colhidas aleatoriamente em diferentes períodos e relataram valores entre 109,0 e 165,0 mg/100 g de polpa.

Gouvêa et al. (2012) com o objetivo de isolar padrões de antocianinas a partir da polpa de açaí liofilizada (*E. oleracea*) por CLAE, quantificaram cianidina 3-O-glicosídeo (35,29 mg/100 g de polpa) e cianidina 3-O-rutinosídeo (58,73 mg/100 g de polpa).

O estudo de Gordon et al. (2012) apresentou informações sobre as alterações quantitativas nas antocianinas em três estágios de maturação diferentes (verde, intermediário – frutas marrom-avermelhadas e maduro) na polpa de açaí. No fruto verde não foram detectadas antocianinas, sendo que no 2º estágio, onde o fruto já possuía uma coloração marrom-avermelhada, foram detectadas e quantificadas as antocianinas, cianidina 3-O-rutinosídeo (0,31 mg/ 100 g de polpa), cianidina 3-O-glicosídeo (0,29 mg/100 g de polpa) e valores traços de peonidina 3-O-rutinosídeo, peonidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3-O-glicosídeo. No 3º estágio os frutos apresentavam a coloração roxo-escuro, indicando a completa maturidade do fruto. As antocianinas identificadas e quantificadas foram cianidina 3-rutinosídeo (17,9 mg/ 100 g), cianidina 3-glicosídeo (4,94 mg/100 g), peonidina 3-O-rutinosídeo (0,29 mg/100 g),

peonidina 3-O-glicosídeo (0,08 mg/100 g); (v) pelargonidina 3-O-glicosídeo (0,06 mg/100 g) e cianidina 3-O-sambubiosídeo (0,02 mg/100 g).

4.2.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha de frutas, folhas e algumas flores. Mais de 600 compostos já foram identificados, sendo α -caroteno, β -caroteno, licopeno, zeaxantina, luteína e criptoxantina os pigmentos dessa classe mais encontrados em vegetais (VOUTILAINEN et al., 2006; RAO; RAO, 2007). As estruturas destes carotenoides estão apresentadas na Figura 5.

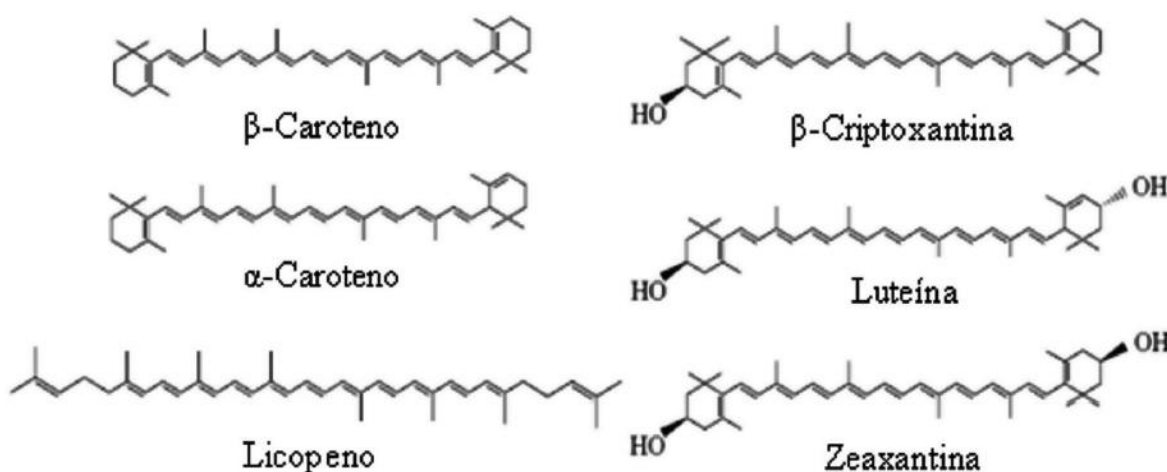


Figura 5 – Estrutura de alguns dos principais carotenoides presentes em vegetais. Fonte: Adaptado de RAO; RAO (2007) e SKIBSTED (2012).

Ribeiro et al. (2010) identificaram e quantificaram por CLAE a concentração total de carotenoides (0,52 mg/100 g) em polpa de açaí (*E. oleracea*), sendo os maiores componentes a luteína (0,15 mg/100 g), o α -caroteno (0,045 mg/100 g) e o β -caroteno (0,24 mg/100 g).

Kang et al. (2012) no estudo sobre a bioatividade da polpa de açaí, compararam a polpa do fruto obtida pelas espécies *E. precatoria* e *E. oleracea*. Os carotenoides foram analisados e quantificados por cromatografia, sendo que na polpa de açaí da espécie *E. precatoria* foram identificados luteína (483,0 μ g/g), β -caroteno (221,5 μ g/g), licopeno (186,5 μ g/g), zeaxantina (54,0 μ g/g) e astaxantina (18,7 μ g/g). A concentração total foi de 963,7 μ g de carotenoides/g (peso seco). Na polpa de açaí da espécie *E. oleracea* somente o carotenoide β -caroteno foi detectado e sua concentração em base seca foi de 10,8 μ g/g de polpa.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.3.1 Espécies reativas e alterações oxidativas

As ERs são produzidas naturalmente pelo metabolismo aeróbico (Figura 6), a partir do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) (forma mais estável do elemento, presente na atmosfera) que reage com biomoléculas (substratos ricos em hidrogênio e carbono) para a obtenção de energia química e calor. Também podem ser geradas a partir de disfunções biológicas (infecções) e fontes exógenas por ação de poluentes e toxinas, como fumaça de cigarro, consumo de bebidas alcoólicas, radiações UV e ionizantes, pesticidas, solventes orgânicos e ozônio (PISOSCHI; POP, 2015).

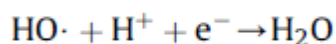
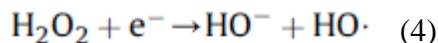
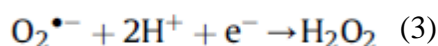
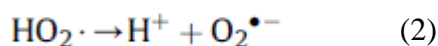
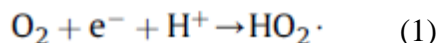


Figura 6 – Espécies reativas geradas no decorrer do metabolismo aeróbico. (1) Radical hidroperoxil; (2) radical superóxido; (3) peróxido de hidrogênio; (4) radical hidroxil.
Fonte: GUTTERIDGE (1994).

As ERs quando centradas no átomo de oxigênio, são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) e quando centradas em átomos de nitrogênio são conhecidas como espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (GIASSON et al., 2002). As EROs podem estar distribuídas na forma de radicais, entre eles radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radical alcóxil ($\text{RO}\cdot$) e o radical peróxil ($\text{ROO}\cdot$) e não-radicalares, entre elas oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl). As ERNs também apresentam representantes radicalares, como o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$) e não-radicalares, entre eles trióxido dinitrogênio (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), entre outras (HALLIWELL, 2001).

Dentre as EROs o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é uma das espécies mais reativas e danosas ao organismo, responsável por danos oxidativos em biomoléculas (DNA, proteína, lipídeos, aminoácidos, açúcares e metais) e pode ser gerado pela reação de íons metálicos e H_2O_2 , bem

como por ação da radiação ionizante em água (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). O H_2O_2 , formado na reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ no organismo, de forma isolada é um oxidante fraco e estável, apresentando grande capacidade de difundir-se através das membranas celulares. Porém, quando na presença de íons metálicos, em especial o ferro por sua maior biodisponibilidade no organismo, produz o danoso radical $\cdot OH$ (HALLIWELL, 1992; GUTTERIDGE, 1994).

As EROs/ERNs estão envolvidas em processos biológicos, na produção de energia, fagocitose (atuando na eliminação dos agentes patógenos invasores), regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas, no organismo (REMACLE et al., 1995; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; RAJENDRASOZHAN et al., 2008; HALLIWELL et al., 2015). Em condições fisiológicas, as espécies reativas são formadas de forma controlada devido à existência de sistemas antioxidantes. No entanto, quando as taxas de produção das EROs/ERNs aumentam em relação às defesas antioxidantes, uma condição de estresse oxidativo é gerada em função do desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante (EROs/ERNs) e sistema antioxidante (endógeno e exógeno). Nesse contexto, as células formadas por uma membrana bilipídica, proteínas e açúcares sofrem severos danos oxidativos (HALLIWELL, 2001; VASCONCELOS et al., 2007). No estresse oxidativo, a reação das ERs com a estrutura celular (açúcares, lipídeos, proteínas e DNA) dá início ao processo de peroxidação lipídica, agressão protéica, bem como a quebra da cadeia do DNA, o que gera mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas celulares, alteração de fluidez e permeabilidade, podendo ocorrer a ruptura desta, também distúrbios metabólicos, perda da função celular, mutação e morte celular (VASCONCELOS et al., 2007; PISOSCHI; POP, 2015).

A superprodução de EROs/ERNs e/ou produção inadequada de antioxidantes estão relacionadas a complicações na saúde em diversas patogêneses, entre elas o diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, artrite, cataratas, doenças neurodegenerativas e no processo de envelhecimento (DREHER; JUNOD, 1996; CAI; HARRISON, 2000; HALLIWELL, 2001; OZDEMIR et al., 2009; DUGO; NEGIS; AZZI, 2011; RAO et al., 2011; HALLIWELL, 2015).

Nas doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo, acumulação de agregados proteicos e a autofagia são observados. As células neuronais são mais sensíveis ao estresse oxidativo gerado pelas EROs/ERNs, pois apresentam elevada atividade metabólica, uma baixa concentração de antioxidantes, natureza não replicativa, alto teor de lipídeos poli-insaturados (mais susceptíveis a oxidação) e presença de íons metálicos, sendo as mitocôndrias em abundância o principal

local de geração e ação das ERs (SAYRE; PERRY; SMITH, 2008; LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012; COBB; COLE, 2015).

4.3.2 Antioxidantes

O excesso de ERs no organismo pode ser combatido por antioxidantes endógenos, quando produzidos pelo próprio organismo ou exógenos, quando provenientes da dieta. Por definição, antioxidante é qualquer substância que em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne a oxidação do mesmo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995).

Em geral os antioxidantes podem atuar na remoção de íons metálicos, na remoção de EROs ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2), na inibição das reações de iniciação dos radicais ($\cdot OH$, $RO\cdot$, $ROO\cdot$), por inibição da propagação das reações em cadeia e por ligação ou remoção do oxigênio singlete (1O_2) (GUTTERIDGE, 1994).

No sistema biológico os antioxidantes atuam como um mecanismo de defesa contra os efeitos deletérios da reação de oxidação das macromoléculas (lipídeos, proteínas e DNA) produzida pelas EROs/ERNs. De forma endógena, os antioxidantes podem agir enzimaticamente como é o caso da superóxido dismutase (SOD), que catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 e oxigênio (O_2), sendo o H_2O_2 então metabolizado pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GP_x), de forma a impedir sua reação com íons metálicos e a geração do $\cdot OH$, mantendo a concentração de EROs dentro de limites fisiológicos (HALLIWELL, 1994). No entanto a ação da GP_x depende da presença da glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, considerada um importante antioxidante não-enzimático que age em defesa das células contra lesões resultantes da exposição a agentes, como os íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995). Nesse sistema, a remoção do H_2O_2 ocorre em ciclos onde a GSH reduz o H_2O_2 à H_2O através da reação catalisada pela GP_x e assim a GSH é então oxidada ($GS\cdot$), gerando rapidamente glutathiona dissulfeto (GSSG). Esta forma oxidada de GSH é regenerada pela enzima glutathiona redutase (GR) utilizando como coenzima a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (MATÉS, 2000; FERREIRA; ABREU, 2007). Também como defesa antioxidante os sistemas biológicos contam com a presença da enzima tioredoxina redutase (TrxR), que em conjunto com a proteína tioredoxina (Trx) e o NADPH compõe o sistema tioredoxina (LU; HOLMGREN, 2012). Neste sistema, a Trx reduz proteínas oxidadas, GSSG e H_2O_2 tornando-se oxidada e sendo após

reduzida novamente pela ação da TrxR na presença de NADPH (NORDBERG; ARNÉR, 2001) (Figura 7).

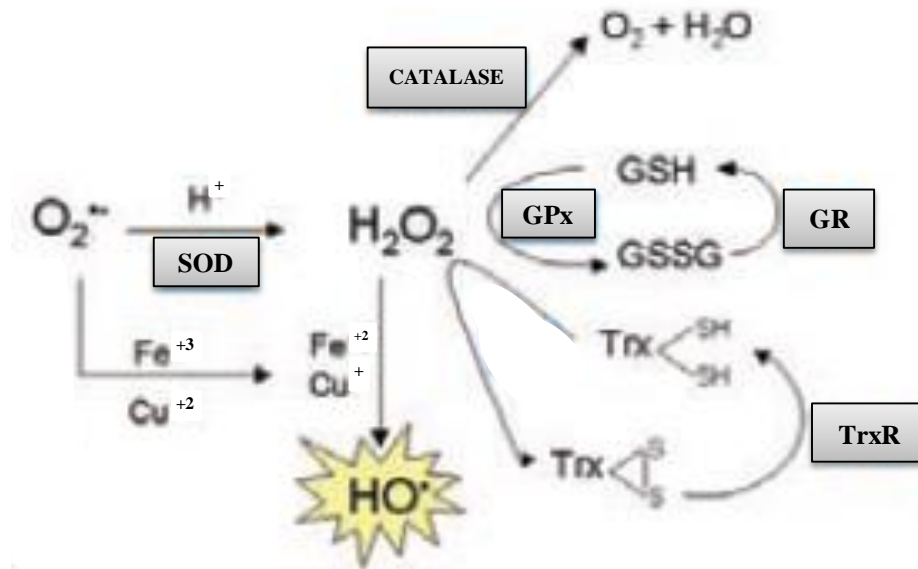


Figura 7 – Principais EROs e reações de remoção de EROs pelos antioxidantes endógenos. O₂^{•-} = radical superóxido; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; ·OH = radical hidroxil; SOD = superóxido dismutase; GPx = glutaciona peroxidase; GR = glutaciona redutase; GSH = glutaciona reduzida; GSSG = glutaciona dissulfeto; Trx = tioredoxina; TrxR = tioredoxina redutase.

Fonte: Adaptado de BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO (2006).

Além da presença dos antioxidantes endógenos, a defesa do organismo contra os danos oxidativos conta com antioxidantes exógenos, entre eles os compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas (C e E) obtidos através do consumo de frutas, hortaliças e grãos (GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2008; DUGO; NEGIS; AZZI, 2011). Em geral os antioxidantes exógenos podem apresentar propriedade de inibição da formação das ERs, por quelatação de íons metálicos ou inibição de enzimas geradoras das ERs, além da propriedade de eliminar as ERs diretamente, inibindo sua reatividade e formando produtos estáveis (BOURNE; RICE-EVANS, 1999).

Os compostos fenólicos são capazes de inibirem a peroxidação lipídica, devido sua capacidade de sequestrar os ERs, tais como o ·OH, O₂^{•-} e ROO• (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Dentre estes, o grupo dos flavonoides possuem uma estrutura molecular ideal para o sequestro de radicais, sendo a atividade antioxidante dependente de sua estrutura, determinada pela reatividade como agente doador de H e elétrons, a estabilidade do radical flavanoil formado, a reatividade frente a outros antioxidantes, a capacidade de quelar íons metálicos e a solubilidade e interação com as membranas do tecido biológico (BARREIROS; DAVID;

DAVID, 2006). O mecanismo da atividade antioxidante dos flavonoides pode ser caracterizado pela eliminação direta das ERs ou pela inibição das enzimas geradoras de ERs (TERAO, 2009). Na interação com a bicamada lipídica das membranas celulares, os flavonoides podem atuar no interior hidrofóbico da membrana, bem como formar ligações de hidrogênio com os grupos polares na interface lipídio-água da membrana. Assim, esses compostos podem induzir alterações nas propriedades físicas, fornecendo uma barreira de proteção contra a oxidação dos lipídeos e proteína celulares, mantendo a estrutura e a função das membranas (OTEIZA et al., 2005; TAROZZI et al., 2010).

O consumo de vegetais ricos em compostos fenólicos, em especial as antocianinas, tem sido associado a prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis relacionadas aos danos provocados pelas EROs/ERNs (BRAVO, 1998), como doenças cardiovasculares (KHOO et al., 2013; FRATANTONIO et al., 2015), cânceres (PRATHEESHKUMAR et al., 2014; PEIFFER et al., 2015), diabetes (YAN et al., 2015) e doenças neurodegenerativas (BADSHAH; KIM; KIM, 2015; GAO et al., 2012). *In vitro*, a cianidina 3-glicosídeo foi capaz de proteger células (SH-SY5Y) do estresse oxidativo, além de reduzir a morte neuronal por apoptose e necrose induzida por peptídeo A β ₂₅₋₃₅ em modelo de Alzheimer (TAROZZI et al., 2010).

Os carotenoides atuam como antioxidantes suprimindo o $^1\text{O}_2$ e se ligando aos ROO $^{\bullet}$, para inibir a peroxidação lipídica. Sua habilidade antioxidante está relacionada às diferentes estruturas químicas, que variam conforme o número de duplas ligações conjugadas, grupos terminais (cíclicos e acíclicos) e grupos funcionais ligados aos anéis (TIRAPEGUI et al., 2002; CHITARRA; CHITARRA, 2005). A desativação do $^1\text{O}_2$ pode ocorrer pela transferência física da energia de excitação do $^1\text{O}_2$ para o carotenoide ou pela reação química entre eles, sendo que 95% da desativação no organismo em condições normais ocorre pela transferência física de energia (PALACE et al., 1999). O sequestro do ROO $^{\bullet}$ ocorre através da adição deste às duplas ligações na estrutura molecular do carotenoide interrompendo a cadeia de propagação da peroxidação lipídica (MORDI; WALTON, 1993).

A oxidação dos carotenoides frente ao $^1\text{O}_2$ e o ROO $^{\bullet}$ pode ser dividida em duas etapas, sendo que na primeira etapa ocorre a formação de éteres cíclicos e compostos carbonílicos e a segunda etapa os produtos primários são convertidos em compostos carbonílicos de cadeias menores, liberando CO $_2$ e ácidos carboxílicos (MORDI; WALTON, 1993; WOODALL et al., 1997; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Na defesa das membranas celulares contra os danos oxidativos, os carotenoides atuam modificando as propriedades físicas da bicamada lipídica, com a diminuição da permeabilidade

e aumento da resistência mecânica, sendo a polaridade de sua estrutura um fator importante (GRUSZECKI; STRZALKA, 2005). Os carotenoides lipossolúveis penetram à bicamada lipídica, sendo que quando apresentam em sua estrutura apenas grupos apolares (carotenos), mantem-se no núcleo hidrofóbico por interação com a fração lipídica da camada, atuando de forma regenerativa, combatendo os radicais formados no interior da membrana (Figura 8). No entanto, as xantofilas (luteína, zeaxantina, astaxantina) que apresentam nas extremidades anéis cíclicos polares (hidrofílicos), ao penetrarem nas células, estendem-se e ancoram os anéis polares às zonas polares opostas da bicamada lipídica, localizando-se próximo à interface hidrofóbico-hidrofílico da membrana (Figura 8). Desta forma, podem tanto reagir com as ERs no interior hidrofóbico, quanto interceptar as ERs na bicamada ainda na fase aquosa extracelular (WOODALL; BRITTON; JACKSON, 1997; GRUSZECKI; STRZALKA, 2005). Neste contexto, uma particularidade é atribuída à luteína que em função de suas ligações duplas conjugadas não se estenderem até o anel da extremidade (diferente da zeaxantina) apresenta uma liberdade rotacional, podendo estar também posicionada horizontalmente no interior hidrofóbico da membrana (Figura 8) (GRUSZECKI; STRZALKA, 2005).

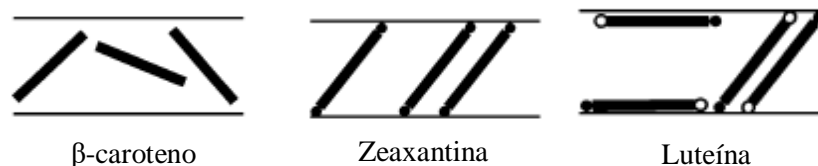


Figura 8 – Representação da localização e orientação dos carotenoides no núcleo hidrofóbico das membranas celulares.

Fonte: Adaptado de GRUSZECKI; STRZALKA (2005).

Vários estudos têm apresentado os efeitos benéficos à saúde relacionados ao consumo de carotenoides devido sua capacidade antioxidante contra os danos oxidativos gerados pelas EROs, que estão associados às doenças crônicas como o câncer (EVANS; JOHNSON, 2010; SHARONI et al., 2012; SINDHU et al., 2013; YAN et al., 2016) e doenças cardiovasculares (SESSO et al., 2004; DANIELS et al., 2014). A luteína e a zeaxantina estão presentes na região ocular (macula) e o consumo destes carotenoides na dieta está associado a efeitos protetores contra a degeneração macular (SNELLEN et al., 2002; SANGIOVANNI et al., 2007; WU et al., 2015) e cataratas (MA et al., 2014). Além disso, alguns carotenoides apresentam a função pró-vitáminica A no organismo, devido a presença do anel β -ionona em sua estrutura molecular, com destaque para o β -caroteno que apresenta dois anéis e então 100% de atividade pró-vitáminica A (LINTIG; VOGT, 2000). Adicionalmente, a deficiência de vitamina A afeta o

desenvolvimento de crianças e está associada a deficiência visual, anemia e baixa resistência a infecções (STAHL; SIES, 2005; OMS, 2013).

4.3.3 Atividade biológica do açaí

Vários estudos *in vitro* avaliaram a capacidade antioxidante da polpa de açaí, por diferentes metodologias (ROJANO et al., 2011; GIRONÉS-VILAPLANA et al., 2014). Kuskoski, Asuero e Troncoso (2005), aplicaram diferentes métodos espectrofotométricos para determinar a atividade antioxidante de polpas de frutas de maior consumo no mercado brasileiro (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá), comercializadas congeladas. O açaí (*E. oleracea*), tanto pelo método DPPH quanto pelo método ABTS, apresentou menor capacidade antioxidante em relação as polpas congeladas de acerola, manga e morango, ocupando a 4ª posição em relação às frutas avaliadas.

Rufino et al. (2010) avaliaram a capacidade antioxidante do fruto de açaí (*E. oleracea*) pelos métodos de ABTS (64,5 $\mu\text{mol TE/g}$), FRAP (220 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$) e ensaio β -caroteno/ácido linoleico (76,1 % O.I.). Kang et al. (2012), pelo método DPPH para os frutos de *E. precatoria* obtiveram 320,3 $\mu\text{mol TE/g}$ de polpa liofilizada e para os frutos de *E. oleracea* 133,4 $\mu\text{mol TE/g}$ de polpa liofilizada.

Schauss et al. (2006b) avaliaram a atividade antioxidante, a partir de extratos de açaí (*E. oleracea*) liofilizado utilizando o método ORAC. Os resultados obtidos foram de 1027 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de polpa liofilizada, sendo 997 $\mu\text{mol TEAC/g}$ na fração hidrofílica e 30 $\mu\text{mol TEAC/g}$ na fração lipofílica. Também Kang et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante de frutos de açaí (*E. precatoria* e *E. oleracea*) pelo método ORAC e o resultado obtido para os frutos de *E. precatoria* foram de 1792,3 $\mu\text{mol TE/g}$ de polpa liofilizada e de 985,9 $\mu\text{mol TE/g}$ de polpa liofilizada para os frutos de *E. oleracea*.

Segundo Del Pozo-Insfran, Brenes e Talcott (2004), as antocianinas presentes em grande quantidade na polpa de açaí são as maiores contribuintes para a ação antioxidante deste fruto e a utilização de uma única metodologia para a determinação da atividade antioxidante não reflete exatamente a capacidade antioxidante total de uma amostra. Desta maneira, o uso de várias metodologias associadas se faz necessário. Adicionalmente, a complexidade do sistema de defesa antioxidante e o envolvimento de diferentes ERs nos sistemas biológicos reforçam a utilização de diferentes metodologias para a avaliação da capacidade antioxidante de um alimento *in vitro* e *in vivo* (SCHAUSS et al., 2006b).

Ensaio químicos de atividade antioxidante *in vitro* geralmente não levam em conta a biodisponibilidade, absorção e metabolismo dos compostos antioxidantes. Assim, estudos com animais e humanos são importantes, embora estes, por sua vez apresentem um elevado custo e necessitam de maior tempo de estudo. Uma alternativa é a utilização de ensaios com culturas de células, que apresentam resultados de forma mais rápida, com uma abordagem sobre a absorção, distribuição e metabolismo dos antioxidantes, também são adequadas para rastreio inicial da ação antioxidante em alimentos (WOLFE; LIU, 2007).

Estudos experimentais sobre o efeito neuroprotetor de compostos bioativos tem feito uso do modelo celular SH-SY5Y (FERNÁNDEZ-MORIANO et al., 2015; VENUPRASAD; KUMAR; KHANUM, 2013; RABELO et al., 2012). A linhagem de células SH-SY5Y é uma sublinhagem clonada três vezes do neuroblastoma SK-N-SH, utilizada desde 1980 como modelo “neuron-like”, devido suas propriedades bioquímicas e funcionais semelhantes aos neurônios (HONG-RONG; LIN-SEM; GUO-YI, 2010).

Os compostos bioativos do açaí (*E. oleracea*) têm sido testados frente a diferentes tipos de linhagens de células. No estudo de Schauss et al. (2006b), a polpa de açaí liofilizada demonstrou uma capacidade antiinflamatória ao inibir as enzimas ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2 em células humanas PMN.

Hogan et al. (2010) investigaram a atividade de extratos de polpa de açaí (*E. oleracea*) liofilizado em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL), sobre a proliferação de células cancerígenas do cérebro de ratos (células C6) e linhagem celular do câncer de mama humano (células MDA-468). Os autores observaram que os extratos suprimiram a proliferação das células C6 de forma tempo e dose dependentes. Entretanto, os extratos não apresentaram nenhum efeito sobre o crescimento de células MDA-468.

Silva et al. (2014) testaram a atividade anticancerígena do açaí (*E. oleracea*) frente a diferentes linhagens de células malignas humanas derivadas da mama (MCF-7 e MDA-MB-468) e do colorretal (Caco-2 e HT-29). Tais células foram tratadas com extratos hidroalcoólicos derivados da casca, semente e fruto total (casca + semente) de açaí em diferentes concentrações (10, 20 e 40 µg/mL). O estudo demonstrou que o açaí possui um potencial anticancerígeno em células de câncer de mama (MCF-7).

Além dos resultados obtidos pelos estudos *in vitro* sobre a capacidade antioxidante, antiproliferativa, antiinflamatória e cardioprotetora da polpa de açaí (MATHEUS et al., 2006; DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006; PACHECO-PALENCIA; HAWKEN; TALCOTT, 2007; KANG et al., 2011; KANG et al., 2012; SILVA et al., 2014), estudos *in vivo*

também vem sendo realizados a fim de comprovar os efeitos benéficos da polpa de açaí (SOUZA et al., 2010).

No estudo de Rocha et al. (2007), diferentes concentrações do extrato aquoso do fruto de açaí (*E. oleracea*) (10 -3000 µg), bem como do extrato a partir das cascas (10 - 1000 µg) e outro a partir das sementes do fruto (0,1 - 100 µg) demonstraram propriedades de vasodilatação quando administrados em ratos, apontando possibilidade no uso medicinal do açaí no tratamento de doenças cardiovasculares. No estudo de Jensen et al. (2008) a maioria do grupo dos voluntários saudáveis (n=12) de 19 a 52 anos apresentou um aumento de antioxidantes e diminuição da peroxidação lipídica no soro 2h após consumir um suco contendo 19 frutas, entre elas predominantemente açaí (*E. oleracea*).

Ribeiro et al. (2010) investigaram a atividade antígeno-tóxica da polpa de açaí (*E. oleracea*) (3,33, 10,0 e 16,67 g/kg do peso corporal) em ratos quando administrada em conjunto com o agente antitumoral doxorubicina (DXR). A DXR apresenta um efeito genotóxico em células *in vitro* e *in vivo* e sua utilização em tratamentos contra o câncer apresenta limitações devido ao aparecimento de efeitos colaterais como a cardiotoxicidade causada por EROs geradas pela DXR. Os resultados demonstraram que a polpa de açaí reduziu a genotoxicidade induzida por DXR no sangue e nas células hepáticas e renais analisadas, podendo ser uma alternativa complementar no tratamento de câncer devido a prevenção de efeitos colaterais gerados pelo antitumoral DXR.

Apesar dos inúmeros efeitos farmacológicos descritos, poucos são os trabalhos avaliando o potencial neuroprotetor do açaí. Spada et al. (2009) observaram que a polpa de açaí (*E. oleracea*) impediu os danos oxidativos induzidos por H₂O₂ em tecido cerebral (córtex cerebral, hipocampo e cerebelo) de ratos, o que sugere uma positiva contribuição do açaí contra o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Poulouse et al. (2012) observaram uma redução dos danos oxidativos e uma redução na concentração de fatores de transcrição relacionados à inflamação em células microgliais de ratos (BV-2) tratadas com diferentes extratos de açaí (*E. oleracea*). Poulouse et al. (2014) avaliaram a polpa de açaí *E. oleracea* e *E. precatória* em células neuronais primárias do hipocampo de ratos e em cultura de célula HT22 e observaram um aumento do comprimento basal dos dendritos, responsáveis pela recepção de estímulos neuronais. Adicionalmente, ambos os extratos apresentaram efeito protetor semelhante em condição de estresse oxidativo. Wong et al. (2013), relataram um efeito protetor do extrato de açaí (*E. oleracea*) em células PC12 expostas a β-amiloide₁₋₄₂ e β-amiloide₂₅₋₃₅, cuja concentração em níveis aumentados são neurotóxicos na doença de Alzheimer.

4.4 PROGRAMA DE MELHORAMENTO DE FRUTOS

Os programas de melhoramento de frutos geralmente priorizam o aumento da vida de prateleira, do rendimento, resistência a doenças e ao transporte, adaptação das plantas a um determinado sistema de cultivo e expandir o período de colheita. No entanto, a crescente busca dos consumidores por alimentos funcionais e o aumento de pesquisas na área têm incentivado os programas de melhoramento na busca de frutos com maiores teores de compostos bioativos, o que pode possibilitar o aumento da ingestão de antioxidantes (SCALZO et al., 2005). Também, outros atributos de qualidade são considerados pelos programas de melhoramento entre eles a forma, tamanho, firmeza, cor, a doçura e acidez combinadas ao aroma e sabor dos frutos (CAPOCASA et al., 2008).

Kraujalytė et al. (2015) com o objetivo de avaliar a composição fenólica e as propriedades antioxidantes de genótipos de mirtilos (*Vaccinium corymbosum* e *Vaccinium uliginosum*) observaram uma variação no teor de fenólicos totais de 0,85 a 2,81 mg GAE/mL e no teor de antocianinas totais de 0,17 a 14,19 mg/100mL. As propriedades antioxidantes apresentaram uma variação de 6,38 a 20,9 $\mu\text{mol Trolox/g}$ pelo método ABTS, 3,07 a 17,8 $\mu\text{mol Trolox/g}$ pelo método FRAP e 4,21 a 45,68 $\mu\text{mol Trolox/g}$ pelo método ORAC. As variações observadas foram atribuídas as diferenças genéticas dos mirtilos estudados, pois tanto o cultivo como as condições climáticas foram iguais para todos os genótipos, além do preparo das amostras, procedimentos de extração, solventes utilizados e manuseio após a extração.

Pertuzzati et al. (2014) atribuíram as diferenças significativas nos teores de compostos bioativos (compostos fenólicos, antocianinas e carotenoides) e atividade antioxidante (ABTS, ORAC, FRAP, ensaio β -caroteno/ácido linoleico) de mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L. e *Vaccinium ashei* Reade) às diferenças genéticas, local de produção e ano de cultivo (2010 vs. 2012).

Dubey et al. (2015) ao avaliar 25 genótipos de pimenta (*Capsicum* spp.), observaram uma variação no conteúdo de compostos fenólicos totais de 5,3 a 26,8 mg GAE/g e no total de carotenoides de 0,09 a 7,72 mg/100g, bem como uma variação na atividade antioxidante de 15,3% a 60,7% pelo ensaio β -caroteno/ácido linoleico.

Jacopo et al. (2015) ao estudar 10 genótipos de morangos (*Fragaria* spp.) observaram diferenças significativas entre o teor de SS (6,14 a 10,0 °Brix), AT (9,55 a 18,33 meq. NaOH/100g), fenólicos totais (1100 a 2543 mg GAE/kg), antocianinas totais (143 a 691 mg pelargonidina 3-glicosídeo/kg) e capacidade antioxidante total pelo método ABTS (10,2 a 24,5 mmol Trolox/kg).

Moehninsi, Navarre e Brown (2015) avaliaram genótipos de tomates lichia (*Solanum sisymbriifolium* Lam.) e relataram diferenças significativas nos teores de β -caroteno (20,35 – 63,25 mg/100g), zeaxantina (0,028 – 0,183 mg/100g), luteína (0,30 – 1,1 mg/100g), compostos fenólicos (6,8 – 10,4 mg GAE/g), ácido ascórbico (204,2 – 451,1 mg/g) e a atividade antioxidante medida pelo método FRAP (148 – 242 μ mol Trolox/g) e DPPH (113,4 – 154,3 μ mol Trolox/g).

Variações em parâmetros de qualidade, composição nutricional e no teor de compostos bioativos relacionadas a variabilidade genética também foram relatadas na avaliação de 22 genótipos de abóbora (*Cucurbita pepo* L.) no estudo de Martínez-Valdivieso et al. (2015). No estudo de Mazur et al. (2010) as variações nos parâmetros de qualidade (matéria-seca, pH, SS e AT), compostos fenólicos e teores de antocianinas de 10 genótipos de framboesa (*Rubus idaeus* L.) foram atribuídas a variabilidade genética e pela época de colheita, uma vez que as amostras foram colhidas no período de 2009 a 2011.

Em relação ao açaí, a destruição dos açaizais de forma sistemática, ilegal, desordenada e clandestina na década de 80, para produção do palmito, provocou sérios danos ao meio ambiente, comprometendo a sobrevivência das populações extrativistas (SILVA; TASSARA, 2005). Assim, devido a importância do açaí na dieta da população amazônica e sendo este responsável por boa parte da renda familiar da população ribeirinha, surgiu a necessidade de desenvolvimento de novas técnicas de manejo dos açaizais nativos, desbaste racional das touceiras e brotações, bem como a seleção de plantas mais adequadas para a produção de frutos e/ou de palmito, visando a possibilidade de aumento da produção de açaí e da produtividade das palmeiras, o que pode tornar o aproveitamento comercial da planta ainda mais lucrativo (SILVA; TASSARA, 2005) e incentivar os programas de melhoramento do açaí.

Atualmente o programa de melhoramento do açaí (*E. oleracea*) desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental busca a produção de frutos na entressafra e uma maior produtividade, com o intuito de suprir a demanda crescente pelo fruto tanto nacional quanto internacional (FARIAS NETO; RESENDE; OLIVEIRA, 2011). Assim, no ano de 2004 foi lançada a cultivar BRS Pará, cujo cultivo ocorre em áreas de terra firme, apresenta precocidade de frutificação, alto rendimento da planta e de polpa (15 a 25%) (OLIVEIRA; FARIAS NETO, 2004).

A polpa de açaí (*E. oleracea*) do cultivar BRS Pará, proveniente do programa de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental, foi avaliada por Cohen et al. (2009). Este cultivar apresentou pH de 4,80, AT de 0,09 % ácido cítrico, teor de SS de 1,8 °Brix, sólidos totais de 10,44 %, cinzas de 0,19 %, proteínas de 19,69 %, lipídeos de 40,92 %, polifenóis totais

de 3964,60 mg/100g, antocianinas de 45,31 mg/100g (método de pH diferencial) e a atividade antioxidante de 232,76 μ mol de Trolox/g de polpa (método ABTS).

O cultivar BRS Pará também foi avaliado no estudo de Carvalho et al. (2010), em relação as características de pH (4,89), SS (5,80 °Brix), AT (0,18 % ácido cítrico), sólidos totais (11,47 %), cinzas (3,79 %), fibras totais (17,11 %), proteínas (8,76 %), lipídeos (41,02 %), antocianinas por pH diferencial (4016,10 mg/kg) e taninos (8762,70 mg/kg) enquanto no estudo de Rufino et al. (2011), menores teores de proteínas (6,27 %), cinzas (1,99 %) e lipídeos (20,82%) foram relatados.

Em relação a estudos comparativos de genótipos de açaí (*E. oleracea*) desenvolvidos por programas de melhoramento, Cunha et al. (2013) avaliaram 4 genótipos de açaí cultivados na área experimental da Embrapa Acre e não observaram diferenças significativas nos teores de umidade (90,37 %), lipídeos (3,07 %), proteínas (0,99 %), fibra total (3,09 %), carboidratos (2,12 %), SS (3,71 °Brix) e pH (5,13). Diferenças significativas foram observadas somente nos teores de cinzas (0,26 – 0,50 %) e antocianinas (12,66 – 41,73 mg/100g) quantificadas pelo método de pH diferencial.

Souza et al. (2009) avaliaram 8 genótipos de açaí (*E. oleracea*) cultivados na área experimental da Embrapa Tropical (Fortaleza, CE) e observaram diferenças estatísticas nos teores de ácido ascórbico (45,60 – 80,81 mg/100g), carotenoides totais (3,88 – 6,23 mg/100g, método espectrofotométrico), antocianinas (73,52 – 143,62 mg/100g, método de pH diferencial), polifenóis extraíveis (528,03 – 691,21 mg/100g) e na atividade antioxidante (50 – 75%, ensaio β -caroteno/ácido linoleico).

Apesar dos estudos citados, poucos estudos comparativos de genótipos de açaí têm sido divulgados. Além disso, a busca pelo consumidor por frutos ricos em compostos bioativos, bem como a avaliação do conteúdo destes compostos em diferentes genótipos e sua capacidade antioxidante são fatores importantes a serem considerados pelos programas de melhoramento do açaí. Isso resultaria em base de informações para a seleção de genótipos promissores e o desenvolvimento de novos cultivares com atributos melhorados.

CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

As análises de compostos bioativos e atividade antioxidante das polpas de açaí (*E. oleracea*) foram realizadas no Laboratório de Compostos Bioativos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As análises físico-químicas e de composição centesimal foram realizadas no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental e as análises com células SH-SY5Y foram realizadas no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)-UFRGS.

5.1 MATERIAL

Os frutos de seis genótipos de *E. oleracea*, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, foram colhidos no estágio completo de maturação, quando apresentaram uma coloração violeta e uma mucilagem branca sobre a superfície, no período entre novembro/2014 e fevereiro/2015. Dentre os genótipos avaliados, cinco são novos genótipos codificados em função da localização da planta matriz no BAG, sendo L09P09, L22P13, L11P09, L06P13 e L04P16. O genótipo BRS-PA_{MISTA} é uma cultivar já lançada no mercado pelo programa de melhoramento. Uma amostra comercial foi obtida no comércio de Belém/PA e utilizada como amostra padrão.

5.1.1 Preparo do material

Os frutos dos seis genótipos e a amostra comercial foram lavados em água corrente e sanitizados por imersão em solução clorada (30 mg/L por 15 min). Após uma nova lavagem com água corrente para remoção do cloro residual, os frutos foram mantidos em água à 60 °C por 15 min, para facilitar a etapa de despulpamento em um extrator vertical de pás (MB Braesi, Belém-PA, Brasil) com peneira de diâmetro de 0,7 mm de abertura de malha e capacidade de 2 kg de fruto por batelada. Nesta etapa, água foi adicionada na proporção 2:1 (fruto:água). Em seguida, a polpa foi liofilizada (Liotop, modelo L101), acondicionada em sacos de polietileno, mantidas protegidas da luz à -18 °C até o envio ao ICTA/UFRGS para realização das análises.

5.2 METODOLOGIA

As análises foram realizadas conforme fluxogramas apresentados na Figura 9, sendo as metodologias descritas no decorrer deste capítulo. O fluxograma A corresponde aos métodos aplicados no manuscrito 1 e o fluxograma B corresponde ao manuscrito 2.

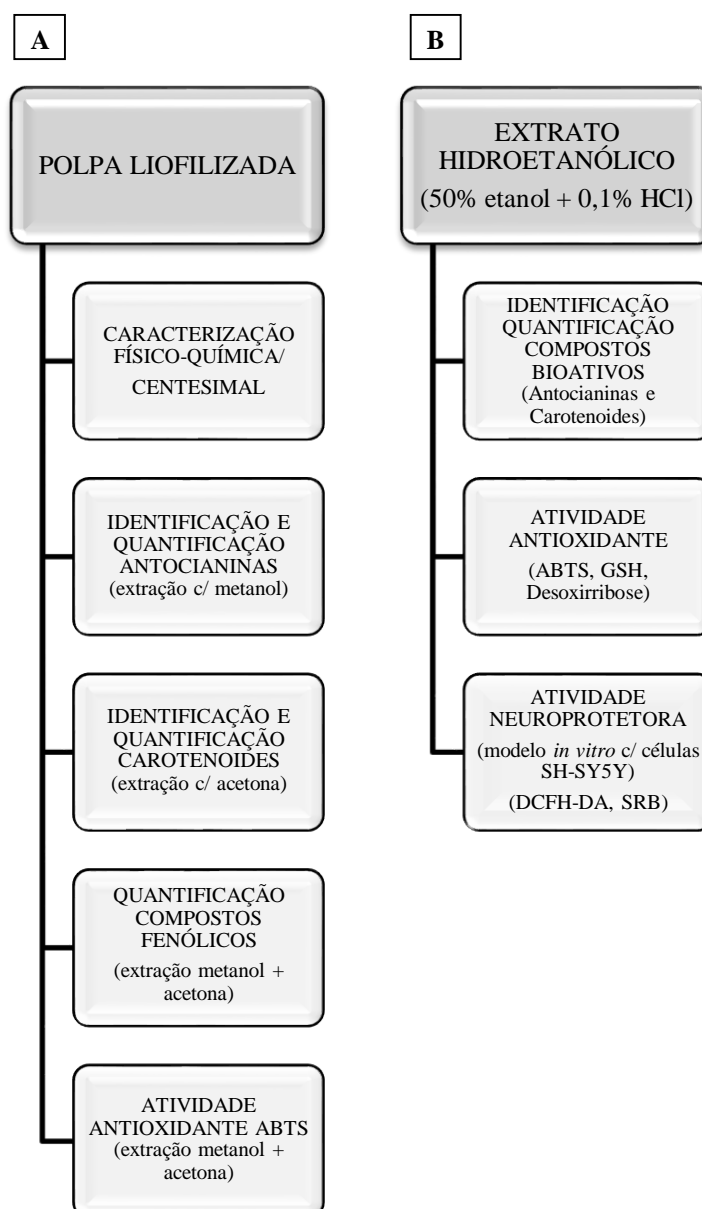


Figura 9 - Esquema geral das análises realizadas para seis genótipos de açaí e uma amostra comercial.
Fonte: Autor

5.2.1 Composição centesimal e características físico-químicas das polpas de açaí

As polpas liofilizadas de açaí foram caracterizadas quanto aos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, fibras totais, carboidratos, pH, SS e AT. O teor de umidade foi

determinado pelo método gravimétrico, em estufa a 105 °C, até a obtenção de peso constante enquanto as cinzas foram determinadas por calcinação em mufla a 550 °C, durante 12 h. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl com um fator de conversão de 6,25 e o teor de lipídeos foi obtido em um extrator Soxhlet (AOAC, 1997). O conteúdo de fibras totais foi obtido pelo método de detergência (GOERING; VAN SOEST, 1970) e o teor de carboidratos foi determinado por diferença. Os resultados foram expressos como gramas por 100 gramas de amostra seca.

O valor de pH foi determinado por leitura direta em potenciômetro (Tecnal, Tec-3MP) enquanto a AT foi determinada por meio de titulação da amostra com uma solução de NaOH (0,1 mol/L) com o auxílio de um pHmetro e expressa em porcentagem de ácido cítrico. O teor de SS totais foi quantificado por leitura direta em refratômetro digital portátil (Reichert, TSMeter-DSP) à temperatura de 25 °C, sendo os resultados expressos em °Brix (AOAC, 1997). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.2 Identificação e quantificação de antocianinas

As antocianinas foram exaustivamente extraídas de 0,5 g de cada polpa liofilizada de açaí, com o uso de metanol acidificado com ácido clorídrico (1%) como solvente e agitação por ultra-turrax (IKA, T25, China). Os extratos foram filtrados e acondicionados em frascos âmbar, sob temperatura de refrigeração até o momento da análise (ZANATTA et al., 2005).

Em um segundo momento, com o intuito de obter extratos que futuramente pudessem ser aplicados em alimentos, utilizou-se uma solução hidroetanólica (50%) acidificada com ácido clorídrico (0,1%), como solução extratora de grau alimentício (GÓMEZ-PLAZA; MIÑANO; LÓPEZ-ROCA, 2006). Assim 0,5g de cada polpa liofilizada foram homogeneizadas com 25 mL da solução extratora, mantidas sob agitação mecânica por 40 min, e posterior filtração à vácuo. Estas etapas foram repetidas por 3 vezes, totalizando 2 h de extração e 75 mL de extrato, que posteriormente foram ajustados a 100 mL em um balão volumétrico. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração até o momento da análise (ROKENBACH et al., 2008).

As antocianinas foram identificadas e quantificadas logo após o preparo dos extratos por CLAE, através de um cromatógrafo (Agilent série 1100) equipado com um sistema solvente quaternário de bombeamento e um detector UV/Visível. Uma coluna de fase reversa C18 polimérica Shim-pak, modelo CLC-ODS (5 µm x 250 mm x 4,6 mm) foi utilizada para a separação dos pigmentos, como fase móvel um gradiente linear de eluição de ácido fosfórico

(4%) e acetonitrila na proporção 85:15 para 20:80 (v/v) no decorrer de 30 minutos foi utilizado. O fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL/min e a temperatura da coluna mantida em 29 °C. Os cromatogramas foram obtidos em um comprimento de onda fixo de 520 nm característico para as antocianinas (ZANATTA et al., 2005).

A identificação e quantificação das antocianinas foi realizada por comparação dos tempos de retenção e áreas dos picos das amostras e dos padrões adquiridos da empresa Sigma Chemical (EUA), nas mesmas condições cromatográficas. Para a quantificação dos pigmentos, curvas padrão foram construídas a partir das áreas obtidas para os padrões de cianidina 3-glicosídeo na faixa de concentração de 3-37 µg/mL e cianidina 3-rutinosídeo 1-25 µg/mL. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados (ERTAS; ÖZER; ALASALVAR, 2007) como sendo 0,169 e 0,565 µg/g para cianidina 3-glicosídeo e 0,955 e 0,967 µg/g para cianidina 3-rutinosídeo, respectivamente.

5.2.3 Identificação e quantificação de carotenoides

A extração exaustiva dos carotenoides da polpa de açaí foi realizada conforme o método descrito por Mercante, Britton e Rodriguez-Amaya (1998), sendo as principais etapas: (i) extração dos pigmentos com acetona por agitação com ultra-turrax; (ii) saponificação com 10% KOH em metanol por uma noite à temperatura ambiente; (iii) remoção do álcali; (iv) concentração do extrato em um evaporador rotatório (Fisatom, modelo 801) ($T < 25$ °C) até secagem completa utilizando fluxo de nitrogênio; (v) armazenamento em freezer a uma temperatura de -18 °C, para posterior quantificação por CLAE.

Nos extratos hidroetanólicos, a fração lipofílica foi obtida pela utilização de uma mistura de éter de petróleo e éter etílico adicionada ao extrato hidroetanólico. Após alguns segundos, a separação de fases podia ser realizada com a utilização de um funil de separação. As demais etapas de saponificação, remoção do álcali, concentração, secagem e armazenamento foram mantidas.

Para a análise, o extrato concentrado foi diluído em éter terc-metil-butílico (MTBE- J. T. Baker, EUA - pureza 99,96 %), colocado em ultrassom (Unique, modelo USC 1400) por 1 min e filtrado em filtro (Millex LCR 0,45 µm, 13 mm) para posterior injeção no cromatógrafo (Agilent série 1100), descrito anteriormente. Para separação dos carotenoides foi utilizada uma coluna de fase reversa C30 polimérica YMC, modelo CT99SO3-2546WT (3 µm x 250 mm x 4,6 mm), sendo a fase móvel água:metanol:MTBE a partir das proporções de 5:90:5, atingindo 0:95:5 em 12 minutos, 0:89:11 em 25 minutos, 0:75:25 em 40 minutos e, finalmente, 00:50:50

em 60 minutos, com um fluxo de 1 mL /min e a coluna mantida na temperatura de 33 °C. Os cromatogramas foram processados em um comprimento de onda fixo de 450 nm característico para carotenoides (ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

A identificação e quantificação dos carotenoides foi realizada por comparação dos tempos de retenção e áreas dos picos das amostras e dos padrões correspondentes, nas mesmas condições cromatográficas. Para a quantificação dos pigmentos, curvas padrão foram construídas, cujas faixas de concentração estão descritas na Tabela 2, bem como os dados comerciais e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados (ERTAS; ÖZER; ALASALVAR, 2007).

Tabela 2 – Dados comerciais, faixas de concentração, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos padrões de carotenoides.

Carotenoides	Empresa	Pureza	Faixa de concentração (µg/mL)	LD (µg/g)	LQ (µg/g)
Luteína	Indofine Chemical (EUA)	>95%	1-65	$6,9 \times 10^{-3}$	$1,15 \times 10^{-2}$
Zeaxantina	Sigma Chemical (EUA)	>95%	1-40	$9,56 \times 10^{-2}$	$1,59 \times 10^{-2}$
α -caroteno	Sigma Chemical (EUA)	>95%	2-25	$1,97 \times 10^{-2}$	$3,28 \times 10^{-2}$
β -caroteno	Sigma Chemical (EUA)	>93%	5-50	$6,53 \times 10^{-2}$	$10,89 \times 10^{-2}$

O conteúdo aproximado de Vitamina A foi calculado a partir das concentrações de β -caroteno obtida para os extratos exaustivos, considerando o fator de bioconversão de 13 mg de β -caroteno em 1 mg de retinol (vitamina A) proposto por Guiland e Lequeu (1995).

5.2.4 Quantificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram quantificados a partir de extratos elaborados com 0,5 g de polpa liofilizada de açaí homogeneizada com metanol 50% em ultra-turrax (40 mL por 2min). Após 1 h de repouso, o extrato foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (Sigma, modelo 4K 15, Inglaterra) por 15 min à 15000 rpm, o sobrenadante foi retirado e o resíduo homogeneizado com acetona 70% em ultra-turrax (40 mL por 2 min). Após 1 h em repouso, o extrato foi centrifugado por 15 min à 15000 rpm, os sobrenadantes das duas etapas foram

misturados em balão volumétrico e o volume final ajustado a 100 mL (LARRAURI; RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 1997). O método aplicado foi o de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959) onde 20 µL de cada extrato foram adicionados a 1,58 mL de água e 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Para neutralizar a mistura foram adicionados 300 µL de uma solução tampão de carbonato de sódio (Na₂CO₃). Após 120 minutos de reação na ausência de luz e temperatura ambiente, as amostras foram avaliadas por espectrofotometria (Amersham Biosciences, modelo Ultrospec 3100 pro, Inglaterra) a 765 nm e a quantificação foi realizada pela construção de uma curva padrão de ácido gálico na faixa de concentração de 0 – 0,5 mg/mL.

5.2.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

5.2.5.1 Atividade antioxidante pelo método ABTS

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método baseado na captura do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (Sigma Chemical, EUA) (KUSKOSKI; ASUERO; TRONCOSO, 2005), dois tipos de extração foram utilizadas a partir das polpas liofilizadas de açaí, um deles foi obtido pela extração com metanol (50%) e acetona (70%), conforme descrito no item 4.2.4 e o outro foi obtido pela extração hidroetanólica (50%) descrito anteriormente, usando três diferentes diluições (0,5, 5,0 e 50 µg/mL). Para aplicação do método, primeiramente foi produzido o radical ABTS formado pela reação de 5 mL de uma solução estoque de ABTS (7mM) com 88µL de persulfato de potássio (140mM). A solução foi mantida em repouso por 16 h, sob proteção da luz e após o radical foi diluído em etanol até uma absorvância de $0,700 \pm 0,05$ a 734nm (Amersham Bioscience, modelo Ultrospec 3100 pro, Inglaterra). Em seguida, uma alíquota de 30 µL de cada diluição dos extratos preparados foi adicionada a 3,0 mL do radical ABTS, sendo a leitura da absorvância realizada a 734 nm após 6 min de reação.

Para os extratos preparados a partir de metanol (50%) e acetona (70%) os resultados foram expressos em concentração micromolar equivalente ao Trolox por grama (base seca), através de curvas padrão construídas a partir de soluções de diferentes concentrações de Trolox (100 – 2000 µM). Para os extratos hidroetanólicos (50%), os valores de absorvância obtidos foram relacionados a porcentagem de geração do radical ABTS, a fim de avaliar o potencial das diferentes diluições dos extratos de açaí em reduzir a geração do radical ABTS. Neste caso,

Trolox (5 µg/mL) foi utilizado com antioxidante padrão. O cálculo da geração do radical ABTS foi realizado conforme equação a seguir:

$$\% \text{ Geração ABTS}^{\cdot+} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Onde a $\text{Abs}_{\text{controle}}$ = absorvância do radical ABTS em etanol e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = absorvância da solução do radical ABTS na presença dos extratos hidroetanólicos de açaí e Trolox.

5.2.5.2 Capacidade de remoção do radical hidroxil – teste da desoxirribose

A capacidade dos extratos hidroetanólicos (50%) dos diferentes genótipos de açaí em remover o $\cdot\text{OH}$ formado a partir da reação de Fenton, foi avaliada através do método da degradação da desoxirribose, descrito por Halliwell, Gutteridge e Aruoma (1987). Neste método o radical $\cdot\text{OH}$ foi gerado pela reação do cloreto férrico (FeCl_3) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na presença de ácido ascórbico, que reage formando Fe^{2+} -EDTA e que por sua vez reage com H_2O_2 para formar Fe^{3+} -EDTA e $\cdot\text{OH}$ através da reação de Fenton. Após formado, o radical $\cdot\text{OH}$ pode reagir com o 2-desoxirribose formando malondialdeído, que em aquecimento com o ácido tiobarbitúrico (TBA) apresenta uma coloração rosa quantificável por espectrofotometria a 532 nm. Assim substâncias antioxidantes adicionadas podem competir com 2-desoxirribose pelo $\cdot\text{OH}$ produzindo uma redução na coloração rosa. Em tubos de ensaio foram adicionados (FeCl_3) (1 mM), EDTA (1 mM), ácido ascórbico (2 mM), H_2O_2 (10 mM), tampão fosfato de potássio (50mM) (pH 7,4), 2-desoxirribose (Sigma Chemical, EUA) e as diferentes concentrações dos extratos hidroetanólicos de açaí (0,5, 5,0 e 50 µg/mL) e Trolox (75 µg/mL) utilizado como antioxidante padrão. O meio reacional foi mantido em aquecimento a 37 °C por 1 h e após adicionado TBA e ácido clorídrico (25%), os tubos foram mantidos sob aquecimento a 100 °C por 15 min. Após esse período, foram resfriados à temperatura ambiente e a absorvância foi medida a 532 nm. Os resultados foram calculados utilizando a fórmula a seguir:

$$\% \text{ Geração de } \cdot\text{OH} = 100 - [A0 - (A1 - A2)] \times 100 / A0$$

Onde $A0$ = absorvância na ausência de extrato e presença da desoxirribose, $A1$ = absorvância na presença de extrato e presença da desoxirribose e $A2$ = absorvância na presença de extrato e ausência da desoxirribose.

5.2.5.3 Capacidade de proteção da glutathiona (GSH)

A capacidade de proteção dos extratos hidroetanólicos (50%) de açaí contra a oxidação da GSH (Sigma Aldrich, EUA) foi avaliada na presença de H₂O₂ (Vetec Química, BR) através da quantificação do desaparecimento dos grupos sulfidril (-SH) da GSH. Em tubos de ensaio a GSH (6 mM) foi adicionada ao tampão fosfato de potássio (1M) (pH 6,8), H₂O₂ (5 mM), diferentes concentrações dos extratos hidroetanólicos de açaí (0,5, 5,0 e 50 µg/mL) e Trolox (75 µg/mL) utilizado como antioxidante padrão. Os tubos foram mantidos em repouso à temperatura ambiente por 120 min e após término da incubação, 100µL da solução incubada foram adicionados à 2 mL de 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzóico) (DTNB) (Sigma Chemical, EUA). A mistura foi agitada em vortex e após 5 min de reação, a intensidade da coloração amarela foi avaliada por espectrofotômetro a 412 nm (ELLMAN, 1959). Os resultados foram calculados como porcentagem de grupos sulfidril da GSH.

5.2.6 Avaliação do efeito neuroprotetor *in vitro*

5.2.6.1 Cultura de células

Para a avaliação do efeito neuroprotetor dos extratos hidroetanólicos (50%) de açaí foram utilizadas células SH-SY5Y, uma linhagem derivada de neuroblastoma humano. Esta linhagem exibe propriedades bioquímicas e funcionais semelhantes a neurônios humanos e tem sido utilizada como modelo celular *in vitro* para estudo de possíveis mecanismos de neurotoxicidade (RABELO et al., 2012).

As células SH-SY5Y foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil) e foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1) acrescido de 10% de soro fetal bovino, mantidas a 37 °C em ambiente umidificado com 5% de CO₂. O meio de crescimento celular foi substituído a cada 2 dias e os tratamentos foram realizados quando as células atingiram 90% de confluência.

5.2.6.2 Ensaio da diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA)

O efeito dos extratos hidroetanólicos dos diferentes genótipos de açaí sob produção de espécies reativas intracelular na ausência e na presença de H₂O₂ foi determinado pelo método

descrito por Wang e Joseph (1999). Neste método, a capacidade da 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma Chemical, EUA) em ser oxidada a diclorofluoresceína altamente fluorescente (DCF), na presença de ERs pode ser utilizada como um índice do nível de EROs e ERNs no ambiente celular. As células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços e 100 μ M de DCFH-DA foram dissolvidos em meio contendo soro fetal bovino (1%). Após um período de incubação de 2h para permitir a incorporação celular da DCFH-DA, o meio foi descartado e as células foram tratadas com extratos hidroetanólicos de açaí em diferentes concentrações (0,5, 5,0 ou 50 μ g/mL) e Trolox (250 μ M) isoladamente ou na presença de H₂O₂ (0 ou 500 μ M). A fluorescência da DCF foi lida após 1 h de incubação a 37 °C utilizando um leitor de placas de fluorescência (Spectra Max M2, Molecular Devices, EUA) com um comprimento de onda de excitação fixado em 485 nm e de emissão fixado a 535 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de fluorescência DCF.

5.2.6.3 Viabilidade celular

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) foi utilizado a fim de determinar se os extratos hidroetanólicos dos genótipos de açaí poderiam afetar a viabilidade celular *per se*. Este método baseia-se na quantificação do teor de proteínas celulares (células viáveis) por coloração utilizando o corante SRB (Sigma Chemical, EUA) (SKEHAN et al., 1990). As células SH-SY5Y foram cultivadas conforme descrito no item 5.2.6.1. Após descarte do meio, as células foram tratadas com extratos hidroetanólicos dos genótipos avaliados de açaí na maior concentração utilizada nos demais testes (50 μ g/mL) e que possivelmente poderia gerar citotoxicidade. Após 1 h de incubação a 37 °C, o tratamento foi removido das placas e as células foram fixadas pela adição de 100 μ L com ácido tricloroacético (TCA) 40% durante 1 h a 4 °C. Após, o sobrenadante foi removido, as placas lavadas 5 vezes com água deionizada e deixadas para secar a temperatura ambiente. SRB (50 μ L; 0,4% em ácido acético a 1%) foi adicionada a cada poço e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com ácido acético 1% (4 vezes) para remoção da SRB não aderente às células e deixadas secar a temperatura ambiente. 100 μ L do tampão Tris 10 mM (pH 10,5) foram adicionados para diluição da SRB e a absorbância foi lida em um leitor de placas no comprimento de onda fixado em 515 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de incorporação da SRB. A morfologia celular também foi analisada em microscópio (Nikon Eclipse TE 300) por profissional sem conhecimentos dos grupos experimentais.

5.2.7 Cálculo da concentração inibitória 50

A concentração inibitória 50 (IC₅₀) dos diferentes testes (ABTS, desoxirribose e DCFH-DA) foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. (La Jolla, CA, EUA). Os valores de IC₅₀ para o ensaio de DCFH-DA foram calculados como a concentração dos extratos hidroetanólicos dos diferentes genótipos de açaí para inibir 50% do aumento na fluorescência da DCF induzida por H₂O₂. Para os ensaios de ABTS e desoxirribose, consideraram-se os valores de IC₅₀ aqueles que inibiram 50% da geração dos radicais ABTS e •OH, respectivamente.

5.2.8 Análise estatística

Os parâmetros relacionados as características físico-químicas, composição centesimal e a quantificação dos teores de compostos bioativos nos diferentes extratos da polpa liofilizada dos genótipos de açaí foram analisados em triplicata e os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey. Adicionalmente, foram realizadas análises de componentes principais (ACP) e da correlação de Pearson. Os ensaios antioxidantes *in vitro* foram efetuados com n = 3, enquanto os testes com cultura de células foram realizados com n = 6 (6 poços por grupo). Ambos os ensaios foram repetidos em três dias diferentes e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os dados foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida por teste de Tukey. A relação entre o conteúdo de compostos bioativos (antocianinas totais e carotenoides totais) nos extratos hidroetanólicos dos diferentes genótipos e a concentração inibitória 50 (IC₅₀) calculada para os ensaios de ABTS, desoxirribose e DCFH-DA foi avaliada pela correlação de Pearson. Em todos os casos foram consideradas diferenças significativas quando p < 0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 12 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

CAPÍTULO 3 – MANUSCRITOS

**MANUSCRITO 1: Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of
açaí (Euterpe oleracea) genotypes**

Manuscrito em preparação para submissão ao periódico
Journal of Agricultural and Food Chemistry

Priscila do Carmo M. R. Torma¹, Patric de Lima Monteiro¹, Ana Vânia Carvalho², André Jablonski³, Simone Hickmann Flôres¹, Paula Rossini Augusti¹, Alessandro de Oliveira Rios^{1,*}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil.

² Embrapa Amazônia Oriental, Av. Dr. Enéas Pinheiro, s/n – Marco, Belém, PA, CEP: 66095-100, Brazil.

³ Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 75, Campus do Vale, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil.

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea*) is a Brazilian Amazon fruit with high nutritive value due its high content of lipids, proteins and fibers, besides bioactive compounds, such as anthocyanins, carotenoids and phenolic compounds in its composition. The aim of this work was study six different genotypes of *açaí*, evaluating their physicochemical characteristics and proximal composition, major bioactive compounds and antioxidant activity. The L06P13 and L09P09 genotype presented higher content of total fiber, carbohydrates and ashes when compared to commercial sample used as standard. Furthermore, L22P13 genotype showed highest content of total anthocyanins (6745.81 mg/100g), total carotenoids (118 µg/g) and antioxidant activity (674.83 µM Trolox/g) when compared to commercial sample. The results revealed promising *açaí* genotypes and support the importance of advances in breeding programs for this fruit.

Keywords: breeding; anthocyanins; carotenoids; antioxidant activity.

INTRODUCTION

Oxygen is essential for human life and it is responsible for production of reactive oxygen species (ROS) in the body.¹ At low concentrations, ROS play important roles in intracellular signaling pathways and defense against pathogens. However, an overproduction of ROS is responsible for oxidative stress and can be related to pathogenesis of various diseases such as diabetes, cardiovascular and neurodegenerative disease, cancer, arthritis and aging process.^{1,2} In this context, antioxidants, endogenous and exogenous, stand out as a defense mechanism protecting the biological system against the harmful effects of oxidation reactions produced by ROS.²

Fruits and vegetables are sources of exogenous antioxidants due to the presence of bioactive compounds, such as phenolic compounds, vitamins C and E, and carotenoids. It is also known that diets rich in fruits and vegetables are associated with prevention of chronic and degenerative pathologies associated with oxidative stress.³

Açaí is a fruit from a native palm of Brazilian Amazon region, considered a “superfruit” due to its high nutritional value, related to its levels of lipids, fiber, protein and minerals, as well as, its content of bioactive compounds with antioxidant properties.⁴ *Açaí* is a source of a high amount of phenolic compounds, especially anthocyanins. These pigments are associated to some pharmacological and medicinal properties, including anti-carcinogenic⁵ and protective effects in cardiovascular⁶ and neurological diseases.⁷

Açaí also provides carotenoids in its composition, which act as antioxidants and are involved in scavenging singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and peroxy radicals (ROO^\cdot), inhibiting lipid peroxidation.³ Several studies have reported a correlation between consumption of foods rich in carotenoids and reduction in risk of developing chronic diseases, including different cancers,⁸ age related macular degeneration and cataract formation.⁹

Breeding programs aim to develop new varieties in aspects related to plant adaptation, resistance to diseases, yield, size, firmness, color and aroma of fruits.^{10,11} Recently, the increase in demand of foods with functional properties has stimulating production of vegetables with larger contents of bioactive compounds by these programs.¹² Different genotypes of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) had higher antioxidant properties when compared with other well-known genotypes.¹¹ However, few studies about *açaí* genotypes comparison, as well as anthocyanins and carotenoids profile were carried out until this moment.¹³⁻¹⁶

Once the knowledge about physicochemical, proximate composition and bioactive compounds of different *açaí* genotypes is essential for nutritional purposes, selection of promising genotypes and continuity of breeding programs, this study aimed to evaluate these parameters, as well as antioxidant activity related to bioactive compounds.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

The fruits of six *açaí* genotypes from Active Germplasm Bank (AGB) of Embrapa Amazônia Oriental (Belém, Brazil) were harvested from November 2014 to February 2015 fully ripe, when presented a violet color with white mucilage on the surface. The genotypes were encoded according to location of matrix plant at AGB as follow: L09P09, L22P13, L11P09, L06P13, L04P16 and BRS-PAMISTA. The last one is a cultivar developed by Embrapa Amazônia Oriental and has already launched in the market. A commercial sample of *açaí* obtained in market of Belém (Brazil) was used as standard treatment.

Fruits were sanitized by immersion in sodium hypochlorite (30 mg/L) solution for 15 minutes, followed by another immersion in water (60 °C) for 15 minutes. After this process, fruits were pulped in vertical cylindrical extractor (MB Braesi, Belém-PA, Brazil), with added water in ratio 2:1 (fruit: water) and then lyophilized. The samples were stored in plastic bags, protected from light incidence and maintained at a temperature -18 ° C for later analysis.

Proximate composition and physicochemical analysis

The analyses of titratable acidity (TA), pH, total soluble solids (SS) and proximate composition were performed according to the Association of Official Analytical Chemists.¹⁷ The protein concentration was determined by the Kjeldahl method using a conversion factor of 6.25; lipid concentration was determined for Soxhlet extraction method; ash in muffle furnace controlled to 550 °C; moisture contents determination by gravimetry; total fiber using the detergency method¹⁸ and total carbohydrate content was determined by difference. All analyses were performed in triplicate and results expressed as gram per 100 g of dry sample.

The pH was determined by direct reading in potentiometer (Tecnal, Tec-3MP) and TA expressed in citric acid percentage, by sample titration with NaOH solution (0.1 mol.L⁻¹). The SS content was quantified by direct reading on portable digital refractometer (Reichert, TSMeter-DSP) at a temperature of 25 °C and results were expressed in °Brix.

Phenolic compounds

The phenolic compounds analysis was performed by spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu.¹⁹ A 0.5 g sample was homogenized with 40 mL of methanol 50 % in an Ultra-Turrax homogenizer (IKA, T25 digital, Germany) for 2 min, left to stand for 60 min and

centrifuged for 15 min at 15000 rpm in a refrigerated centrifuge (Sigma, model 4K 15, England). The first extraction residue was homogenized with 40 mL acetone 70 % for 2 min, left to stand for 60 min and centrifuged for 15 min at 15000 rpm. The supernatants of two extractions were mixed and final volume was adjusted to 100 mL with water. A 20 μ L aliquot of the extract were combined with 100 μ L 1 N Folin-Ciocalteu reagent and 300 μ L of Na_2CO_3 . The mixture was incubated for 2 h at room temperature and absorbance was read at 765 nm in a UV-visible spectrophotometer (Amersham Biosciences, model Ultrospec 3100 pro, England). The quantitation was performed using a standard curve of gallic acid with concentrations ranging from 0-0.50 mg/mL. The results were expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g).

Anthocyanins and carotenoids profile

Anthocyanins extract

The anthocyanins were exhaustively extracted from a sample of about 0.5 g lyophilized pulps using 1% HCl in methanol. The solution was then filtered and was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC).²⁰

Carotenoid extract

The carotenoid extract was prepared according to Mercadante and Rodriguez-Amaya.²¹ The pigments were exhaustively extracted with chilled acetone until discoloration occurred and the extract was saponified overnight with 10% KOH in methanol solution at room temperature. After removing the alkali with water, the extract was concentrated in a rotary evaporator

(Fisatom 802 water bath with ultrathermostatic Quimis 0214 M2). The concentrated extract was transferred to an amber flask, dried in a nitrogen flow and stored at -18 °C until it was analyzed using HPLC.

Chromatographic conditions

High Performance Liquid Chromatography analysis was performed in an Agilent 1100 Series HPLC system equipped with a quaternary solvent pumping system (G1311A – DE14917573 Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) and a UV/Vis detector (G1314B – DE71358944 Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany).

The anthocyanins were separated on a C18 Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4.6 mm) reversed-phase column, using as mobile phase a linear gradient elution of aqueous phosphoric acid (4%) and acetonitrile at 85:15 to 20:80 (v/v) for 30 minutes. The mobile phase flow rate was 0.2 mL/ min and column temperature was maintained at 29°C. The chromatograms were processed at fixed wavelength of 520nm.

The anthocyanins were quantified using standard curves of cyaniding 3-glucoside (3-37 µg/mL) and cyaniding 3-rutinoside (1-25 µg/mL). The anthocyanins cyaniding 3-glucoside (purity > 95 %) and cyaniding 3-rutinoside (purity > 95%) were purchased from Sigma Chemical (USA). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.169 and 0.565 µg/g for cyanidin 3-glucoside and 0.955 and 0.967 µg/g for cyanidin 3-rutinoside²². The results were expressed in miligrams per 100 grams (dry weight).

The carotenoids were separated on a C30 reversed phase polymeric column (3µm, 250 x 4.6 mm) (YMC, Japan). The mobile phase was water, methanol (J.T. Baker, Mexico - 99.99 %) and tert-methyl butyl ether (MTBE) (J.T. Baker, EUA – 99.96 %) starting at 5:90:5 (v/v/v), reaching 0:95:5 (v/v/v) in 12 min, 0:89:11 (v/v/v) in 25 min, 0:75:25 (v/v/v) in 40 min and

finally 0:50:50 (v/v/v) after a total of 60 min, with a flow rate of 1 mL/min and a injection volume of 5 μ L at 33 °C. The chromatograms were processed at fixed wavelength of 450nm.²³

The carotenoids were quantified using standard curves of lutein (1-65 μ g/mL), zeaxanthin (1-40 μ g/mL), α -carotene (2-25 μ g/mL) and β -carotene (5-50 μ g/mL). The carotenoids zeaxanthin (purity > 95 %), α -carotene (purity > 95%) and β -carotene (purity > 93%) were purchased from Sigma Chemical (USA) while lutein (purity > 95%) was purchased from Indofine Chemical Company Inc. Hillsborough (USA). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated according to Ertaş et al.²² and were respectively, 6.9×10^{-3} and 1.15×10^{-2} μ g/g for lutein; 9.56×10^{-2} and 1.59×10^{-2} μ g/g for zeaxanthin; 1.97×10^{-2} and 3.28×10^{-2} μ g/g for α -carotene; 6.53×10^{-2} and 10.89×10^{-2} μ g/g for β -carotene. Results were expressed in micrograms per grams (dry weight).

Vitamin A

The vitamin A content was calculated by a bioconversion factor proposed by Guillard and Lequeu.²⁴ This information corresponds to an equivalence factor of 13 mg of β -carotene for 1 mg retinol with regard to structural configurations identified in β -carotene.

Antioxidant activity

The antioxidant activity was performed by method based on sequestration of 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS) radical.²⁵ A 0.5 g sample was homogenized with 40 mL of methanol 50 % in an Ultra-Turrax homogenizer (IKA, T25 digital, Germany) for 2 min, left to stand for 60 min and centrifuged for 15 min at 15000 rpm in a refrigerated centrifuge (Sigma, model 4K 15, England). The first extraction residue was homogenized with 40 mL of

acetone 70 % for 2 min, left to stand for 60 min and centrifuged for 15 min at 15000 rpm. The supernatants of two extractions were mixed and the final volume was adjusted to 100 mL with water. For the ABTS method, a 30 μ L aliquot of each extract dilution was reacted with 3.0 mL of ABTS radical and absorbance was read at 734 nm in a UV-visible spectrophotometer (Amersham Biosciences, model Ultrospec 3100 pro, England) after 6min of reaction. The results were expressed in micromolar Trolox concentration per gram (dry weight).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analyses of variance ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$), by a principal component analysis (PCA) and Pearson's correlation analyses. All statistical analyses were carried out using the Software Statistica 12 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate composition and physicochemical properties

The results of proximate composition and physicochemical characteristics of *açaí* genotypes are shown in Table 1. The fruits showed different moisture values ranging from 87.77% (L11P09) to 91.53% (L06P13) while commercial sample had moisture value of 88.70%. In relation to total fiber content among genotypes, the L06P13 (15.64%) and L09P09 (15.88%) presented the highest values, indicating an increase of 25-27% when compared to commercial sample ($p < 0.05$, Table 1). The amount of protein content ranged from 7.78% (L06P13) to 9.50% (BRS-PA_{MISTA}). The highest values among the tested samples were registered for BRS-PA_{MISTA}, L09P09 and L11P09, which were similar to commercial sample

(9.06%). The lipid content among samples ranged from 36.30% (L06P13) to 47.44% (commercial). There were no significant differences between genotypes with higher lipid content (L04P16, 47.32% and L22P13, 46.51%) and commercial sample (47.44%). Regarding carbohydrates present in genotypes, values ranged from 21.71% (L11P09) to 32.04% (L06P13). Genotype L09P09 and L06P13 had 19 and 25% more carbohydrates than commercial sample (Table 1, $p < 0.05$). The genotype L06P13 showed the higher ashes content (4.44%) when compared with commercial sample (3.49%).

Table 1 – Proximate composition (g/100g of dry weight) and physicochemical characteristics of *açaí* genotypes and commercial sample.

	commercial	L09P09	L22P13	BRS- PAMISTA	L11P09	L06P13	L04P16
Moisture fruit (%)	88.70 ± 0.00 ^d	90.20 ± 0.05 ^c	88.79 ± 0.10 ^d	90.90 ± 0.01 ^b	87.77 ± 0.18 ^e	91.53 ± 0.02 ^a	90.33 ± 0.09 ^c
Moisture (%) lyophilized pulp	2.23 ± 0.05 ^f	3.84 ± 0.15 ^c	2.82 ± 0.16 ^e	3.40 ± 0.10 ^d	5.72 ± 0.20 ^a	4.51 ± 0.19 ^b	2.75 ± 0.09 ^e
Total fiber (%)	12.47 ± 0.02 ^c	15.88 ± 0.25 ^a	11.73 ± 0.19 ^d	12.62 ± 0.01 ^c	14.13 ± 0.20 ^b	15.64 ± 0.15 ^a	11.31 ± 0.09 ^d
Protein (%)	9.06 ± 0.44 ^{ab}	9.39 ± 0.14 ^a	8.67 ± 0.09 ^b	9.50 ± 0.05 ^a	9.22 ± 0.11 ^{ab}	7.78 ± 0.23 ^c	8.70 ± 0.07 ^b
Lipids (%)	47.44 ± 0.23 ^a	37.04 ± 0.13 ^c	46.51 ± 0.38 ^{ab}	45.63 ± 0.15 ^b	45.85 ± 0.88 ^b	36.30 ± 0.41 ^c	47.32 ± 0.06 ^a
Carbohydrates (%)	25.58 ± 0.59 ^b	30.36 ± 0.52 ^a	26.80 ± 0.35 ^b	25.47 ± 0.12 ^b	21.71 ± 1.33 ^c	32.04 ± 0.33 ^a	26.44 ± 0.22 ^b
Ash (%)	3.49 ± 0.04 ^d	4.10 ± 0.02 ^b	3.80 ± 0.12 ^c	3.81 ± 0.07 ^c	4.18 ± 0.05 ^b	4.44 ± 0.04 ^a	3.78 ± 0.06 ^c
pH	5.24 ± 0.05 ^b	5.31 ± 0.01 ^a	5.25 ± 0.02 ^b	5.17 ± 0.01 ^c	5.34 ± 0.02 ^a	5.21 ± 0.01 ^{bc}	5.23 ± 0.01 ^b
SS (°Brix)	4.08 ± 0.00 ^{bc}	3.40 ± 0.59 ^c	5.10 ± 0.00 ^b	7.14 ± 0.00 ^a	3.06 ± 0.00 ^c	6.80 ± 0.59 ^a	6.80 ± 0.59 ^a
TA (% citric acid)	1.34 ± 0.01 ^b	1.36 ± 0.03 ^b	1.39 ± 0.07 ^b	1.37 ± 0.03 ^b	1.61 ± 0.07 ^a	1.33 ± 0.07 ^b	1.38 ± 0.11 ^b

Results are the means of three replicates ± standard deviation. Different superscript letters within the same line indicates significant differences (one way ANOVA and Tukey test, $p \leq 0.05$). SS = soluble solids; TA = titratable acidity.

The pH of genotypes ranged from 5.17 (BRS-PA_{MISTA}) to 5.34 (L11P09), being these values statistically different from commercial sample (5.24). The SS of genotypes ranged from 3.06 (L11P09) to 7.14 °Brix (BRS-PA_{MISTA}). Genotypes L06P13, L04P16 and BRS-PA_{MISTA} showed 66 and 75 % more SS than commercial sample values (4.08 °Brix) ($p < 0.05$, Table 1). The genotype L11P09 has the highest value of TA when compared with commercial sample (1.61 vs. 1.34% of citric acid) there was no statistical difference from other genotypes and commercial sample, with an average of 1.36% of citric acid.

Rufino et al.¹⁵ in evaluation of BRS-PA cultivar (released from breeding program by Embrapa Amazônia Oriental) obtained values of moisture (85.7%), protein (6.27%), lipids (20.82%) and ashes (1.99%) lower than those found in this study for all genotypes as well as commercial sample. Furthermore, Carvalho et al.¹⁴ evaluated the BRS-PA and obtained lower moisture (88.53%), protein (8.76%), lipids (41.02%) and ashes (3.79%) but higher total fiber content (17.11%) than those obtained for the BRS-PA_{MISTA} genotype in the present study. Regarding the physicochemical characteristics, Carvalho et al.¹⁴ obtained lower values of pH (4.89), SS (5.80 °Brix) and TA (0.18% of citric acid) when compared to *açaí* genotypes of this study, while Neves et al.²⁶ evaluating the commercial sample of *açaí* (*Euterpe oleracea*) obtained lower values of pH (4.91) and SS (4.0 °Brix) and higher value of TA (1.73% of citric acid).

According to Cunha et al.¹⁶, differences in physicochemical characteristics and chemical composition can be attributed to genetic components of plants, harvest season, soil type, climatic conditions and different methods of extraction of pulp. In this work, differences can be attributed to genetic components of samples, since other factors were similar for all genotypes.

Anthocyanins

The identified and quantified anthocyanins in *açaí* genotypes are shown in Table 2. Previous studies revealed cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside as the main anthocyanins in *açaí*.²⁷ Accordingly, cyaniding 3-glucoside (retention time 14 minutes) and cyanidin 3-rutinoside (retention time 24 minutes) were found in all genotypes studied.

Table 2 – Anthocyanins content in different *açaí* genotypes and commercial sample (mg/100g of dry weight).

SAMPLE	Cyanidin 3-glucoside	Cyanidin 3-rutinoside	Total anthocyanins
Commercial	1545.80 ± 257.11 ^a	2084.89 ± 27.47 ^d	3630.69 ± 229.64 ^c
L09P09	695.24 ± 78.79 ^{bcd}	5073.35 ± 440.21 ^{ab}	5768.59 ± 519.00 ^b
L22P13	1064.45 ± 0.34 ^b	5681.36 ± 119.92 ^a	6745.81 ± 120.26 ^a
BRS-PA_{MISTA}	853.77 ± 25.51 ^{bc}	4621.49 ± 144.35 ^b	5475.26 ± 118.84 ^b
L11P09	856.18 ± 83.49 ^{bc}	3601.07 ± 74.82 ^c	4457.24 ± 8.67 ^c
L06P13	588.67 ± 23.07 ^{cd}	3299.35 ± 64.14 ^c	3888.02 ± 87.21 ^c
L04P16	291.58 ± 10.79 ^d	626.52 ± 13.77 ^e	918.10 ± 2.98 ^d

Results are the means of three replicates ± standard deviation. Different superscript letter within the same column indicates significant differences (one way ANOVA and Tukey test, $p \leq 0.05$).

The values of cyanidin 3-glucoside ranged from 291.58 to 1545.80 mg/100g dry weight. The values obtained in this study were higher than those found by Schauss et al.²⁸ (117.0 mg/100g in freeze-dried *açaí*) and Gouvêa et al.²⁷ (35.29 mg/100g in freeze-dried *açaí*). There was no improvement in cyanidin 3-glucoside content in all genotypes when compared to commercial sample (Table 2).

Cyanidin 3-rutinoside levels in *açaí* ranged from 626.52 to 5681.36 mg/100g dry weight. Schauss et al.²⁸ and Gouvêa et al.²⁷ obtained a lower content of this anthocyanin in *açaí* dry matter (193.0 and 58.73 mg/100g, respectively). In contrast to cyanidin 3-glucoside, and excepting L04P16 genotype, cyanidin 3-rutinoside was increased in all genotypes when compared to commercial sample (Table 2, $p < 0.05$).

Comparing data of anthocyanins with literature is difficult, since there are many interfering factors in anthocyanin content, such as, regional differences,²⁹ fruit maturity stage,²⁹ season harvest,³⁰ varieties of cultivars,³¹ preparation sample³⁰ and use of different extraction solvents.³²

The total anthocyanins were higher in genotypes L22P13 (6745.81 mg/100g), an increase of 86% compared to commercial sample. Others berries showed total anthocyanins content lower than that obtained for L22P13 genotype, such as black raspberry (*Rubus* sp.) (4838 mg/100g), blueberry (*Vaccinium* sp.) (2433 mg/100g), black currant (*Ribes* sp.) (2115 mg/100g), blackberry (*Rubus* sp.) (1870 mg/100g), cranberry (*Oxycoccus* sp.) (1085 mg/100g) and cherry (*Prunus* sp.) (616 mg/100g).³³

In *açaí* genotypes evaluated in this study, a prevalence of cyanidins was observed, as 57-88% of cyanidin 3-rutinoside and 12-43% of cyanidin 3-glucoside, as reported by Schauss et al.²⁸ The anthocyanins content observed in this study is an important issue, since *in vivo* studies have demonstrated beneficial health effects of *açaí* consumption related to anthocyanins against oxidative damage.⁴ Mertens-Talcott et al.³⁴ reported that anthocyanins present in *açaí* pulp are responsible for significant increase in plasma antioxidant capacity of healthy human volunteers while Xie et al.³⁵ observed anti-inflammatory and atheroprotective effect of *açaí* juice in rats.

Carotenoids

Table 3 presents the carotenoids identified in this study. The retention times found were 17 minutes for lutein, 20 minutes for zeaxanthin, 31 minutes and 35 minutes for α -carotene and β -carotene, respectively. Previous studies with *E. oleracea* have reported presence of

carotenoids lutein, α -carotene and β -carotene³⁶ and only β -carotene was reported by Kang et al.³⁷

An important function of carotenoids is the ability to, generate vitamin A, an essential component of vision and not synthesized by animals. Additionally, β -carotene has 100% of pro-vitamin A activity by containing two β -ionone rings.³⁸ The antioxidant activity of carotenoids is also associated with reduction risk of developing chronic diseases, including different types of cancer.^{39,40} In addition, lutein and zeaxanthin are concentrated in the macula, a region responsible for central vision and visual acuity. The yellow macular pigment is responsible for protecting the photoreceptor cells to oxidative damage caused by light.⁴¹ Studies report that a rich diet of lutein and zeaxanthin is associated with eye health, protecting against macular degeneration age related⁴² and cataract formation.⁴³

Table 3 – Carotenoids content in different *açaí* genotypes and commercial sample ($\mu\text{g/g}$ of dry weight).

SAMPLE	Lutein	Zeaxanthin	α -carotene	β -carotene	Total Carotenoids	Vitamin A
Commercial	27.91 \pm 3.72 ^c	4.49 \pm 0.07 ^c	5.18 \pm 0.20 ^c	47.16 \pm 2.59 ^c	84.74 \pm 6.30 ^{de}	3.63 \pm 0.20 ^c
L09P09	35.50 \pm 0.01 ^{bc}	7.92 \pm 0.57 ^a	7.12 \pm 0.00 ^{ab}	55.13 \pm 5.74 ^{abc}	105.68 \pm 5.45 ^{bc}	4.24 \pm 0.44 ^{abc}
L22P13	40.47 \pm 4.15 ^{ab}	6.81 \pm 0.71 ^{ab}	5.02 \pm 0.95 ^{cd}	65.70 \pm 9.03 ^a	118.00 \pm 14.25 ^{ab}	5.05 \pm 0.69 ^a
BRS-PA_{MISTA}	49.33 \pm 6.13 ^a	7.32 \pm 0.41 ^a	8.14 \pm 0.44 ^a	60.60 \pm 2.98 ^{ab}	125.39 \pm 4.43 ^a	4.66 \pm 0.23 ^{ab}
L11P09	25.58 \pm 1.87 ^c	7.26 \pm 0.48 ^a	2.23 \pm 0.28 ^e	44.75 \pm 1.74 ^c	79.82 \pm 4.25 ^e	3.44 \pm 0.13 ^c
L06P13	35.45 \pm 1.42 ^{bc}	7.83 \pm 0.65 ^a	5.48 \pm 0.58 ^{bc}	55.13 \pm 1.91 ^{abc}	103.89 \pm 3.22 ^{bcd}	4.24 \pm 0.15 ^{abc}
L04P16	33.37 \pm 1.84 ^{bc}	5.52 \pm 0.12 ^{bc}	3.60 \pm 0.16 ^{de}	49.03 \pm 3.14 ^{bc}	91.52 \pm 4.24 ^{cde}	3.77 \pm 0.24 ^{bc}

Results are the means of three replicates \pm standard deviation. Different superscript letter within the same column indicates significant differences (one way ANOVA and Tukey test, $p \leq 0.05$).

Lutein and β -carotene were the main carotenoids found in *açaí* genotypes which values ranging from 25.58 to 49.33 and 44.75 to 65.70 $\mu\text{g/g}$ dry weight among genotypes. Genotypes L22P13 and BRS-PA_{MISTA} presented 45-77% of lutein and 28-39% more β -carotene levels than the commercial sample ($p < 0.05$, Table 3). These values were higher than those reported by Ribeiro et al.³⁶ that found 1.5 μg of lutein and 2.4 μg of β -carotene per grams pulp of *açaí*.

Zeaxanthin and α -carotene contents ranged from 4.49 to 7.92 and 2.23 to 8.14 $\mu\text{g/g}$ dry weight, respectively. All genotypes, except L04P16 improved zeaxanthin content by 52-76% when compared to commercial sample.

Regarding α -carotene content, L09P09 and BRS-PA_{MISTA} genotypes had 37% and 57% more levels when compared to commercial sample ($p < 0.05$, Table 3). Values of α -carotene content were higher than those obtained by Ribeiro et al.³⁶ (0.45 $\mu\text{g/g}$ of *açaí* pulp).

When evaluated the total carotenoids, the genotype L22P13 and BRS-PA_{MISTA} had higher total carotenoids (39% and 48%, respectively) and vitamin A content (39% and 28%, respectively). Regarding total carotenoids content, others berries such as blackberry (*Rubus* sp.) (53 $\mu\text{g/g}$), gooseberry (*Ribes grossularia*) (25 $\mu\text{g/g}$), raspberry (*Rubus* sp.) (22 $\mu\text{g/g}$), black currant (*Ribes nigrum*) (13 $\mu\text{g/g}$), bilberry (*Vaccinium* sp.) (12 $\mu\text{g/g}$), red currant (*Ribes rubrum*) (6 $\mu\text{g/g}$), strawberry (*Fragaria* sp.) (5 $\mu\text{g/g}$), grape (*Vitis* sp.) (1.4 $\mu\text{g/g}$) and cherry (*Prunus* sp.) (19 $\mu\text{g/g}$)⁴⁴ showed lower contents when compared to those found in the present study. Differentiated levels of carotenoids related to different genotypes were also reported to Chilli (*Capsicum* spp.)¹² and blueberries (*Vaccinium* spp.).⁴⁵

The World Health Organization indicates that deficiency in Vitamin A is a serious public health problem affecting millions of people, leading to visual impairment, anemia and low resistance to infections, especially in children.⁴⁶ Based on contents obtained of β -carotene, the precursor of Vitamin A, the *açaí* genotypes showed vitamin A levels ranging from 3.44 to 5.05 $\mu\text{g/g}$. The levels of vitamin A obtained from β -carotene contents described by Ribeiro et

al.³⁶ and Kang et al.³⁷ in *açaí* pulp was lower than values obtained in this study (0.18 µg/g and 0.83 µg/g, respectively).

Phenolic compounds

The phenolic compounds content in genotypes ranged from 17.29 to 40.40 mg GAE/g dry weight (Table 4). The commercial sample had the highest values as the L06P13 genotype presented value statistical similar to commercial sample (34.84 mg GAE/g). Other genotypes presented phenolic content lower when compared to commercial sample (Table 4, $p < 0.05$). Furthermore, genotypes L04P16 and BRS-PA_{MISTA} presented only 42% and 62% of phenolic compounds content when compared to commercial sample. This result was not expected, since the breeding program afforded significant increase in anthocyanins, which are part of this group of compounds. However, we can speculate that the presence of other compounds (non-phenol, ascorbic acid, sugars, etc) could have interfered in oxidation reaction of the phenol with reagent.⁴⁷

For comparison, phenolic compounds content in genotype L06P13 (34.84 mg GAE/g) is similar to those described by Rojano et al.⁴⁸ (31.72 mg GAE/g) and Kang et al.³⁷ (31.2 mg GAE/g) to lyophilized *açaí* pulp. Other studies also report significant differences in content of phenolic compounds, Pertuzatti et al.⁴⁵ obtained a range of 19.22 to 34.57 mg GAE/g in different cultivars of blueberries (*Vaccinium* spp.) while Dubey et al.¹² observed a range of 5.1 to 26.8 mg GAE/g in chilli (*Capsicum* spp.) genotypes.

Table 4 – Phenolic compounds and antioxidant activity in different *açaí* genotypes and commercial sample (dry weight).

	Commercial	L09P09	L22P13	BRS- PA _{MISTA}	L11P09	L06P13	L04P16
ABTS	231.38 ±	485.26 ±	674.83 ±	423.53 ±	331.18 ±	431.39 ±	263.33 ±
(µM trolox/g)	14.24 ^d	26.70 ^b	29.30 ^a	20.28 ^b	24.54 ^c	20.92 ^b	21.84 ^d
Phenolic compounds	40.40 ±	29.60 ±	31.94 ±	25.21 ±	26.83 ±	34.84 ±	17.29 ±
(mg GAE/g)	3.59 ^a	2.45 ^{bc}	3.35 ^{bc}	0.83 ^{cd}	1.91 ^{bc}	4.91 ^{ab}	1.02 ^d
Cyanidin 3-glucoside	554.10 ±	412.01 ±	620.90 ±	552.72 ±	594.30 ±	421.67 ±	183.25 ±
(mg/100g)	53.97 ^a	37.74 ^c	55.64 ^a	21.23 ^{ab}	4.91 ^a	18.84 ^{bc}	6.62 ^d
Cyanidin 3-rutinoside	1319.81 ±	3215.17 ±	3848.31 ±	3459.38 ±	2413.48 ±	2022.71 ±	320.37 ±
(mg/100g)	39.45 ^d	330.28 ^b	81.54 ^a	280.71 ^{ab}	65.74 ^c	163.94 ^c	33.02 ^e
Total anthocyanins	1873.91 ±	3627.18 ±	4469.21 ±	4012.10 ±	3007.78 ±	2444.38 ±	503.62 ±
(mg/100g)	18.81 ^e	310.09 ^b	133.20 ^a	286.09 ^{ab}	43.01 ^c	109.87 ^d	37.96 ^f
Lutein	7.07 ±	5.73 ±	7.00 ±	7.86 ±	1.87 ±	2.12 ±	2.18 ±
(µg/g)	1.14 ^a	0.80 ^a	1.69 ^a	0.31 ^a	0.08 ^b	0.30 ^b	0.68 ^b
Zeaxanthin	1.69 ±	1.61 ±	1.29 ±	1.96 ±	1.18 ±	1.09 ±	1.04 ±
(µg/g)	0.14 ^a	0.08 ^{ab}	0.18 ^{bc}	0.28 ^a	0.05 ^c	0.06 ^c	0.11 ^c
α-carotene	1.00 ±	1.13 ±	1.60 ±	2.05 ±	0.49 ±	0.47 ±	0.43 ±
(µg/g)	0.08 ^c	0.11 ^c	0.13 ^b	0.05 ^a	0.03 ^d	0.03 ^d	0.02 ^d
β-carotene	6.68 ±	7.06 ±	10.81 ±	10.28 ±	5.16 ±	3.94 ±	3.56 ±
(µg/g)	0.58 ^b	0.84 ^b	0.15 ^a	0.90 ^a	0.24 ^{bc}	0.30 ^c	0.07 ^c
Total carotenoids	16.44 ±	15.53 ±	20.70 ±	22.15 ±	8.69 ±	7.62 ±	7.21 ±
(µg/g)	1.34 ^b	1.29 ^b	1.42 ^a	0.74 ^a	0.26 ^c	0.47 ^c	0.59 ^c

Results are the means of three replicates ± standard deviation. Different superscript letters within the same line indicates significant differences (one way ANOVA and Tukey test, $p \leq 0.05$).

Antioxidant activity

Five of six genotypes showed ability to quencher radical ABTS higher than the commercial sample (Table 4, $p < 0.05$). This method was chosen because its high sensitivity, convenience, speed, stability, as well as good solubility and utilization for lipophilic and hydrophilic compounds.²⁵ Antioxidant activity presented by genotype L22P13 (674.83 µM trolox/g) was higher than all genotypes ($p < 0.05$) Another study with *açaí* pulp showed lower values of antioxidant capacity compared to values obtained in this work (231.38 a 674.83 µM

trolox/g), Gironés-Vilaplana et al.⁴⁹ obtained 91.7, 208.70 and 211.00 μM trolox/g for *açaí* (*E. oleracea*) in different locations (Colombia and Brazil). However, Rojano et al.⁴⁸ obtained 403.30 μM trolox/g, a value lower than L22P13 genotype, but similar to BRS-PA_{MISTA}, L06P13 and L09P09 genotypes.

Correlations between antioxidant activity obtained by ABTS method and content of anthocyanins, carotenoids and total phenolic compounds quantified from methanol/acetone extracts (Table 4) of different genotypes were verified. A strong positive correlation (0.810) was observed between total anthocyanins and antioxidant activity of *açaí* genotypes as carotenoid content introduced a moderate correlation (0.503) and content of phenolic compounds was not correlated (0.114) with antioxidant activity of any genotypes.

Kuskoski et al.²⁵ observed a positive relationship (0.995) between antioxidant activity (ABTS method) and total phenolics compounds in fruit pulp containing anthocyanins and checked a decrease in correlation ($r^2 = 0.599$) in fruits that did not have anthocyanins in its composition. However, in the present study a strong positive correlation was observed only for total anthocyanins content. The lower correlation with phenolic compounds content may be related to the presence of interfering compounds in extracts,⁴⁷ the difference between the phenolic profile of samples (type, amounts and proportions of phenolics presents) and the synergic or antagonic effects between different phenolic compounds present in the sample in ROS inhibition, as reported by Jacobo-Velázquez et al.⁵⁰

Principal component analysis

The results of proximate composition, physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity were submitted to principal component analysis (PCA), allowing a global analysis of results and highlight links between them.

Results of proximate composition and physicochemical characteristics are presented in Figure 1A. The variability between samples was 41.83% explained for first principal component (PC1) and 37.35% for second principal component (PC2). The L11P09 genotype showed highest levels of moisture (lyophilized pulp), pH and TA and lowest content of SS and carbohydrates. The commercial sample, L04P16, L22P13 and BRS-PA_{MISTA} genotypes showed high lipid levels, however these genotypes showed the lowest levels of total fibers. The L06P13 genotype showed the highest content of carbohydrates and ashes, besides higher levels of total fiber and SS, but showed the lowest level of lipids while the L09P09 genotype stand out for high content of total fiber,ashes and carbohydrates.

Results of bioactive compounds and antioxidant activity are presented in Figure 1B. The variability among samples was explained 58.77% for first principal component (PC1) and 20.05% for the second principal component (PC2). The L22P13 genotype had the highest content of cyanidin 3-rutinoside, total anthocyanins, β -carotene, vitamin A and the highest antioxidant capacity, besides the high content of lutein and total carotenoids. Commercial sample showed the highest content of cyanidin 3-glucoside and phenolic compounds, while BRS-PA_{MISTA} genotype the highest content of lutein, α -carotene and total carotenoids. The L04P16 genotype had lowest concentrations cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside, total anthocyanins, phenolic compounds and low antioxidant activity, while, L11P09 genotype had the lowest lutein, α -carotene, β -carotene, total carotenoids and vitamin A contents.

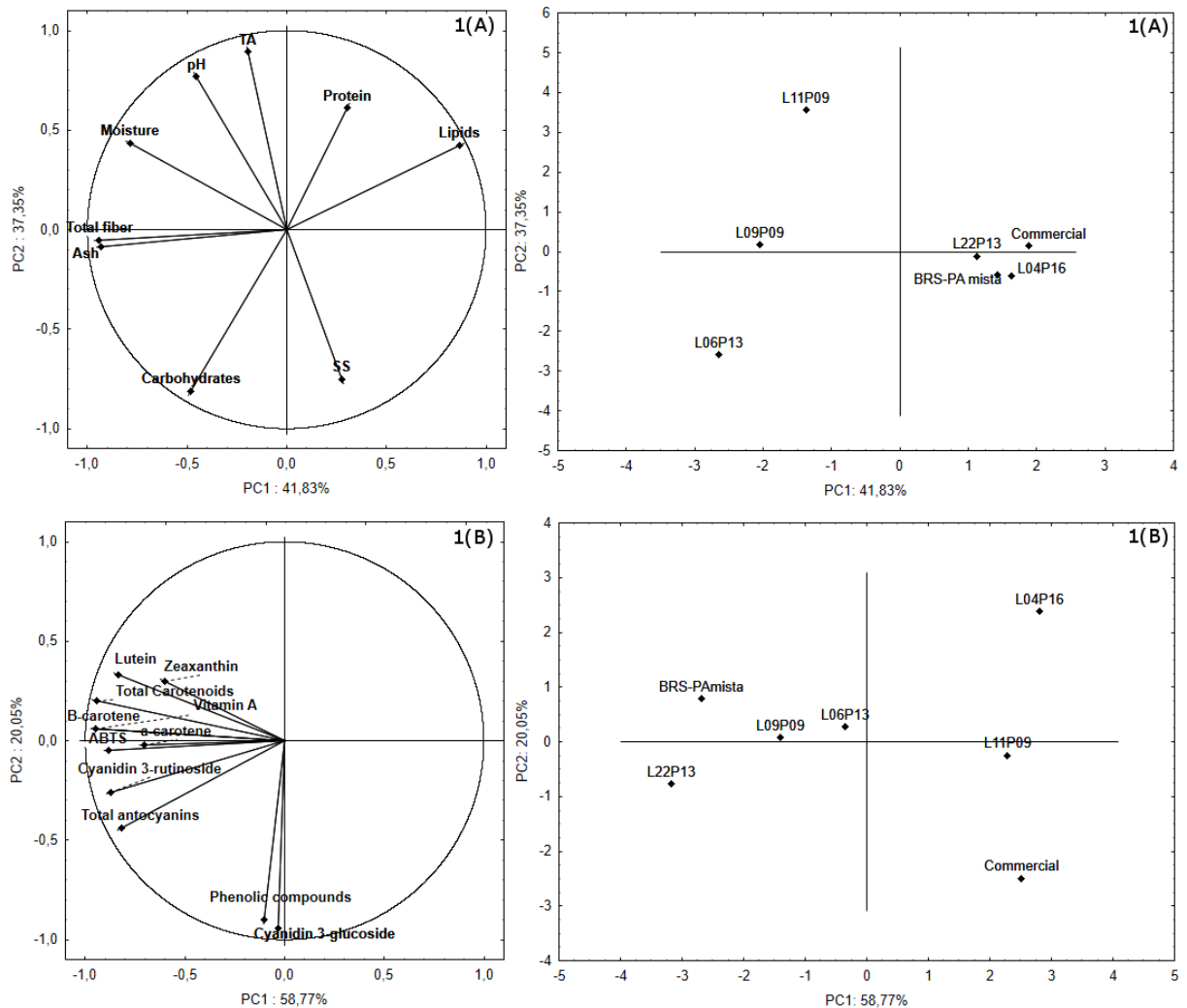


Figure 1. Principal component analysis (PCA) of açai genotypes. Proximate composition and physicochemical characteristics (A) and bioactive compounds and antioxidant activity (B).

Similar to this work, previous reports revealed variations in composition, physicochemical properties, bioactive compounds and antioxidant activity of fruits related to genotypic differences, providing important information for the continuity of breeding programs.^{10,11,13}

Our results showed that from the six genotypes of *E. oleracea* evaluated, some are very promising. L06P13 showed improvements in total fiber, carbohydrates, ashes and SS while L09P09 showed improvements in total fiber, protein, carbohydrates and ashes. L22P13 showed high levels of carotenoids and anthocyanins associated with higher antioxidant activity. Thus,

the data obtained support the importance of advances in *açaí* breeding programs in order to produce fruit with high levels of bioactive compounds. Moreover, a study on the profile of phenolic compounds present in each genotype may be interesting in order to elucidate their interactions, as well as the use of other antioxidants assays *in vitro* to better estimation of antioxidant capacity from *açaí* genotypes characterized in this study.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +555199639006 E-mail: alessandro.rios@ufrgs.br

Funding

The authors are grateful to the CAPES and CNPq for the financial support provided for this research.

Notes

The authors have declared there is no conflict of interest.

REFERENCES

- (1) Halliwell, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*. **1997**, 55, 44-52.
- (2) Rajendran, P.; Nandakumar, N.; Rengarajan, T.; Palaniswami, R.; Gnanadhas, E. N.; Lakshminarasiah, U.; Gopas, J.; Nishigaki, I. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. **2014**, 436, 332–347.
- (3) Kaur, C.; Kapoor, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*. **2001**, 36, 703-725.
- (4) Heinrich, M.; Dhanji, T.; Casselman, I. *Açaí* (*Euterpe oleracea* Mart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. *Phytochemistry Letters*. **2011**, 4, 10-21.
- (5) Pratheeshkumar, P.; Son, Y.; Wang, X.; Divya, S. P.; Joseph, B.; Hitron, J. A.; Wang, L.; Kim, D.; Yin, Y.; Roy, R. V.; Lu, J.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Shi, X.; Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF- κ B signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2014**, 280, 127-137.
- (6) Fratantonio, D.; Speciale, A.; Ferrari, D.; Cristani, M.; Saija, A.; Cimino, F. Palmitate-induced endothelial dysfunction is attenuated by cyanidin-3-*O*-glucoside through modulation of Nrf2/Bach1 and NF- κ B pathways. *Toxicology Letters*. **2015**, 239, 152-160.
- (7) Gao, X.; Cassidy, A.; Schwarzschild, M. A.; Rimm, E. B.; Ascherio, A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*. **2012**, 78, 1138-1145.

- (8) Sharoni, Y.; Linnewiel-Hermoni, K.; Khanin, M.; Salman, H.; Veprik, A.; Danilenko, M.; Levy, J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*. **2012**, 56, 259-269.
- (9) Alves-Rodrigues, A.; Shao, A. The Science behind lutein. *Toxicology Letters*. **2004**, 150, 57-83.
- (10) Capocasa, F.; Diamanti, J.; Tulipani, S.; Battino, M.; Mezzetti, B. Breeding strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) to increase fruit nutritional quality. *BioFactors*. **2008**, 34, 67-72.
- (11) Kraujalytė, V.; Venskutonis, P. R.; Pukalskas, A.; Česonienė, L.; Daubaras, R. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*. **2015**, 188, 583-590.
- (12) Dubey, R. K.; Singh, V.; Upadhyay, G.; Pandey, A. K.; Prakash, D. Assessment of phytochemical composition and antioxidant potential in some indigenous chilli genotypes from North East India. *Food Chemistry*. **2015**, 188, 119-125.
- (13) Souza, M. C.; Figueiredo, R. W.; Maia, G. A.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Moura, C. F. H.; Rufino, M. S. M. Bioactive compounds and antioxidant activity on fruits from different açai (*Euterpe oleracea* Mart) progenies. *Acta Hort*. **2009**, 84, 455-458.
- (14) Carvalho, A. V.; Mattiello, R. A.; Silva, P. A.; Araújo, E. A. F. Optimization of the technological parameters to produce structured gels from assai palm fruit pulp. *Brazilian Journal Food Technology*. **2010**, 4, 232-241.
- (15) Rufino, M. S. M.; Pérez-Jiménez, J.; Arranz, S.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Oliveira, M. S. P.; Saura-Calixto, F. Açai (*Euterpe oleraceae*) "BRS Pará": A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*. **2011**, 44, 2100-2106.
- (16) Cunha, C. R.; Maciel V. T.; Madruga, A. L. S.; Lunz, A. M. P.; Bergo C. L.; Oliveira M. S. P. Caracterização físico-química da polpa de indivíduos experimentais de açazeiro (*Euterpe oleraceae* mart.) com alta produtividade. *IX Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais*. Ilhéus, BA, 14 a 18 de Outubro de **2013**.
- (17) AOAC. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington: Horwitz W, **1997**, 850 p.
- (18) Goering, H. K.; Van Soest, P. J. *Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)*. Agricultural Handbook, Washington, D.C.: Agricultural Research Service, **1970**.
- (19) Swain, T.; Hillis, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1959**, 10, 63-68.
- (20) Zanatta, C. F.; Cuevas, E.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 9531-9535.
- (21) Mercadante, A. Z.; Rodriguez-Amaya, D. B. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, 46, 128-130.
- (22) Ertaş, E.; Özer, H.; Alasalvar, C. A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. *Food Chemistry*. **2007**, 105, 756-760.

- (23) Zanatta, C. F.; Mercadante, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*. **2007**, 101, 1526-1532.
- (24) Guillaud, J. C.; Lequeu, B. *As vitaminas: do Nutriente ao medicamento*; Santos: São Paulo, Brasil, **1995**. (Original Les Vitamines Tec & Doc; Lavoisier: Paris.)
- (25) Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **2005**, 25, 726-732.
- (26) Neves, L. T. B. C.; Campos, D. C. S.; Mendes, J. K. S.; Urnhani, C. O.; Araújo, K. G. M. Qualidade de frutos processados artesanalmente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). *Rev. Bras. Frutic*. **2015**, 37, 729-738.
- (27) Gouvêa, A. C. M. S.; Araujo, M. C. P.; Schulz, D. F.; Pacheco, S.; Godoy, R. L. O.; Cabral, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **2012**, 32, 43-46.
- (28) Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 8598-8603.
- (29) Rogez, H.; Pompeu, D. R.; Akwie, S. N. T.; Larondelle, Y. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açaí fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. *Journal of Composition and Analysis*. **2011**, 24, 796-800.
- (30) Bochi, V. C.; Godoy, H. T.; Giusti, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. *Food Chemistry*. **2015**, 176, 234-243.
- (31) Radunić, M.; Špika, M. J.; Ban, S. G.; Gadže, J.; Díaz-Pérez, J. C.; Maclean, D. Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food Chemistry*. **2015**, 177, 53-60.
- (32) Dias, A. L. S.; Rozet, E.; Chataigné, G.; Oliveira A. C.; Rabelo C. A. S.; Hubert, P.; Rogez, H.; quetin-leclercq, J. A rapid validated UHPLC–PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. *Journal of Chromatography B*. **2012**, 907, 108-116.
- (33) Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 4069-4075.
- (34) Mertens-Talcott, S. U.; Rios, J.; Jilma-Stohlawetz, P.; Pacheco-Palencia, L. A.; Meibohm, B.; Talcott, S. T.; Derendorf, H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açaí juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56, 7796–7802.
- (35) Xie, C.; Kang, J.; Burris, R.; Ferguson, M.; Schauss, A. G.; Nagarajan, S.; Wu, X. Açaí juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*. **2011**, 216, 327-333.
- (36) Ribeiro, J. C.; Antunes, L. M. G.; Aissa, A. F.; Darin, J. D. C.; Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; Bianchi, M. L. P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açaí pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **2010**, 695, 22-28.

- (37) Kang, J.; Thakali, K. M.; Xie, C.; Kondo, M.; Tong, Y.; Ou, B.; Jensen, G. S.; Medina, M. B.; Schauss, A. G.; Wu, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*. **2012**, 133, 671-677.
- (38) Lintig, J. V.; Vogt, K. Filling the gap in vitamin A research. *The Journal of Biological Chemistry*. **2000**, 275, 11915-11920.
- (39) Lu, Q.; Hung, J.; Heber, D.; Go, V. L. W.; Reuter, V. E.; Cordon-Cardo, C.; Scher, H. I.; Marshall, J. R.; Zhang, Z. Inverse associations between plasma lycopene and other carotenoids and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **2001**, 10, 749-756.
- (40) Yan, B.; Lu, M.; Wang, L.; Mo, X.; Luo, W.; Du, Y.; Zhang, C. Specific serum carotenoids are inversely associated with breast cancer risk among Chinese women: a case-control study. *British Journal of Nutrition*. **2016**, 115, 129-137.
- (41) Krinsky, N. I.; Landrum, J. T.; Bone, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual Review of Nutrition*. **2003**, 23, 171-201.
- (42) Sangiovanni, J. P.; Chew, E. Y.; Clemons, T. E.; Ferris III, F. L.; Gensler, G.; Lindblad, A. S.; Milton, R. C.; Seddon, J. M.; Sperduto, R. D. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study. *Arch Ophthalmol*. **2007**, 125, 1225-1232.
- (43) Ma, L.; Hao, Z.; Liu, R.; Yu, R.; Shi, Q.; Pan, J. A dose-response meta-analysis of dietary lutein and zeaxanthin intake in relation to risk of age-related cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. **2014**, 252, 63-70.
- (44) Müller, H. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Z. Lebensm Unters Forsch A*. **1997**, 204, 88-94.
- (45) Pertuzatti, P. B.; Barcia, M. T.; Rodrigues, D.; Cruz, P. N.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Smith, R.; Godoy, H. T. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food Chemistry*. **2014**, 164, 81-88.
- (46) WHO. *Guideline: Vitamin A supplementation in infants 1-5 months of life*. Geneva, World Health Organization, **2013**.
- (47) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 4290-4302.
- (48) Rojano, B. A.; Vahos, I. C. Z.; Arbeláez, A. F. A.; Martínez, A. J. M.; Correa, F. B. C.; Carvajal, L. G. Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de palma naidi (açai colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. **2011**, 64, 6213-6220.
- (49) Gironés-Vilaplana, A.; Baenas, N.; Villaño, D.; Speisky, H.; García-Viguera, C.; Moreno, D. A. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of functional foods*. **2014**, 7, 599-608.
- (50) Jacobo-Velázquez, D. A.; Cisneros-Zevallos, L. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *Journal of Food Science*. **2009**, 74, 107-113.

MANUSCRITO 2: *In vitro* antioxidant potential and protective effects of a hydroethanolic extract from açai (*Euterpe oleracea*) genotypes in human neuron-like cells (SH-SY5Y)

Manuscrito em preparação para submissão ao periódico:
Food Chemistry

Priscila do Carmo M. R. Torma¹, Allana V. S. Brasil¹, Ana Vânia Carvalho², André Jablonski³, Thallita Kelly Rabelo⁴, José Cláudio Fonseca Moreira⁴, Daniel Pens Gelain⁴, Simone Hickmann Flôres¹, Paula Rossini Augusti^{*1}, Alessandro de Oliveira Rios¹

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil.

² Embrapa Amazônia Oriental, Av. Dr. Enéas Pinheiro, s/n – Marco, Belém, PA, CEP: 66095-100, Brazil.

³ Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 75, Campus do Vale, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil.

⁴ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, RS, CEP 90035-035, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed.

E-mail: paularaugusti@gmail.com; Phone: +55-51-3308-6676

Running title: Antioxidant effects of hydroethanolic extracts of açai genotypes *in vitro*

ABSTRACT

The antioxidant activity of hydroethanolic extracts from six *açaí* genotypes (*Euterpe oleracea*) was evaluated by the ABTS, deoxyribose and glutathione oxidation assays, as well as in SH-SY5Y cells insulted with H₂O₂. L22P13 genotype had the highest total content of anthocyanins while L06P13 showed increased total content of carotenoids. The genotypes showed no differences in antioxidant activity by ABTS and deoxyribose assays besides failed to protect GSH oxidation induced by H₂O₂. However, an inverse and moderate association between radical ABTS generation and anthocyanins and carotenoids content was observed. The hydroethanolic extracts of *açaí* genotypes showed a protective effect (13-62%) on SH-SY5Y cells insulted by H₂O₂ at a concentration of 50 µg/mL by DCFH-DA assay. Excepting L04P16, no genotypes showed cytotoxicity by SRB assay. These results indicate antioxidant effect of *açaí* genotypes against reactive species generated in SH-SY5Y cells, suggesting a neuroprotective effect of hydroethanolic extracts from these fruits.

Keywords: anthocyanins; carotenoids; antioxidant activity; diclorofluoroscein-diacetate assay; reactive oxygen species; breeding program.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) produced by the metabolism of living organisms or biological dysfunction are related to energy production, phagocytosis, cell growth regulation, intercellular signaling and synthesis of biological substances (Halliwell, 2015). In addition, the partial reduction of oxygen (O_2) in the respiratory chain can promote the formation of ROS, such as superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) (Matés, 2000; Halliwell, 2015). Hydrogen peroxide (H_2O_2) can react with Fe^{2+} through the Fenton reaction and generates $\cdot OH$ radical, considered the most deleterious to the organisms (Halliwell, 2015).

In excess, ROS/RNS promote oxidative stress in the body, reacting with stable structures (lipids, proteins and DNA) resulting in damage to enzymes and DNA, as well as, lipid and protein oxidation. Such oxidative insults have been associated to pathologies such as diabetes, atherosclerosis, cancers, cataract, arthritis and neurodegenerative diseases (Dugo et al., 2011; Halliwell, 2015). Concerning neurodegenerative diseases, neuronal cells are particularly susceptible to ROS/RNS actions due their high metabolic activity, low antioxidant capacity and the not replicative nature of these cells. Additionally, the large amount of mitochondria present in the brain cells facilitate the generation and action of reactive species (Lee et al., 2012).

Oxidative stress can be counteracted by the action of endogenous antioxidants, as by enzymatic action (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), as non-enzymatic (reduced glutathione - GSH) or by the action of exogenous antioxidants obtained by consumption of fruits and vegetables rich in bioactive compounds (vitamins, polyphenols and carotenoids) (Matés, 2000; Dugo et al., 2011).

Açaí is a native fruit from northern of Brazil which consumption has gaining attention due to its high protein, lipid, fiber and mineral content and presence of anthocyanins, mainly

cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside and the carotenoids, lutein, α -carotene and β -carotene (Gordon et al., 2012; Ribeiro et al., 2010). The anthocyanins of *açaí* pulp are the largest contributors to the antioxidant action of this fruit (Gordon et al., 2012) and several studies have shown anti-inflammatory, antiproliferative and cardioprotective effects of *açaí* pulp *in vitro* and *in vivo* (Yamaguchi et al., 2015). However, few reports are available regarding neuroprotective effects of *açaí*. Poulouse et al. (2012) observed a reduction of oxidative damage and inflammation in BV-2 cells treated with *açaí* pulp and Wong et al. (2013) reported a protective effect of *açaí* extract in an *in vitro* model of Alzheimer's disease in PC12 cells.

Several studies have shown an improvement in antioxidant activity of several fruits related to the increase in bioactive compounds through breeding programs (Mazur et al., 2014; Kraujalytė et al., 2015). Despite the high nutritive value of *açaí*, until the present moment few published studies about *açaí* breeding programs are available and their impact on bioactive compounds and antioxidant capacity remains unclear (Souza et al., 2009).

The use of ethanol as solvent in extraction of bioactive compounds is a good alternative, since the usual extraction involves organic solvents with high toxicity (methanol/acetone), enabling extracts application in food, pharmaceutical and cosmetic products without complex purification steps. Moreover, the ethanol as solvent presents low extraction costs and is considered ecofriendly due to its low toxicity (Blidi et al., 2015).

This study aimed the quantification of bioactive compounds (anthocyanins and carotenoids) in hydroethanolic extrates from *açaí* genotypes (*E. oleracea*), as well as the evaluation of their antioxidant capacity using different antioxidant assays, including a cellular system with SH-SY5Y neuron-like cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 2-deoxy-D-ribose, L-glutathione reduced, TBA (2-thiobarbituric acid), DMSO (dimethyl sulfoxide), DCFH-DA (2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate), SRB (sulforhodamine B) and DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and H₂O₂ (hydrogen peroxide) was purchased from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Materials used in cell culture were obtained from Gibco[®]/Invitrogen (São Paulo, SP, Brazil). The standards used (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, purity > 95%), cyaniding 3-glucoside (purity > 95%), cyaniding 3-rutinoside (purity > 95%), zeaxanthin (purity > 95%), α -carotene (purity > 95%) and β -carotene (purity > 93%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and lutein (purity > 95%) was purchased from Indofine Chemical Company Inc. (Hillsborough, USA). The solvents methyl tert-butyl ether (MTBE) and methanol (HPLC grade) were purchased from J.T. Baker (Mallinckrodt, USA) and ethanol absolute from Synth (São Paulo, BR). Other reagent used were of either analytical or HPLC grade.

2.2. Sample

Açáí (*E. oleracea*) genotypes (L09P09, L22P13, BRS-PA_{MISTA}, L11P09, L06P13 and L04P16) from the harvest November 2014 to February 2015 were collected at Active Germplasm Bank of Embrapa Amazônia Oriental (Belém, Brazil) in full stage of maturity when they were of a violet colour, with white mucilage on the surface. A commercial pulp was

obtained in a local market (Belém, Brazil) and used as standard. In order to retain functional properties, the fruits were hygienized, pulped in vertical cylindrical extractor (MB Braesi, Belém-PA, Brazil) and after lyophilized, stored in plastic bags protected from light incidence and maintained at a temperature - 18 °C for later extract preparation.

2.3. Açai hydroethanolic extract preparation

Açai hydroethanolic extract was prepared according to method used by Rockenbach et al. (2008), with some modifications. Lyophilized sample (0.5 g) was homogenized with 75 mL (3 x 25mL) of ethanol 50 % acidified as 0.1 % HCl, in mechanical agitation for 2 hours. The solution was filtered under vacuum and the final volume was adjusted to 100 mL with 0.1 % HCl in ethanol 50 % for later analysis.

2.4. Bioactive compounds

2.4.1. Anthocyanins profile

The anthocyanins present in *açai* hydroethanolic extract were identified for high performance liquid chromatograph (HPLC). Analysis was performed in an Agilent 1100 Series HPLC system equipped with a quaternary solvent pumping system (G1311A – DE14917573 Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) and a UV/Vis detector (G1314B – DE71358944 Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany). For anthocyanins a C18 Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4.6 mm) reversed-phase column was used. The mobile phase was linear gradient elution of aqueous phosphoric acid (4 %) and acetonitrile at 85:15 to 20:80 (v/v) for 30 min, with a flow rate of 0.2 mL/ min at 29°C. The pigments were identified by comparing the sample

and controls retention times, under the same conditions. For quantification, the standard curves of cyaniding 3-glucoside (3-37 $\mu\text{g/mL}$) and cyaniding 3-rutinoside (1-25 $\mu\text{g/mL}$) were constructed. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated (Ertaş et al., 2007) for cyanidin 3-glucoside (0.169 and 0.565 $\mu\text{g/g}$) and cyanidin 3-rutinoside (0.955 and 0.967 $\mu\text{g/g}$). The results were expressed in milligrams per gram of dry weight.

2.4.2. Carotenoids profile

The carotenoids were extracted from *açaí* hydroethanolic extracts with a mixture of petroleum ether and ethyl ether, using a separatory funnel. Extract was then saponified overnight with 10% KOH in methanol solution at room temperature. After removing the alkali with water, the extract was concentrated in a rotary evaporator (Fisatom 802 water bath with ultrathermostatic Quimis 0214 M2). The concentrated extract was transferred to an amber flask, dried in a nitrogen flow and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyses by HPLC previously described. For carotenoids a C30 reversed phase polymeric column ($3\mu\text{m}$, $250 \times 4.6\text{ mm}$) (YMC, Japan) was used. The mobile phase was water, methanol and tert-methyl butyl ether (MTBE) starting at 5:90:5 (v/v/v), reaching 0:95:5 (v/v/v) in 12 min, 0:89:11 (v/v/v) in 25 min, 0:75:25 (v/v/v) in 40 min and finally 0:50:50 (v/v/v) after a total of 60 min, with a flow rate of 1 mL/min and a injection volume of $5\mu\text{L}$ at $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zanatta et al., 2007).

For quantification of carotenoids in *açaí* hydroethanolic extracts, standard curves of lutein (1-65 $\mu\text{g/mL}$), zeaxanthin (1-40 $\mu\text{g/mL}$), α -carotene (2-25 $\mu\text{g/mL}$) and β -carotene (5-50 $\mu\text{g/mL}$) were used. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated (Ertaş et al., 2007) for lutein (6.9×10^{-3} and 1.15×10^{-2} $\mu\text{g/g}$), zeaxanthin (9.56×10^{-2} and 1.59×10^{-2} $\mu\text{g/g}$), α -carotene (1.97×10^{-2} and 3.28×10^{-2} $\mu\text{g/g}$), and β -carotene (6.53×10^{-2} and 10.89×10^{-2} $\mu\text{g/g}$). The results were expressed in micrograms per gram of dry weight.

2.5. Antioxidant activity assays

2.5.1. ABTS method

ABTS assay was performed according to Kuskoski et al. (2005) in order to evaluate the antioxidant potential of *açaí* hydroethanolic extracts (0.5, 5.0 and 50 µg/mL) against ABTS radical generation. A 30 µL aliquot of each extract dilution was reacted with 3.0 mL of ABTS radical and the absorbance was read at 734 nm in a UV-visible spectrophotometer (Amersham Biosciences, model Ultrospec 3100 pro, England). The antioxidant potential of extracts was determined using Trolox® dissolved in ethanol 50 % acidified as 0.1 % HCl (5 µg/mL) as standard antioxidant and expressed as percentage of ABTS radical generation as follow:

$$\% \text{ ABTS generation} = (\text{Abs Sample}/\text{Abs Control}) \times 100 \quad (1)$$

2.5.2. Deoxyribose assay

The scavenging capacity towards the hydroxyl radical was measured by using a deoxyribose method (Halliwell et al., 1987). When exposed to hydroxyl radicals generated by Fenton reaction, the sugar deoxyribose is degraded to malonaldehyde, which is heating with thiobarbituric acid (TBA) given a pink color. The hydroxyl radical scavenging capacity of hydroethanolic extracts (0.5, 5.0 e 50 µg/mL) was noticed by a decrease in the pink color at 532 nm in a spectrophotometer. Trolox® dissolved in ethanol 50 % acidified as 0.1 % HCl (75 µg/mL) was used as standard antioxidant and the ability of *açaí* hydroethanolic extracts counteract hydroxyl radical was calculated according to the following formula:

$$\text{Hydroxyl radical generation (\%)} = 100 - [A0 - (A1 - A2)] \times 100/A0 \quad (2)$$

Where A0 was deoxyribose in the absence of extract, A1 was deoxyribose plus extract and A2 was extract in the absence of deoxyribose.

2.5.3. (GSH) oxidation assay

The capacity of the *açaí* genotypes hydroethanolic extracts (0.5, 5.0 e 50 $\mu\text{g/mL}$) to prevent GSH oxidation was evaluated in the absence or presence of H_2O_2 by measuring the disappearance of sulfhydryl groups of GSH. Reduced sulfhydryl groups of GSH were quantified using 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) (DTNB), as described by Ellman (1959) at 120 min after GSH (6mM) addition to a reaction mixture containing 1M potassium phosphate buffer, pH 6.8 and H_2O_2 at 5mM. Data were calculated as nmol of DTNB per mL and Trolox[®] dissolved in ethanol 50 % acidified as 0.1 % HCl (75 $\mu\text{g/mL}$) was used as standard antioxidant.

2.6. Neuroprotective effects of hydroethanolic extracts of *açaí*

2.6.1. Cell Culture

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil) and maintained in a mixture 1:1 of Ham's F12 and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM:F12) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) in a humidified atmosphere of 5% of CO_2 in air at 37 °C. Cell medium was replaced each 2 days and cells were sub-cultured once they reached 90% confluence.

2.6.2. *Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay*

This method is based on the ability of DCFH-DA to be oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) in the presence of reactive species and can be used as an index of free radical levels in cells. As previously described by Wang and Joseph (1999), SH-SY5Y cells were seeded in 96-well plates and 100 μM DCFH-DA dissolved in medium containing 1% FBS was added to each well and incubated for 2 h to allow cellular incorporation. After, the medium was discarded and cells were treated with *açaí* hydroethanolic extracts (0, 0.5, 5.0 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alone or in the presence of H_2O_2 (0 or 500 μM). DCF fluorescence was read after 1 h incubation at 37 °C in a fluorescence plate reader (Spectra Max M2, Molecular Devices, USA) with an emission wavelength set at 535 nm and an excitation wavelength set at 485 nm. The results were expressed as percentage DCF fluorescence and Trolox® (250 μM) was used as standard antioxidant.

2.6.3. *Cell viability*

The sulforhodamine B (SRB) assay was used in order to determine if hydroethanolic extracts of *açaí* genotypes affect cell viability *per se*. Cells were incubated with *açaí* hydroethanolic extracts in the highest concentration (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the percentage of SRB incorporation, which reflects cellular protein content (Skehan et al., 1990), was determined at 515 nm. Cells morphology was also evaluated by a blinded professional using phase-contrast light microscopy (Nikon Eclipse TE 300) in order to demonstrate the possible safety use of *açaí* hydroethanolic extracts.

2.7. *Calculation of the inhibitory concentration 50.*

The inhibitory concentration 50 (IC₅₀) for ABTS, deoxyribose and DCFH-DA assays was determined by non-linear regression analysis using GraphPad Prism Program version 5.0. (La Jolla, CA, USA). IC₅₀ values DCFH-DA assay were calculated as the concentration of *açaí* hydroethanolic extract to inhibit 50% of the increase in DCF fluorescence induced by H₂O₂. For ABTS and deoxyribose assays, the IC₅₀ values were considered those that inhibited 50% of ABTS and hydroxyl radicals generation, respectively.

2.8. Statistical analyses

Measurements of the levels of bioactive compounds in the extracts were carried out in triplicate and the results were expressed as mean \pm standard deviation. Data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. The *in vitro* procedures were carried out with $n = 3$ while cell culture experiments were performed with $n = 6$ (6 wells per group). Experiments were repeated three different times, and the results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The differences among data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. The relationship between bioactive compounds contents in the extracts hydroethanolic and inhibitory concentration 50 (IC₅₀) for ABTS, deoxyribose and DCFH-DA was evaluated by Pearson's correlations. In all cases differences were considered significant when $p < 0.05$. Data analyses were performed using the Statistica 12 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

3. Results and discussion

3.1. Bioactive compounds

The contents of anthocyanins and carotenoids in hydroethanolic extracts from *açaí* genotypes and commercial sample are presented in Table 1.

Table 1 – Bioactive compounds content in hydroethanolic extracts from *açaí* genotypes and commercial sample (dry weight).

	Commercial	L09P09	L22P13	BRS- PA _{MISTA}	L11P09	L06P13	L04P16
Cyanidin 3-glucoside (mg/g)	13.46 ± 0.14 ^a	13.71 ± 0.75 ^a	12.23 ± 1.46 ^{ab}	9.06 ± 0.42 ^c	8.30 ± 0.85 ^c	9.79 ± 1.60 ^{bc}	4.72 ± 0.07 ^d
Cyanidin 3-rutinoside (mg/g)	21.34 ± 1.72 ^d	35.62 ± 3.12 ^b	52.61 ± 3.70 ^a	46.08 ± 0.06 ^a	23.77 ± 2.65 ^{cd}	29.24 ± 2.64 ^{bc}	4.43 ± 0.15 ^e
Total anthocyanins (mg/g)	34.80 ± 1.80 ^c	49.33 ± 2.43 ^b	64.83 ± 2.24 ^a	55.14 ± 0.48 ^b	32.07 ± 3.49 ^c	39.03 ± 3.77 ^c	9.15 ± 0.20 ^d
Lutein (µg/g)	1.73 ± 0.15 ^c	9.49 ± 0.62 ^a	3.29 ± 0.06 ^c	3.47 ± 0.15 ^c	7.64 ± 0.37 ^{ab}	8.01 ± 0.55 ^{ab}	7.37 ± 1.03 ^b
Zeaxanthin (µg/g)	1.60 ± 0.06 ^d	1.79 ± 0.06 ^{cd}	1.42 ± 0.13 ^d	2.10 ± 0.09 ^c	2.74 ± 0.24 ^b	3.74 ± 0.07 ^a	2.58 ± 0.12 ^b
α-carotene (µg/g)	1.12 ± 0.06 ^c	2.12 ± 0.09 ^{ab}	1.53 ± 0.20 ^{bc}	2.24 ± 0.27 ^{ab}	2.00 ± 0.48 ^{ab}	2.78 ± 0.27 ^a	1.47 ± 0.17 ^{bc}
β-carotene (µg/g)	11.27 ± 0.48 ^d	14.75 ± 1.07 ^{cd}	21.67 ± 3.01 ^{ab}	23.01 ± 2.87 ^{ab}	18.55 ± 2.16 ^{bc}	27.28 ± 0.36 ^a	14.96 ± 0.87 ^{cd}
Total carotenoids (µg/g)	15.72 ± 0.60 ^c	28.15 ± 0.30 ^b	27.91 ± 3.40 ^b	30.82 ± 2.66 ^b	30.93 ± 2.52 ^b	41.81 ± 0.96 ^a	26.38 ± 1.97 ^b

Results are the means of three replicates ± standard deviation. Different superscript letters within the same line indicates significant differences (one way ANOVA and Tukey test, $p \leq 0.05$).

The anthocyanins cyanidin 3-glycoside and cyanidin 3-rutinoside were identified by HPLC with retention time (RT) of 14 and 24 minutes, respectively. Poulouse et al. (2012) in the study with polyphenolic composition of ethanolic extracts from *Euterpe oleracea* by HPLC identified these two cyanidins as the major anthocyanins compounds. The genotypes L22P13 and L09P09 and commercial sample presented higher cyanidin 3-glycoside content (12.23, 13.71 and 13.46 mg/g, respectively) when compared with other genotypes, excepting L06P13 genotype that presented similar value to L22P13. The genotypes BRS-PA_{MISTA} and L22P13

presented higher cyanidin 3-rutinoside content (46.08 and 52.61 mg/g, respectively) when compared with other genotypes and commercial sample. Additionally, the genotype L22P13 presented higher total anthocyanins levels when compared with other genotypes, as this genotype showed an increase of 146% in cyanidin 3-rutinoside and 86% in total anthocyanins levels when compared with commercial sample. L09P09 and BRS-PA_{MISTA} genotypes showed an increase of 42% and 58% in total anthocyanins content when compared with commercial sample (Table 1, $p < 0.05$). The anthocyanins levels obtained in this study for *E. oleracea* were higher than those obtained by Pompeu et al. (2009) of 3.49 mg/g and Poulouse et al. (2012) of 2.77 for cyanidin 3-glucoside 4.88 mg/g for cyanidin 3-rutinoside in dry extract.

The major carotenoids identified by HPLC were lutein (RT = 17 minutes), zeaxanthin (RT = 20 minutes), α -carotene (RT = 31 minutes) and β -carotene (RT = 35 minutes). Ribeiro et al. (2010) in the study with *E. oleracea* also reported the presence of carotenoids lutein, α -carotene and β -carotene. The genotypes L09P09, L06P13, L11P09 and L04P16 had higher content of lutein (9.49, 8.01, 7.64 and 7.37 $\mu\text{g/g}$, respectively) while genotypes L06P13, L11P09, L04P16, BRS-PA_{MISTA} showed higher levels of zeaxanthin (3.74, 2.74, 2.58 and 2.10 $\mu\text{g/g}$, respectively) when compared with commercial sample (Table 1, $p < 0.05$). The genotypes L11P09, L09P09, BRS-PA_{MISTA} and L06P13 showed an increase of 78-148% in α -carotene content while the genotypes L11P09, L22P13, BRS-PA_{MISTA} and L06P13 showed an increase of 64-142% in β -carotene content when compared with commercial sample. The genotype L06P13 showed the highest total carotenoids content (41.81 $\mu\text{g/g}$) when compared with other genotypes and commercial sample (Table 1, $p < 0.05$). Few published studies make the identification and quantification of carotenoids present in the pulp of *açaí* (*E. oleracea*) and, for the best of our knowledge, this is the first study until this moment, identifying and quantifying carotenoids in hydroethanolic extract of *açaí* genotypes. Ribeiro et al. (2010), using exhaustive extraction with acetone, reported 1.5 μg of lutein, 0.45 μg α -carotene and 2.4 μg of

β -carotene per grams of *açaí* pulp while Kang et al. (2012), using a mixture of methyl tert-butyl ether (MTBE) and ethanol (1:4), only found β -carotene (10.8 μg per grams of *açaí* in dry weight).

3.2. Antioxidant activity

The antioxidant activity of *açaí* hydroethanolic extracts in different concentrations (0.5, 5.0 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was evaluated by the ABTS, Deoxyribose and GSH oxidation assays. In ABTS assay, all genotypes significantly quenched ABTS radical at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$, Figure 1). Furthermore, the capacity of removing ABTS radical ranged from 24% (L04P16) to 41% (L06P13). In addition, L06P13 genotype was able to reduce ABTS radical generation also at 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$, Figure 1F). However, all genotypes demonstrated lower antioxidant activity when compared with Trolox[®], an analogue of vitamin E. Despite these results, no improvement in the antioxidant activity of genotypes was observed when compared with commercial sample ($\text{IC}_{50} = 73.98 - 175.7$ vs. 121.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Table 2, $p > 0.05$). However, a tendency to reduce the IC_{50} was observed for genotypes L06P13, BRS-PA_{MISTA} and L22P13 ($\text{IC}_{50} = 73.98, 96.11$ and 94.17 vs. 121.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively (Table 2). Moreover, total anthocyanins and total carotenoids contents presented a moderate negative correlation ($r^2 = -0.646$ e -0.501 , respectively) with the IC_{50} values of the ABTS method.

The ABTS assay can be applied to antioxidants that exhibit solubility in water and lipids, also pure compounds and food extracts (Re et al., 1999). Moreover, studies with *açaí* (*E. oleracea*) and other berries acerola (*Malpighia glabra*), strawberry (*Fragaria vesca*), grape (*Vitis vinifera*), blackberry (*Morus nigra*) and maqui (*Aristotelia chilensis*) (Kuskoski et al., 2005; Gironés-Vilaplana et al., 2014) associated the antioxidant activity obtained by the ABTS method to the content of anthocyanins of the extracts.

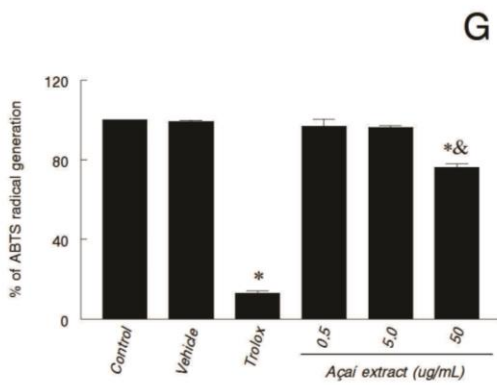
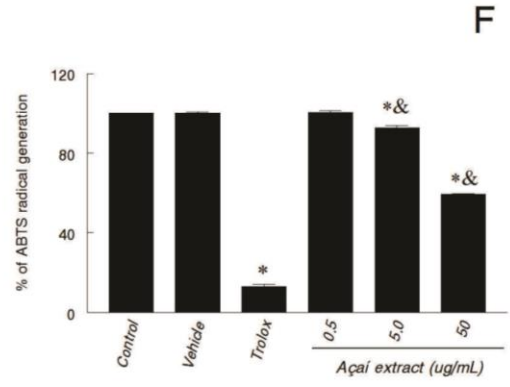
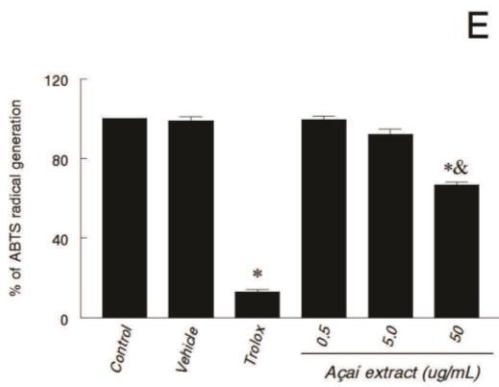
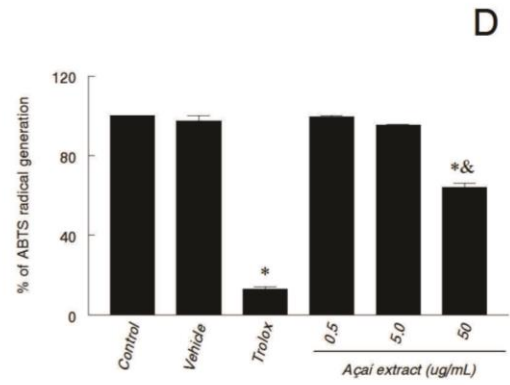
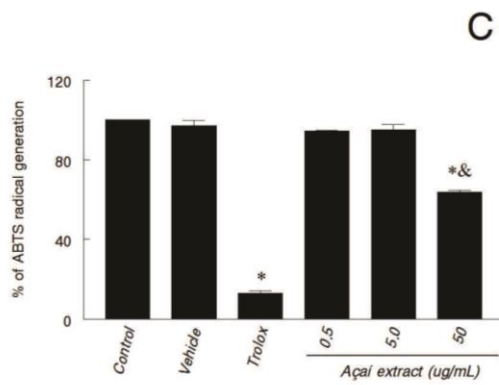
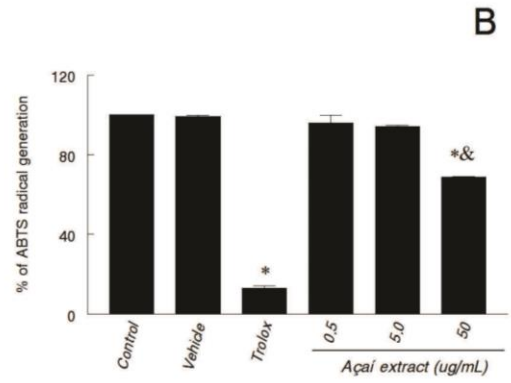
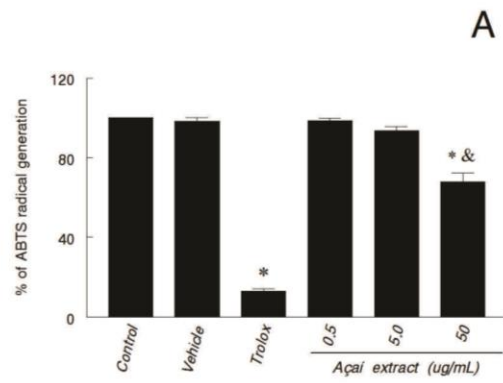


Figure 1. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on ABTS radical generation (ABTS assay). (A) = Commercial sample; (B) = L09P09; (C) = L22P13; (D) = BRS-PA_{MISTA}; (E) = L11P09; (F) = L06P13; (G) = L04P16. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *Different from control (p<0.05); [&]Different from Trolox group (p<0.05). Control = ABTS radical in the absence of extracts; Vehicle = ABTS radical incubated in the presence of vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution) equivalent to the higher extract concentration tested; Trolox = ABTS radical incubated in the presence of 5 μ g/mL of Trolox[®] (standard antioxidant); *Açaí* extract = ABTS radical incubated with *açaí* hydroethanolic extracts in concentrations ranging from 0.5 – 50 μ g/mL.

Table 2 - IC₅₀ values (μ g/mL) for different antioxidant assays.

Genotypes	ABTS	Deoxyribose	DCF
Commercial	121.7 \pm 20.60 ^{ab}	520.1 \pm 3.0 ^a	17.91 \pm 1.7 ^b
L09P09	146.6 \pm 31.60 ^{ab}	366.2 \pm 44.2 ^a	18.99 \pm 5.9 ^b
L22P13	94.17 \pm 19.30 ^{ab}	396.2 \pm 0.7 ^a	12.05 \pm 1.8 ^b
BRS-PA _{MISTA}	96.11 \pm 0.01 ^{ab}	381.4 \pm 82.9 ^a	26.17 \pm 3.7 ^b
L11P09	119.5 \pm 11.50 ^{ab}	370.8 \pm 90.8 ^a	24.58 \pm 4.7 ^b
L06P13	73.98 \pm 1.43 ^b	497.7 \pm 89.7 ^a	17.33 \pm 2.5 ^b
L04P16	175.7 \pm 1.85 ^a	361.5 \pm 41.0 ^a	139.6 \pm 7.6 ^a

Data are mean \pm SEM (n=3). ^{ab}Different letters in the same column indicate significant differences by Tukey Test (p<0.05).

The deoxyribose assay was used to verify the ability of bioactive compounds in hydroethanolic extracts of different genotypes of *açaí* to protect deoxyribose against *in vitro* generation of hydroxyl radical by the Fenton reaction (Halliwell et al., 1987). The sequestration the hydroxyl radical is of great importance due to the effects this reactive specie in cell membranes, DNA damage and lipid peroxidation, additionally the body has no endogenous enzymatic defense for its removal (Halliwell, 2015). In the deoxyribose assay, all genotypes, excepting L09P09, showed protective effects against hydroxyl radical at 50 μ g/mL (p<0.05, Figure 2). However, this effect was similar to vehicle. Moreover, no genotype improved significantly the antioxidant capacity when compared to control sample (IC₅₀ = 361.5-497.7 vs. 520.1 μ g/mL).

Our results are not in agreement with those of Pantelidis et al. (2007), which revealed protective effects of different varieties of red currants (*Ribes sativum*) (16.1-27%), gooseberry (*Ribes grossularia*) (34.1-35.3%), raspberry (*Rubus ideaus* L.) (53-92.2%), blackberry (*Rubus fruticosus*) (95.9-98.9%) and cornelian cherry (*Cornus mas*) (98.6%) against deoxyribose oxidation. However, since the concentration of the extracts from different berries was not displayed, it is very difficult to compare data. Despite being a classic method of assessing the sequestration of hydroxyl radical *in vitro* and widely applied, authors rarely evaluate the isolated effect of solvents in the reaction medium. In fact, Li et al. (2013) pointed out limitations in the application of this method due to interference of the organic solvents used in the preparation of synthetic antioxidants and, using ethanol as solvent, hydroxyl scavenging capacity increased about 10 times.

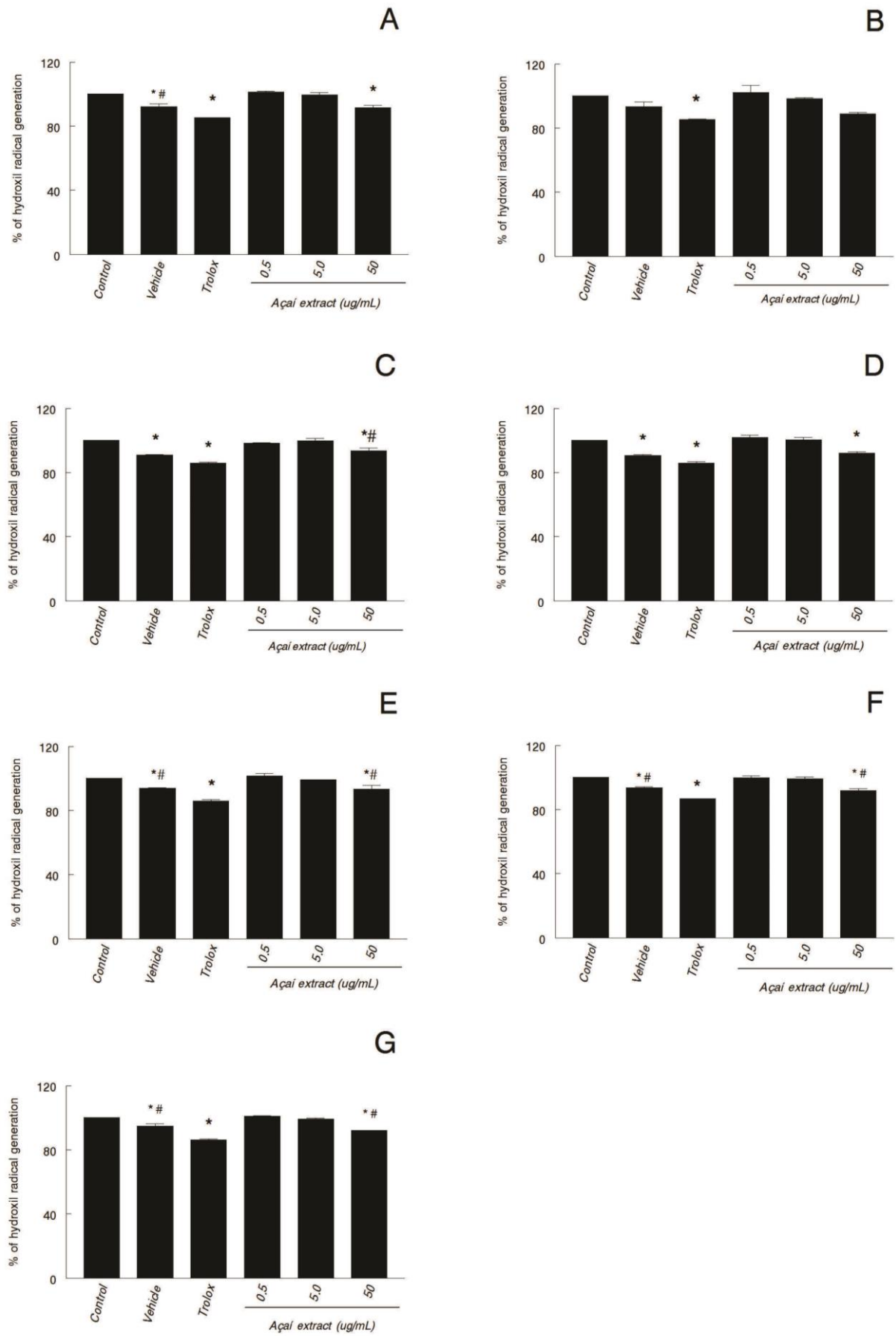


Figure 2. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on hydroxyl radical generation (Deoxyribose assay). (A) = Commercial sample; (B) = L09P09; (C) = L22P13; (D) = BRS-PA_{MISTA}; (E) = L11P09; (F) = L06P13; (G) = L04P16. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *Different from control (p<0.05); #Different from Trolox group (p<0.05). Control = Maximum deoxyribose oxidation (absence of extract); Vehicle = deoxyribose incubated in the presence of vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution) equivalent to the higher extract concentration tested; Trolox = deoxyribose incubated in the presence of 75 μ g/mL of Trolox® (standard antioxidant); *Açaí* extract = deoxyribose incubated with *açaí* hydroethanolic extracts in concentrations ranging from 0.5 – 50 μ g/mL.

The reduced glutathione (GSH) is a water-soluble tripeptide composed of the amino acids glutamine, cysteine and glycine, being the most abundant thiol (-SH) of low molecular weight present in animal cells (Townsend et al., 2003). GSH reacts with ROS in cells spontaneously or by catalytic reactions, where GSH is oxidized to form GSSG (glutathione disulfide). This form is then reduced to GSH by the enzyme glutathione reductase. Thus, the increase of ROS can result in a GSH depletion and oxidative damage to cells (Townsend et al., 2003). In our study, an increase in GSH oxidation caused by H₂O₂ during the incubation time of 120 minutes was observed (p<0.05, data not shown). Neither commercial sample nor the studied genotypes were able to prevent the oxidation of GSH (p>0.05, data not shown). Thus, we can speculate that in a water-soluble medium *açaí* hydroethanolic extracts are not able to scavenge H₂O₂ or directly reduce GSH. For the best of our knowledge, this is the first report evaluating *in vitro* effects of *açaí* hydroethanolic extract on GSH oxidation. Thus, future studies need to be carried out before a final statement on this regard, since effects of *açaí* in increasing GSH levels have been demonstrated in rats liver (Guerra et al., 2011) and in a model using *Caenorhabditis elegans* (Bonono et al., 2014).

3.3. Neuroprotective effects assay of açai hydroethanolic extracts

For the evaluation of the antioxidant capacity of fruits and vegetables, a combination of chemical assays and cells culture are suitable for understanding the effects and its biological relevance related to potential benefits *in vivo* (Kang et al., 2012). Cell culture is used for the investigation of physiological functions and toxic effects in response to oxidative stress or cytoprotection by antioxidants (Gülden et al., 2010). Thus, in order to verify the protective effects of hydroethanolic extracts from açai genotypes in a cellular system (insulted by a pro-oxidant agent), we choose human neuron-like cells SH-SY5Y as an *in vitro* model. These cells present similar functional response to human neurons, outgrowth neurites capacity and present morphological changes when exposed to oxidative stress *in vitro* (Kim et al., 2012; Rabelo et al., 2012).

In the present study, no protective effects of açai extracts on reactive species generation were observed in the absence of a pro-oxidant agent (H_2O_2) ($p > 0.05$, data not shown). When cells were insulted with H_2O_2 , there was an increase in intracellular reactive species generation when compared to untreated cells ($p < 0.05$, Figure 3). H_2O_2 exhibits good permeability within and between the cells and in combination with metal ions (Fe and Cu), generates the hydroxyl radical (Halliwell, 2015). Furthermore, it has been demonstrated its ability to deplete GSH and antioxidant enzymes, promote oxidative damage to DNA, lipids and proteins, reduce mitochondrial function and cell viability (Kim et al., 2012).

Our results showed that all concentrations of hydroethanolic extract of L09P09 genotype were able to protect cells against H_2O_2 , but only the highest concentration (50 $\mu\text{g/mL}$) reached values similar to control and Trolox[®]. Moreover, the decreased in DCF fluorescence ranged from 38 to 63% (Figure 3B, $p < 0.05$). Hydroethanolic extracts from genotypes L22P13, BRS-PA_{MISTA} and L06P13, as well as, from the commercial sample showed protective effects in the

concentrations of 5 and 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$, Figures 3C, 3D, 3F and 3A, respectively). The antioxidant capacity of these extracts ranged from 44-58%, 17-61%, 35-60% and 32-62%, respectively. Furthermore, the hydroethanolic extract from L06P13 genotype at the highest concentration (50 $\mu\text{g/mL}$) presented antioxidant capacity similar to control and Trolox[®] (Figure 3F). Hydroethanolic extracts from genotypes L11P09 and L04P16 only protected cells from H_2O_2 insult at the highest concentration (50 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$, Figure 3E and 3G, respectively). However, although L11P09 extract had protected cells by 47%, the extract of L04P16 at the same concentration protected only 13% (Figures 3E and 3G, respectively).

Despite these results, no differences were observed in antioxidant capacity between genotypes and commercial sample in DCFH-DA assay ($\text{IC}_{50} = 12.05\text{-}26.17$ vs. 17.91 $\mu\text{g/mL}$, $p > 0.05$, table 2). However, the genotype L04P16 had the higher IC_{50} when compared to all genotypes ($\text{IC}_{50} = 139.6$ vs. $12.05\text{-}26.17$ $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$, table 2), indicating the low antioxidant capacity of this genotype. This can be associated to the content of anthocyanins of this genotype significantly lower when compared with other samples (Table 1, $p < 0.05$). Accordingly, total anthocyanins content presented a moderate negative correlation ($r^2 = -0.785$) with the IC_{50} value of the DCFH-DA assay, while the total carotenoids content presented only a weak correlation ($r^2 = -0.127$).

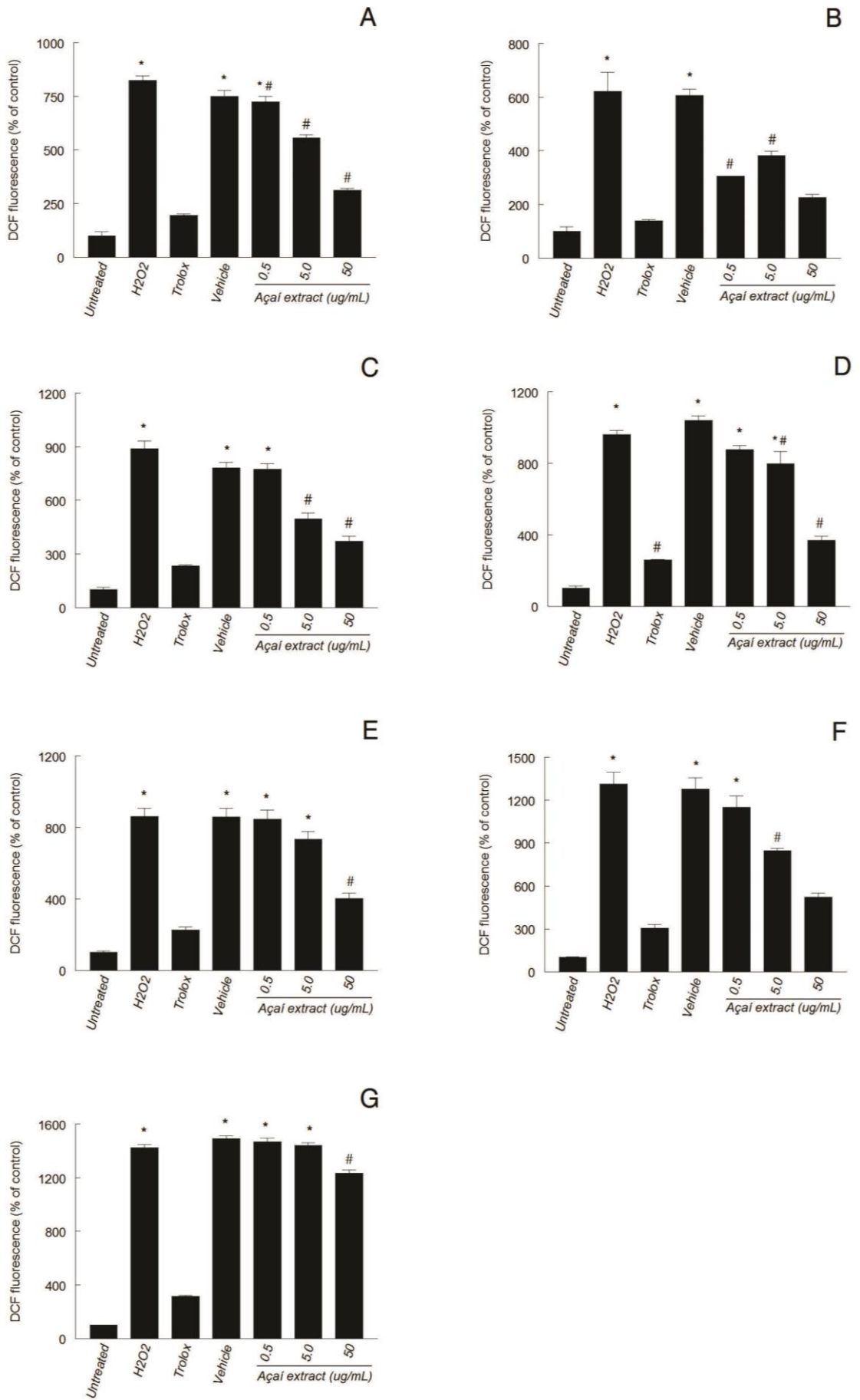


Figure 3. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on intracellular reactive species production (DCFH assay) in SH-SY5Y cells. (A) = Commercial sample; (B) = L09P09; (C) = L22P13; (D) = BRS-PA_{MISTA}; (E) = L11P09; (F) = L06P13; (G) = L04P16. Data are expressed as means \pm SEM (n=6). *Different from untreated cells (p<0.05); #Different from H₂O₂-treated cells (p<0.05). Untreated = cells incubated without *Açaí* extract/vehicle/Trolox[®] or 500 μ M H₂O₂; Vehicle = cells incubated with vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution equivalent to higher extract concentration tested) in the presence of 500 μ M H₂O₂. Trolox = cells incubated with 250 μ M Trolox[®] (standard antioxidant) in the presence of 500 μ M H₂O₂; *Açaí* extract = cells incubated with *açaí* hydroethanolic extracts (0.5 – 50 μ g/mL) in the presence of 500 μ M H₂O₂.

Several studies *in vitro* and *in vivo* show promising results of anthocyanins, mostly related to protection against neurodegenerative diseases (Tarozzi et al., 2007; Badshah et al., 2015). Spada et al. (2009) reported antioxidant activity of the frozen *açaí* (*E. oleracea*) pulp in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rats and Poulouse et al. (2014) reported the protective effect of *açaí* (*E. oleracea* and *E. precatória*) using rat embryonic hippocampal and HT22 hippocampal cells under stress.

Here we demonstrate that the protective effect of *açaí* hydroethanolic extracts on SH-SY5Y cells seems to be related to the content of anthocyanins present in the fruit. Thus, we can not rule out that a breeding program led to an increased in anthocyanin content along with an increasing trend in the neuroprotective effect of some hydroethanolic extracts *açaí* genotypes. In agreement, the presence of more hydrophilic polyphenols (anthocyanins) forms a protective barrier against ROS through hydrogen bonds with the polar groups in the lipid-water interface of the cell membrane (Oteiza et al., 2005). In fact, Tarozzi et al. (2007) reported anthocyanins ability to inhibit the formation of ROS induced by H₂O₂ at membrane level. However, the carotenoids also can contribute for the neuroprotective effect, since they can be located in the internal hydrophobic part of the lipid bilayers (β -carotene) or crossing the membrane being

anchored in the polar part of the membrane interface (lutein and zeaxanthin). All these interactions promote positive changes in the physical properties of the lipid membrane, allowing ROS scavenging in both the core and the membrane interface (Gruszecki et al., 2005).

Regarding safety issues, we evaluated if *açaí* hydroethanolic extracts could affect SH-SY5Y cells in a negative way. Only L04P16 genotype caused a significant viability loss on cells when compared to all *açaí* groups and untreated cells ($p < 0.05$, figure 4I). This effect could also be observed through changes in cells morphology (Figure 4H) when compared to untreated cells (absence of any treatment). Other hydroethanolic extracts of *açaí* genotypes, as well as the commercial sample, did not affect morphology or viability of SH-SY5Y cells ($p > 0.05$, figure 4B-G and 4I). Similar to that observed in this study, the 70% ethanol extract of mulberry (*Morus alba* L.) (0-100 $\mu\text{g/mL}$) did not cause toxicity in SH-SY5Y cells treated for 24h (Kim et al., 2010). These results suggest that the studied genotypes, excepting L04P16, would be safe for a practical application.

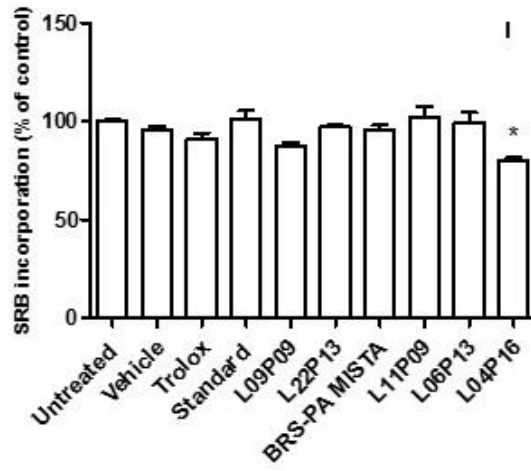
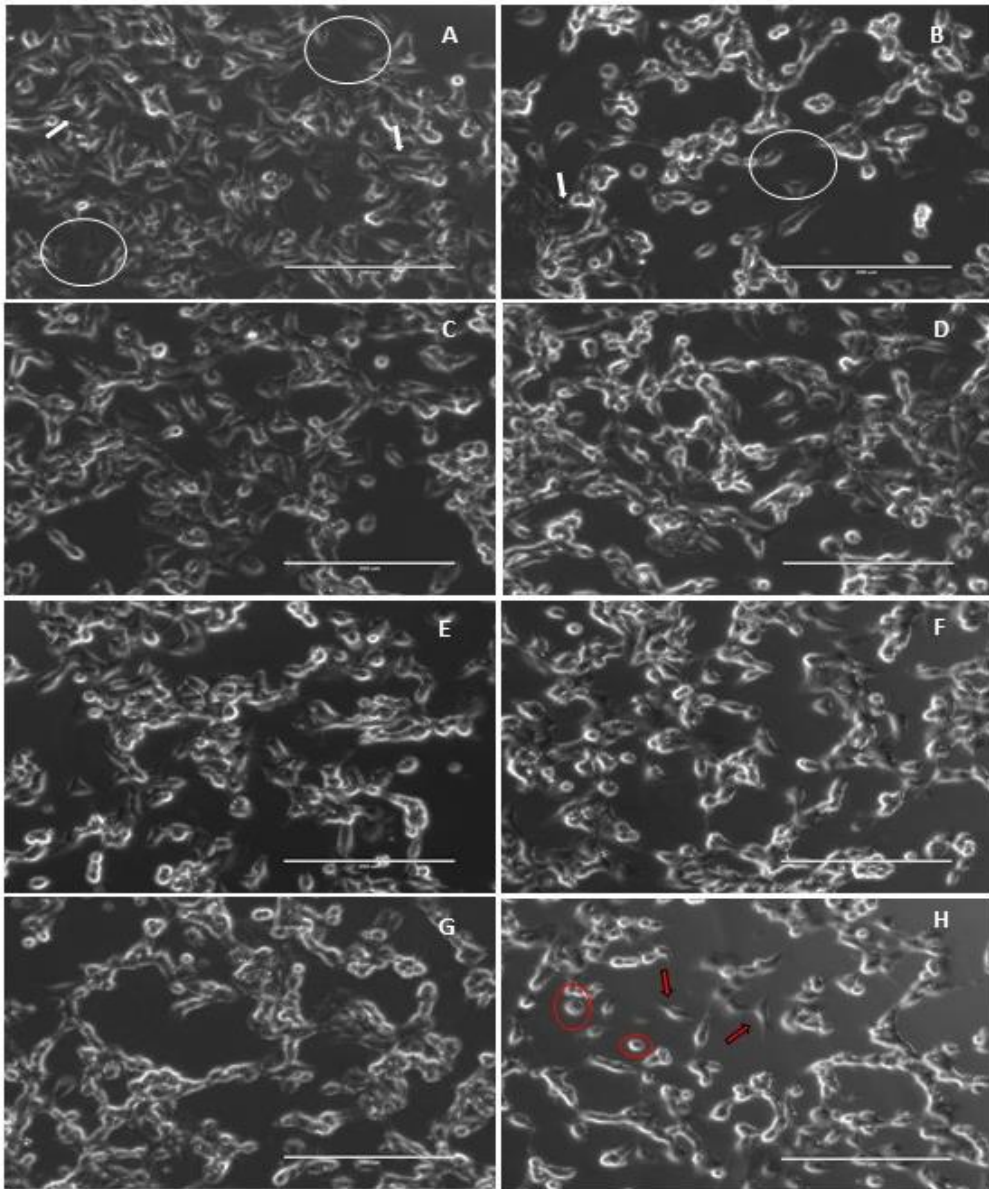


Figure 4. Effect of *açaí* hydroethanolic extracts on qualitative morphology (A-H) and viability (I, 200x) of SH-SY5Y cells. (A) = Untreated; (B) = Commercial sample; (C) = L09P09; (D) = L22P13; (E) = BRS-PA_{MISTA}; (F) = L11P09; (G) = L06P13; (H) = L04P16. SRB assay data are expressed as means \pm SEM (n=6). Untreated = cells incubated without *Açaí* extract/vehicle/Trolox[®]; Trolox = cells incubated with 250 μ M Trolox[®] (standard antioxidant); *Açaí* extract = cells incubated with the higher concentration of *açaí* hydroethanolic extracts (50 μ g/mL). Vehicle = cells incubated with vehicle (0.1% chloride acid/50% hydroethanolic solution) equivalent to concentration present in 50 μ g/mL; Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% of CO₂ in air at 37 °C until be treated with *açaí* hydroethanolic extracts at 50 μ g/mL, vehicle or Trolox[®]. After 1 h incubation at 37 °C, cells had morphology evaluated and viability quantified (Material and methods section). Observe in A and B (control and commercial samples, respectively) preserved architecture of cells with small neurites (fine cytoplasmic extensions, white circles) and cell clumps (white arrows). In frames (C-G), morphology of cells treated with hydroethanolic extracts from *açaí* genotypes remains unchanged, similar to untreated cells, as confirmed by the SRB assay (I). In frame H, we can observe that cells treated with hydroethanolic extract from *açaí* genotype L04P16 are rounded (red circles) and the neuritic processes seem to be stopped (red arrows). Besides, cells started to detach from the culture plate.

4. Conclusion

Açaí hydroethanolic extracts showed to be an excellent source of anthocyanins and carotenoids and their preparation with a 50% ethanol solution may be an alternative for application in food, pharmaceutical and cosmetics products. The *açaí* breeding program provided significant changes in the levels of bioactive compounds (anthocyanins and carotenoids) and these changes were associated to antioxidant capacity and neuroprotective effects on SH-SY5Y cells. These results may stimulate further research *in vitro* and *in vivo* in order to elucidate the therapeutic potential of hydroethanolic extracts, as well as of promising genotypes of *açaí*.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to the CNPq (National Scientific and Technological Development Council) and Capes (Coordinator for Upgrading Graduate-level Personnel) for the financial support.

References

- Badshah, H.; Kim, T. H.; Kim, M. O. (2015). Protective effects of Anthocyanins against Amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Neurochemistry International*, 80, 51-59.
- Bliidi, S.; Bikaki, M.; Grigorakis, S.; Loupassaki, S.; Makris, D. P. (2015). A comparative evaluation of bio-solvents for the eficiente extraction of polyphenolic phytochemicals: aple waste peels as a case study. *Waste and Biomass Valorization*, 6, 1125-1133.
- Bonono, L. F.; Silva, D. N.; Boasquivis, P. F.; Paiva, F. A.; Guerra, J. F. C.; Martins, T. A. F.; Torres, A. G. J.; Paula, I. T. B. R.; Caneschi, W. L.; Jacolot, P.; Grossin, N.; Tessier, F. J.; Boulanger, E.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L. (2014). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS ONE*, 9(3), 1-15.
- Dugo, L.; Negis, Y.; Azzi, A. (2011). Antioxidants. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 1-9.
- Ellman GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82, 70-77.
- Ertaş, E.; Özer, H.; Alasalvar, C. (2007). A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. *Food Chemistry*, 105, 756-760.
- Gironés-Vilaplana, A.; Baenas, N.; Villaño, D.; Speisky, H.; García-Viguera, C.; Moreno, D. A. (2014). Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of functional foods*, 7, 599-608.
- Gordon, A.; Cruz, A. P. G.; Cabral, L. M. C.; Freitas, S. C.; Taxi, C. M. A. D.; Donangelo, C. M.; Mattietto, R. A.; Friedrich, M.; Matta, V. M.; Marx, F. (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. *Food Chemistry*, 133, 256-263.
- Gruszecki, W. I.; Strzalka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740, 108-115.
- Guerra, J. F. C.; Magalhães, C. L. B.; Costa, D. C.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L. (2011). Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression. Of liver antioxidant enzymes in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 49, 188-194.

- Gülden, M.; Jess, A.; Kammann, J.; Maser, E., Seibert, H. (2010). Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 1298-1305.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.; Aruoma, O. (1987). The deoxyribose method: a simple “test tube” assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165: 215-219.
- Halliwell B. (2015). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 1-9.
- Kang, J.; Thakali, K. M.; Xie, C.; Kondo, M.; Tong, Y.; Ou, B.; Jensen, G. S.; Medina, M. B.; Schauss, A. G.; Wu, X. (2012). Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*, 133, 671-677.
- Kim, H. G.; Ju, M. S.; Shim, J. S.; Kim, M. C.; Lee, S.; Huh, Y.; Kim, S. Y.; Oh, M. S. (2010). Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson’s disease models. *British Journal of Nutrition*, 104, 8-16.
- Kim, H. S.; Lee, K.; Kang, K. A.; Lee, N. H.; Hyun, J. W.; Kim, H. (2012). Phloroglucinol exerts protective effects against oxidative stress-induced cell damage in SH-SY5Y cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 119, 186-192.
- Kraujalytė, V.; Venskutonis, P. R.; Pukalskas, A.; Česonienė, L.; Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, 188, 583-590.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A.; Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732.
- Lee J.; Giordano S.; Zhang J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, 441, 523–540.
- Li X.; Mai, W.; Wang, L.; Han, W. (2013). A hydroxyl-scavenging assay based on DNS damage in vitro. *Analytical Biochemistry*, 438, 29–31.
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83-104.
- Mazur, S. P.; Nes, A.; Wold, A.; Remberg, S. F.; Aaby, K. (2014). Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chemistry*, 160, 233-240.
- Oteiza, P.; Erlejman, A. G.; Verstraeten, S. V.; Keen, C. L.; Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical & Developmental Immunology*, 12, 19-25.
- Pantelidis, G. E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G. A.; Diamantidis, Gr. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777-783.
- Pompeu, D. R.; Silva, E. M.; Rogez, H. (2009). Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*, 100, 6076-6082.

- Poulose, S. M.; Fisher, D. R.; Larson, J.; Bielinski, D. F.; Rimando, A. M.; Carey, A. N.; Schauss, A. G.; Shukitt-Hale, B. (2012). Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1084-1093.
- Poulose, S. M.; Fisher, D. R.; Bielinski, D. F.; Gomes, S. M.; Rimando, A. M.; Schauss, A. G.; Shukitt-Hale, B. (2014). Restoration of stressor-induced calcium dysregulation and autophagy inhibition by polyphenol-rich açai (*Euterpe spp.*) fruit pulp extracts in rodent brain cells in vitro. *Nutrition*, 30, 853-862.
- Rabelo, T. K.; Zeidán-Chuliá, F.; Vasques, L. M.; Santos, J. P. A.; Rocha, R. F.; Pasquali, M. A. B.; Rybarczyk-Filho, J. L.; Araújo, A. A. S.; Moreira, J. C. F.; Gelain, D. P. (2012). Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology in Vitro*, 26, 304-314.
- 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, 1231-1237.
- Ribeiro, J. C.; Antunes, L. M. G.; Aissa, A. F.; Darin, J. D. C.; Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; Bianchi, M. L. P. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695, 22-28.
- Rockenbach, I. I.; Silva, G. L.; Rodrigues, E.; Kuskoski, E. M.; Fett, R. (2008). Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 238-244.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1107-1112.
- Souza, M. C.; Figueiredo, R. W.; Maia, G. A.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Moura, C. F. H.; Rufino, M. S. M. (2009). Bioactive compounds and antioxidant activity on fruits from different açai (*Euterpe oleracea* Mart) progenies. *Acta Hort*, 84, 455-458.
- Spada, P. D. S.; Dani, C.; Bortolini, G. V.; Funchal, C.; Henriques, J. A. P.; Salvador, M. (2009). Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of rats. *Journal of Medical Food*, 12, 1084-1088.
- Tarozzi, A.; Morroni, F.; Hrelia, S.; Angeloni, C.; Marchesi, A.; Cantelli-Forti, G.; Hrelia, P. (2007). Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 424, 36-40.
- Townsend, D. M.; Tew, K. D.; Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 145-155.
- Wang, H.; Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 612-616.
- Wong, D. Y. S.; Musgrave, I. F.; Harvey, B. S.; Smid, S. D. (2013). Açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against β -amyloid exposure in vitro. *Neuroscience Letters*, 556, 221-226.

- Yamaguchi, K. K. L.; Pereira, L. F. R.; Lamarão, C. V.; Lima, E. S.; Veiga-Junior, V. F. (2015). Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chemistry*, 179, 137-151.
- Zanatta, C. F.; Mercadante, A. Z. (2007). Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 101, 1526-1532.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de caracterizar diferentes genótipos de açaí, desenvolvidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Oriental, para fornecer informações sobre genótipos promissores em relação ao conteúdo de compostos bioativos e sua capacidade antioxidante.

No primeiro manuscrito, seis genótipos e uma amostra comercial (amostra padrão) de açaí foram avaliados em relação as características físico-químicas, composição centesimal, teor de compostos fenólicos, antocianinas e carotenoides e sua atividade antioxidante obtida pelo método de captura do radical ABTS. Os genótipos apresentaram elevados teores de fibras totais (11,31 – 15,88%), proteínas (7,78 – 9,50%), lipídeos (36,30 – 47,44%) e carboidratos (21,71 – 32,04%), além do elevado teor de cinza (3,49 – 4,44%). As polpas de açaí apresentaram valores de pH na faixa de 5,17 e 5,34, o que sugere uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de bactérias deteriorantes e *Clostridium botulinum* (SANTOS et al., 2008). Os baixos valores de SS (3,06 – 7,14 °Brix) e a elevada AT (1,33 – 1,61% ácido cítrico) indicam um sabor ácido do açaí, também observado no estudo de Neves et al., 2015.

Em relação ao conteúdo de compostos bioativos, o genótipo L22P13 apresentou o maior conteúdo de antocianinas totais, em geral, maior do que o relatado por outros autores (SCHAUSS et al., 2006a; GÔUVEA et al. 2012) e em comparação com outras bagas como framboesa-preta (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium* sp.), groselha-preta (*Ribes* sp.), amora-preta (*Rubus* sp.), oxococo (*Oxycoccus* sp.) e cereja (*Prunus* sp.) (WU et al., 2006). O teor de antocianinas apresentou uma forte correlação com a atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS ($r^2 = 0,810$), colocando o genótipo L22P13 em destaque, uma vez que este apresentou o maior valor de atividade antioxidante pelo método ABTS, quando comparado aos demais genótipos e a estudos anteriores com o açaí (*E. oleracea*) (RUFINO et al., 2010; ROJANO et al., 2011; GIRONÉS-VILAPLANA et al., 2014) e outras bagas, como jussara (*Euterpe edulis*), jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), puçá-preto (*Mouriri pusa*), murta (*Blepharocalyx salicifolius*) e jambolão (*Syzygium cumini*) (RUFINO et al., 2010).

Em relação ao perfil de carotenoides, poucos estudos avaliaram a presença destes compostos no açaí (*E. oleracea*), sendo luteína, α -caroteno e β -caroteno identificados neste estudo e também relatados por Ribeiro et al. (2010). O carotenoide zeaxantina foi identificado pela primeira vez em açaí no presente trabalho. Os genótipos apresentaram-se como uma boa fonte de carotenoides, com destaque os genótipos BRS-PA_{MISTA} e L22P13, que apresentaram os maiores teores de carotenoides totais. Os teores de carotenoides quantificados neste estudo

foram mais elevados que os relatados por Ribeiro et al. (2010) e Kang et al. (2012) para o açaí (*E. oleracea*) e também superiores aos relatados para outras bagas, como amora-preta (*Rubus* sp.), amora-silvestre (*Rubus chamaemorus*), groselha (*Ribes grossularia*), framboesa (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), cereja (*Prunus* sp.), groselha-preta (*Ribes nigrum*), morango (*Fragaria* sp.), oxicoco (*Oxycoccus palustris*) e uva (*Vitis* sp.) (MÜLLER, 1997; LASHMANOVA; KUZIVANOVA; DYMOVA, 2012). Os carotenoides apresentaram uma correlação moderada com a atividade antioxidante (método ABTS) apresentada pelos diferentes genótipos ($r^2 = 0,503$). Os teores de vitamina A (3,44–5,05 $\mu\text{g/g}$), relacionados ao conteúdo de β -caroteno presente nos genótipos, indicam que o açaí pode auxiliar na ingestão desta importante vitamina, visto que a deficiência desta está relacionada a danos visuais, anemia e baixa resistência a infecções na infância e atualmente acomete uma considerável parcela da população mundial (Organização Mundial de Saúde, 2013).

Nos diferentes genótipos de açaí o conteúdo de compostos fenólicos não apresentou um incremento em relação a amostra comercial, diferente ao observado no conteúdo de antocianinas. Isso pode ser atribuído as diferentes proporções de compostos fenólicos extraídos pela mistura de solventes polares (metanol e água) e apolar (acetona), sendo que os compostos fenólicos, são hidrofílicos, apresentando uma maior afinidade a solventes polares (MELO et al. 2008). Adicionalmente, também compostos não-fenólicos extraídos podem ter exercido uma interferência ao reagir com o reagente de Folin-Ciocalteau (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O conteúdo de compostos fenólicos não apresentou correlação com a atividade antioxidante, semelhante ao observado por Kähkönen et al. (1999) e Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005). Isso pode ser atribuído a diferença entre o perfil fenólico dos genótipos (tipos e proporções dos compostos fenólicos) (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005; JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009) e os efeitos sinérgicos ou antagônicos entre os diferentes compostos fenólicos na inibição das ERs (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009).

Variações relacionadas à composição centesimal, físico-química, identificação e quantificação de compostos bioativos podem ser atribuídas a diferentes fatores, entre eles localização, tipo de solo e condições climáticas do plantio, época de colheita, maturidade dos frutos, variedades genéticas de cultivares, bem como fatores laboratoriais de preparo da amostra e uso de diferentes solventes e métodos de extração (ROGEZ et al., 2011; DIAS et al., 2012; BOCHI; GODOY; GIUSTI, 2015; RADUNIĆ et al., 2015). Uma vez que no presente estudo, as condições foram semelhantes para todos os genótipos avaliados, podemos sugerir que as variações observadas se devem ao melhoramento genético.

Em um segundo momento (manuscrito 2), pensando na obtenção de extratos ricos em antocianinas e carotenoides que futuramente possam ser aplicados em produtos alimentícios, optou-se pela extração utilizando uma solução de etanol (50%) acidificada com ácido clorídrico (0,1%). As polpas liofilizadas dos diferentes genótipos foram utilizadas, sendo identificadas e quantificadas as antocianinas e carotenoides presentes nos extratos, seguindo para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* utilizando os métodos ABTS, oxidação da glutathione (GSH) e método da desoxirribose. Adicionalmente, o efeito neuroprotetor dos extratos hidroetanólicos de diferentes genótipos de açaí frente as ERs geradas pelo insulto de H₂O₂ foi avaliado utilizando células SH-SY5Y.

O uso da solução hidroetanólica (50%) com agitação mecânica de 2 h apresentou uma excelente eficiência de extração das antocianinas totais (70-100%) quando comparados os teores apresentados no manuscrito 1. Novamente o genótipo L22P13 apresentou o maior conteúdo considerando os genótipos estudados e a amostra comercial. No entanto uma menor eficiência (18-40%) foi observada na extração de carotenoides a partir dos extratos hidroetanólicos, explicada pela menor afinidade destes compostos lipofílicos semi-polares (xantofilas – luteína e zeaxantina) e apolares (α -caroteno e β -caroteno) com o solvente utilizado (etanol e água) (CHAN et al., 2015).

No presente estudo, diferentes concentrações (0,5, 5,0 e 50 μ g/mL) do extrato hidroetanólico de cada genótipo foram avaliadas com relação a atividade antioxidante e efeitos neuroprotetores. Tais concentrações foram escolhidas baseadas no estudo de Wong et al., (2013), onde o extrato de açaí (0,5-50 μ g/mL) preveniu a citotoxicidade causada pelo peptídeo β -amilóide em células PC12.

Com relação ao método do ABTS, os diferentes genótipos na concentração de 50 μ g/mL foram responsáveis por uma menor geração do radical ABTS, exceto o genótipo L06P13, onde na concentração de 5 μ g/mL já havia redução significativa na geração do radical. Embora sem diferenças significativas, os genótipos L06P13, L22P13 e BRS-PA_{MISTA} apresentaram uma tendência a melhor atividade antioxidante pelo método ABTS em comparação a amostra comercial, quando analisados os valores de concentração inibitória 50 (IC₅₀) (74, 94 e 96 vs. 121 μ g/mL, respectivamente). Adicionalmente, houve correlação inversa e moderada dos teores de antocianinas e carotenoides com os valores de IC₅₀ do método ABTS ($r^2 = -0,646$ e $-0,501$, respectivamente). No método de degradação da desoxirribose, onde avaliou-se o potencial dos extratos na remoção do radical hidroxil (\cdot OH), também foram observados efeitos apenas na concentração de 50 μ g/mL, embora tal efeito esteja associado ao veículo. Também não houve correlação entre os valores de IC₅₀ e os teores de antocianinas (r^2

= -0,007) e carotenoides totais ($r^2 = -0,092$). Ainda, nenhum dos extratos foi capaz de proteger a oxidação de GSH induzida por H_2O_2 .

Os extratos hidroetanólicos de alguns genótipos de açaí apresentaram um aumento significativo nos teores de antocianinas e carotenoides quando comparados a amostra comercial, com destaque para os genótipos L09P09, BRS-PA_{MISTA} e L22P13 que apresentaram um incremento nos teores de antocianinas totais de 41 a 86% e em relação aos teores de carotenoides todos os genótipos apresentaram um incremento que variou de 77 a 165%. No entanto não foram observados aumentos significativos na atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos de ABTS, desoxirribose e GSH dos diferentes genótipos em comparação a amostra comercial quando analisados os valores de IC_{50} ($p > 0.05$).

Além de testes antioxidantes em meio acelular (ABTS, desoxirribose e GSH), os diferentes extratos hidroetanólicos de açaí foram avaliados quanto ao efeito protetor de células SH-SY5Y insultadas por H_2O_2 . Os diferentes extratos apresentaram efeito protetor as células SH-SY5Y frente as ERs geradas pela presença de H_2O_2 . Esse modelo de célula foi escolhido em função das respostas funcionais semelhante aos neurônios demonstrados em diversos estudos (FERNÁNDEZ-MORIANO et al., 2015; VENUPRASAD; KUMAR; KHANUM, 2013; RABELO et al., 2012). Adicionalmente, as células SH-SY5Y se mostram sensíveis a sensores de apoptose como é o caso do H_2O_2 (UBERTI et al., 2002). No presente estudo, o genótipo L09P09 apresentou uma capacidade de proteção no teste da DCFH-DA em todas as concentrações testadas, sendo que na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ o efeito foi semelhante ao trolox, utilizado como antioxidante padrão. Os outros genótipos L22P13, BRS-PA_{MISTA} e L06P13 apresentaram um efeito protetor nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que para os genótipos L11P09 e L04P16 este efeito foi observado somente na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas nos valores de IC_{50} entre genótipos e a amostra comercial, exceto o genótipo L04P16 que apresentou um valor elevado de IC_{50} (139,6 $\mu\text{g/mL}$), evidenciando a baixa capacidade antioxidante desse extrato. Quando comparado aos demais, este genótipo também apresentou o menor teor de antocianinas. Em concordância, os teores de antocianinas e os valores de IC_{50} calculados para o ensaio da DCFH-DA apresentaram moderada correlação inversa ($r^2 = -0,785$) enquanto o teor de carotenoides apresentou uma fraca correlação ($r^2 = -0,127$).

Os resultados obtidos indicam que a atividade antioxidante dos genótipos de açaí não está completamente associada a ação isolada das antocianinas ou carotenoides, mas é o resultado de uma combinação de diferentes compostos, entre eles compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas que podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos entre si

(GARCÍA-ALONSO et al., 2004; MELO et al., 2008). Considerando a estrutura das membranas celulares e as interações físico-químicas específicas dos compostos bioativos (fortemente associadas as propriedades biológicas) (PASHKOW; WATUMULL; CAMPBELL, 2008), as antocianinas (hidrofílicas) podem constituir uma barreira de proteção contra as ERs, ligando-se à interface hidrofílica da camada lipídica da membrana plasmática (OTEIZA et al., 2005; TAROZZI et al., 2010). Já os carotenoides, dependendo de sua estrutura podem assumir uma posição espacial de modo que a cadeia poliênica remova as espécies reativas no interior hidrofóbico da membrana plasmática, enquanto os anéis polares removem as espécies reativas na superfície hidrofílica (xantofilas/luteína e zeaxantina), podendo gerar alterações nas propriedades físicas da membrana plasmática, relacionadas a fluidez e barreira contra as ERs (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004; GRUSZECKI; STRZALKA, 2005).

No presente estudo, os extratos hidroetanólicos de açaí não apresentaram efeitos pró-oxidantes às células SH-SY5Y. Adicionalmente, a maioria dos genótipos (exceto L04P16) não apresentou efeitos negativos a viabilidade celular *per se*. As células tratadas com o genótipo L04P16 apresentaram leve alteração na morfologia e perda da viabilidade, visualizada pelo teste da SRB. Uma vez que as células não foram submetidas a nenhum insulto tóxico, os mecanismos relacionados a esse efeito são desconhecidos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo acerca de genótipos de açaí (*E. oleracea*) desenvolvidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Oriental nos permitem concluir que:

- Os diferentes genótipos de açaí apresentaram alto valor nutricional, além de serem excelentes fontes de antocianinas e carotenoides. Diferenças significativas quanto aos parâmetros de composição centesimal, antocianinas e carotenoides dos genótipos foram observadas quando comparados à amostra comercial, além de uma maior atividade antioxidante obtida pelo método ABTS.
- O uso de uma solução hidroetanólica como solvente apresentou uma boa eficiência na extração de compostos bioativos, principalmente as antocianinas, o que possibilita futuras aplicações destes extratos em produtos alimentícios e/ou farmacêuticos.
- Os extratos hidroetanólicos elaborados a partir dos diferentes genótipos de açaí apresentaram ação antioxidante (método ABTS e desoxirribose) e ação neuroprotetora frente a geração de ERs induzidas pelo H₂O₂ em células SH-SY5Y, sendo a maioria dos genótipos livre de citotoxicidade (método SRB e morfologia qualitativa).

Com base nos resultados obtidos, o presente estudo evidencia o efeito do melhoramento genético em características de composição centesimal, físico-químicas, compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e em meio celular. A combinação dos efeitos sinérgicos ou antagônicos dos diversos constituintes do açaí (compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas) pode explicar as variações de efeitos antioxidantes nos diferentes testes avaliados. Sugere-se uma caracterização detalhada dos diferentes compostos fenólicos e vitaminas presentes nos diferentes genótipos, a fim de melhor esclarecer a atuação destes compostos na atividade antioxidante *in vitro*. Adicionalmente, estudos *in vivo* são necessários para elucidar a atividade biológica dos genótipos de açaí.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 114-119, 2004.

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The Science behind lutein. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 57-83, 2004.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington: Horwitz W, 1997.

BADSHAH, H.; KIM, T. H.; KIM, M. O. Protective effects of Anthocyanins against Amyloid beta-induced neurotoxicity *in vivo* and *in vitro*. **Neurochemistry International**, v. 80, p. 51-59, 2015.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BATISTA, C. C. R. et al. Supercritical CO₂ extraction of açaí (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp. **The Journal of Supercritical fluids**, v. 107, p. 364-369, 2016.

BERNSTEIN, P. S. et al. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in normal subjects and in age-related macular degeneration patients. **Ophthalmology**, v. 109, n. 10, p. 1780-1787, 2002.

BOCHI, V. C.; GODOY, H. T.; GIUSTI, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food Chemistry**, v. 176, p. 234-243, 2015.

BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C.A. Detecting and measuring bioavailability of phenolic and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 91-151, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2000.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. 1998, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, p. 840-844, 2000.

CANUTO, G. A. B. et al. Physical and chemical characterization of fruit pulps from Amazonia and their correlation to free radical scavenger activity. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CAPOCASA, F. et al. Breeding strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) to oncrease fruit nutritional quality. **BioFactors**, v. 34, p. 67-72, 2008.

CARVALHO, A. V. **Otimização dos parâmetros tecnológicos para a produção de estruturados de frutas funcionais a partir de polpa de açaí e “mix” de taperebá com mamão**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. 52p. ISSN 1517-2201.

CARVALHO, A. V. et al. Optimization of the technological parameters to produce structured gels from assai palm fruit pulp. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 4, p. 232-241, 2010.

CASSIDY A. et al. High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. **Circulation**, v. 127, p. 188-196, 2013.

CHAN, P. T. et al. Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. **J Appl Phycol**, v. 27, p. 2377-2386, 2015.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005.

COBB, C. A.; COLE, M. P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiology of disease**, v. 84, p. 4-21, 2015.

COHEN, K. O. et al. **Caracterização físico-química e funcional da polpa extraída de frutos da cultivar de açaizeiro BRS Pará**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 24 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 70).

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2012.

CUNHA, C. R. et al. Caracterização físico-química da polpa de indivíduos experimentais de açaizeiro (*Euterpe oleraceae* mart.) com alta produtividade. **IX Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais**. Ilhéus, BA, 14 a 18 de Outubro de 2013.

DAMODARAN, S.; PARKIN. K. L.; FENNEMA O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANIELS, J. et al. A randomized controlled trial of increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, p. 13-16, 2014.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222-1229, 2006.

DIAS, A. L. S. et al. A rapid validated UHPLC–PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. **Journal of Chromatography B.**, v. 907, p. 108-116, 2012.
DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**, v. 32A, n. 1, p. 30-38, 1996.

DUBEY, R. K. et al. Assessment of phytochemical composition and antioxidant potential in some indigenous chilli genotypes from North East India. **Food Chemistry**, v. 188, p. 119-125, 2015.

DUGO, L.; NEGIS, Y.; AZZI, A. Antioxidants. **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**, p. 1-9, 2011.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

ERTAŞ, E.; ÖZER, H.; ALASALVAR, C. A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. **Food Chemistry**, v. 105, p. 756-760, 2007.

EVANS, J. A.; JOHNSON, E. J. The role of phytonutrients in skin health. **Nutrients**, v. 2, p. 903-928, 2010.

FARIAS NETO, J. T.; RESENDE, M. D. V.; OLIVEIRA, M. S. P. Seleção simultânea em progênies de açaizeiro irrigado para produção e peso do fruto. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, n. 2, p. 532-539, 2011.

FELZENSZWALB, I. et al. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 536-544, 2013.

FERNÁNDEZ-MORIANO, C. et al. Antioxidant and cytoprotective potentials of Parmeliaceae lichens and identification of active compounds. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 81, n. 2, p. 164-178, 2015.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, p. 33-39, 2007.

FRATANTONIO, D. et al. Palmitate-induced endothelial dysfunction is attenuated by cyanidin-3-O-glucoside through modulation of Nrf2/Bach 1 and NF-kB pathways. **Toxicology Letters**, v. 239, p. 152-160, 2015.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1271, p. 321-326, 1995.

GALLORI, S. et al. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, v. 59, n. 11-12, p. 739-743, 2004.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; LIMA, L. A. R. S. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1427-1430, 2008.

GAO, X. et al. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 78, p. 1138-1145, 2012.

GARCÍA-ALONSO, M. et al. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 13-18, 2004.

GHAFOOR, K.; JUHAIMI, F. Effects of anthocyanins as nutraceuticals. **Agro Food Industry Hi Tech**, v. 25, n. 4, p. 9-13, 2014.

GIASSON, B. I. et al. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 12, p. 1264-1275, 2002.

GIRONÉS-VILAPLANA, A. et al. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. **Journal of functional foods**, v. 7, p. 599-608, 2014.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Agricultural Handbook, Washington, D.C.: Agricultural Research Service, 1970.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, p. 87-94, 2006.

GORDON, A. et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 256-263, 2012.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 1, p. 43-46, 2012.

GRUSZECKI, W. I.; STRZALKA, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 108-115, 2005.

GUILLAND, J. C.; LEQUEU, B. **As vitaminas: do Nutriente ao medicamento**; Santos: São Paulo, Brasil, 1995. (Original Les Vitamines Tec & Doc; Lavoisier: Paris.).

GUTTERIDGE, J. M. C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 91, p. 133-140, 1994.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implication for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**, p. 1-9, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, v. 165, n. 1, p. 215-219, 1987.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 10-21, 2011.

HOGAN, S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

HOMMA, A. K. O. **Sistema de Produção do Açai**. In: Sistemas de Produção, v.4. Açai. Embrapa Amazônia Oriental, 2006. ISSN 1809-4325 versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/mercado.htm> Acesso em: 08 de fevereiro de 2016.

HONG-RONG, X.; LIN-SEN, H.; GUO-YI, L. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese Medical Journal**, v. 123, p. 1086-1092, 2010.

IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Rio de Janeiro, v. 29, p. 1-56, 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/74/pevs_2014_v29.pdf> Acesso em: 08 de fevereiro de 2016.

JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 107-113, 2009.

JACOPO, D. et al. Physico-chemical characteristics of thermally processed purée from different strawberry genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 43, p. 106-118, 2015.

JENSEN, G. S. et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded,

placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8326-8333, 2008.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KANG, J. et al. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610-617, 2010.

KANG, J. et al. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 152-157, 2011.

KANG, J. et al. Bioactivities of açai (*Euterpe precatória* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 671-677, 2012.

KHOO, H. E. et al. Antioxidative and cardioprotective properties of anthocyanins from defatted Dabai extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

KONG, J. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

KRAUJALYTĖ, V. et al. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. **Food Chemistry**, v. 188, p. 583-590, 2015.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1390-1393, 1997.

LASHMANOVA, K. A.; KUZIVANOVA, O. A.; DYMOVA, O. V. Northern berries as a source of carotenoids. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, p. 133-134, 2012.

LEE J.; GIORDANO S.; ZHANG J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 441, p. 523-540, 2012.

LI, H. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, v. 112, p. 454-460, 2009.

LINTIG, J. V.; VOGT, K. Filling the gap in vitamin A research. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 11915-11920, 2000.

LORENZI et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Nova Odessa, SP, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin system in cell death progression. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 0, n. 0, p. 1-10, 2012.

LU, Q. et al. Inverse associations between plasma lycopene and other carotenoids and prostate cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 749-756, 2001.

MA, L. et al., A dose-response meta-analysis of dietary lutein and zeaxanthin intake in relation to risk of age-related cataract. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 252, p. 63-70, 2014.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230-242, 2005.

MARTÍNEZ-VALDIVIESO, D. et al. Physical and chemical characterization in fruit from 22 summer squash (*Cucurbita pepo* L.) cultivars. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, p. 1225-1233, 2015.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATHEUS, M. E. et al. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 291-296, 2006.

MATTIETTO, R. A. **Árvore do Conhecimento Açaí**. In: Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/arvore/CONT000gbfbxyh002wx5ok07shnq9mlwseck.html#>> Acesso em: 08 de fevereiro de 2016.

MAZUR, S. P. et al. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. **Food Chemistry**, v. 160, p. 233-240, 2014.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 2, p. 311-316, 2008.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4102-4106, 1998.

MOEHNINSI; NAVARRE, D. A.; BROWN, C. R. Phytonutrient content of *Solanum sisymbriifolium* Lam. Berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 73-79, 2015.

MORDI, R. C.; WALTON, J. C. Oxidative degradation of β -carotene and β -Apo-8'-carotenal. **Tetrahedron**, v. 49, n. 4, p. 911-928, 1993.

MÜLLER, H. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. **Z. Lebensm Untes Forsch A**, v. 204, p. 88-94, 1997.

NEVES, L. T. B. C. et al. Qualidade de frutos processados artesanalmente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 37, p. 729-738, 2015.

NOGUEIRA, O. L. **Sistema de Produção do Açaí**. In: Sistemas de Produção, v.4. Açaí. Embrapa Amazônia Oriental, 2006. ISSN 1809-4325 versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/intro.htm> Acesso em: 08 de fevereiro de 2016.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OANCEA, S.; STOIA, M.; COMAN, D. Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 489-495, 2012.

OLIVEIRA, M. S. P.; FARIAS NETO, J. T. **Cultivar BRS-Pará: Açaizeiro para produção de frutos em terra firme**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 3p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 114).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guideline: Vitamin A supplementation in infants 1-5 months of life**. Geneva, World Health Organization, 2013.

OTEIZA, P. I. et al. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? **Clinical & Developmental Immunology**, v. 12, n. 1, p. 19-25, 2005.

OZDEMIR, E. et al. Serum selenium and plasma malondialdehyde levels and antioxidant enzyme activities in patients with obsessive – compulsive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, p. 62-65, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. T. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p. 620-628, 2007.

PALACE, V. P. et al. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 5-6, p. 746-761, 1999.

PARÁ. Governo do Estado do Pará. Decreto nº 326, de 20 de janeiro de 2012. Referente ao Programa estadual de qualidade do açaí. **Constituição Estadual**, Pará, 20 jan. 2012.

PASHKOW, F. J.; WATUMULL, D. G.; CAMPBELL, C. L. Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A; p. 58-68, 2008.

PEIFFER, D. S. et al. Dietary consumption of black raspberries or their anthocyanin constituents alters innate immune cell trafficking in esophageal cancer. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2015.

PEQA. Programa Estadual de Qualidade do Açaí. Disponível em: <http://sedap.pa.gov.br/posts/subarea/lista_de_estabelecimentos_com_certificado_de_qualidade/o_programa_estadual_de_qualidade_do_acai_peqa> Acesso em: 08 de fevereiro de 2016.

PEREIRA E. A., QUEIROZ A. J. M., FIGUEIRÊDO R. M. F. Massa específica de polpa de açaí em função do teor de sólidos totais e da temperatura. **Rev. Bras. Eng. Agric. Ambiental**, v. 6, p. 526-530, 2002.

PERTUZATTI, P. B. et al. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. **Food Chemistry**, v. 164, p. 81-88, 2014.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POLL, H. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2013**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013.

POULOSE, S. M. et al. Anthocyanin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1084-1093, 2012.

POULOSE, S. M. et al. Restoration of stressor-induced calcium dysregulation and autophagy inhibition by polyphenol-rich açaí (*Euterpe spp.*) fruit pulp extracts in rodent brain cells *in vitro*. **Nutrition**, v. 30, p. 853-862, 2014.

PRATHEESHKUMAR, P. et al. Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF- κ B signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 280, p. 127-137, 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RABELO, T. K. et al. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 304-314, 2012.

RADUNIĆ, M. et al. Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. **Food Chemistry**, v. 177, p. 53-60, 2015.

RAJENDRASOZHAN, S. et al. Deacetylases and NF- κ B in redox regulation of cigarette smoke induced lung inflammation: Implications in pathogenesis of COPD. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 4, p. 799-811, 2008.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, v. 55, p. 207-216, 2007.

RAO, S. et al. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 2-7, 2011.

REMACLE J. et al. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. **Mutation Research**, v. 316, p. 103-122, 1995.

RIBEIRO, J. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 695, n. 1–2, p. 22-28, 2010.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROCHA, A. P. M. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97-104, 2007.

ROCKENBACH, I. I. et al. Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

ROGEZ, H. et al. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 6, p. 796-800, 2011.

ROJANO, B. A. et al. Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de palma naidi (açai colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart). **Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín**, v. 64, p. 6213-6220, 2011.

ROSSO, V. V. et al. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 291-299, 2008.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. S. M. et al. Açai (*Euterpe oleraceae*) “BRS Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100-2106, 2011.

SANGIOVANNI, J. P. et al. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study. **Arch Ophthalmol**, v. 125, n. 9, p. 1225-1232, 2007.

SANTOS, G. M. et al. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos Latino Americanos de Nutricion**, v. 58, p. 187-192, 2008.

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, p. 172-188, 2008.

SCALZO, J. et al. Breeding and biotechnology for improving berry nutritional quality. **BioFactors**, v. 23, p. 213-220, 2005.

SCHANTZ M. et al. Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. **Journal Berry Research**, v. 1, p. 25-33, 2010.

SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006a.

SCHAUSS, A. G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006b.

SEDAP. Secretaria Estadual de Desenvolvimento Agropecuário e de Pesca (Pará). Disponível em <<http://www.sedap.pa.gov.br/pagina/agricultura>> Acesso em: 11 de fevereiro de 2016.

SESSO, H. et al. Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 47-53, 2004.

SHARONI, Y. et al. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, p. 259-269, 2012.

SILVA, D. F. et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-9, 2014.

SILVA, S. E. L. S.; SOUZA, A. G. C.; BERNI, R. F. **O cultivo do açaizeiro**. Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. 6 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado Técnico, 29).

SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas Brasil frutas**. São Paulo, Brasil: Empresa das Artes, 2005.

SINDHU, E. R. et al. Effect of carotenoid lutein on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma and its mechanism of action. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 4, p. 320-327, 2013.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SKIBSTED, L. H. Vitamin and non-vitamin antioxidants and their interaction in food. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, p. 355-358, 2012.

SNELLEN, E. L. M. et al. Neovascular age-related macular degeneration and its relationship to antioxidant intake. **Acta Ophthalmol. Scand.**, v. 80, p. 368-371, 2002.

SOUZA, M. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity on fruits from different açaí (*Euterpe oleracea* Mart) progenies. **Acta Hort**, v. 84, p. 455-458, 2009.

SOUZA, M. O. et al. Diet supplementation with açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7-8, p. 804-810, 2010.

SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381-386, 2012.

SPADA, P. D. S. et al. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of rats. **Journal of Medical Food**, v.12, p. 1084-1088, 2009.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 101-107, 2005.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 100-110, 2004.

TAROZZI, A. et al. Neuroprotective effects of anthocyanins and their *in vivo* metabolites in SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 424, p. 36-40, 2007.

TAROZZI, A. et al. Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity. **Neuroscience Letters**. v. 473, p. 72-76, 2010.

TERAO, J. Dietary Flavonoids as Antioxidants. **Food Factors for Health Promotion**, v. 61, p. 87-94, 2009.

TIRAPÉGUI, J. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. São Paulo (SP): Atheneu, 2002.

TONON, R.V.; FREITAS, S.S.; HUBINGER, M.D. Spray drying of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice: effect of inlet air temperature and type of carrier agent. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 35, p. 691-700, 2011.

UBERTI, D. et al. Pergolide protects SH-SY5Y cells against neurodegeneration induced by H₂O₂. **European Journal of Pharmacology**, v. 434, p. 17-20, 2002.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VAUZOUR, D. et al. The inhibitory effects of berry-derived flavonoids against neurodegenerative processes. **Journal of Berry Research**, v. 1, p. 45-52, 2010.

VENUPRASAD, M. P.; KUMAR, K. H.; KHANUM, F. Neuroprotective effects of hydroalcoholic extract of *Ocimum sanctum* against H₂O₂ induced neuronal cell damage in SH-SY5Y cells via its antioxidative defence mechanism. **Neurochem Res**, v. 38, p. 2190-2200, 2013.

VILAS BOAS, B. M. et al. Avaliação da qualidade de mangas ‘Tommy Atkins’ minimamente processadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p. 540-543, 2004.

VOUTILAINEN, S. et al. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 1265-1271, 2006.

WANG, H.; JOSEPH, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology Medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 612-616, 1999.

WARNER, R. H. Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 249-258, 1994.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896-8907, 2007.

WONG, D. Y. S.; MUSGRAVE, I. F.; HARVEY, B. S.; SMID, S. D. Açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against β -amyloid exposure *in vitro*. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 221-226, 2013.

WOODALL, A. A. et al. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 33-42, 1997.

WOODALL, A. A.; BRITTON, G.; JACKSON, M. J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 575-586, 1997.

WU, J. et al. Intakes of lutein, zeaxanthin and other carotenoids and age-related macular degeneration during 2 decades of prospective follow-up. **JAMA Ophthalmol**, v. 133, n. 12, p. 1415-1424, 2015.

WU, X. et al. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4069-4075, 2006.

YAHIA, E. M. The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. In: ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILARA, G.A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Hoboken: Wiley-Blackwell, p. 3-51, 2010.

YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.

YAN, B. et al. Specific serum carotenoids are inversely associated with breast cancer risk among Chinese women: a case-control study. **British Journal of Nutrition**, v. 115, p. 129-137, 2016.

YAN, F. et al. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG2 cells. **Food & Function**, v. 7, p. 425-433, 2015.

ZANATTA, C. F. et al. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9531-9535, 2005.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

ZAPATA-SUDO, G. et al. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 227, n. 14, p. 1-6, 2014.