



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ

CURSO DE MEDICINA

Prof. Dr. ARAMYS SILVA DOS REIS

YÁRON SANTOS DE ALENCAR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO MESOCARPO DE BABAÇU**

Imperatriz, Maranhão

2023

YÁRON SANTOS DE ALENCAR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO MESOCARPO DE BABAÇU**

Trabalho de Conclusão de Ciclo
apresentado ao Curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão –
UFMA/Imperatriz, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Medicina.

Orientador(a): Prof. Dr. Aramys Silva dos
Reis

Imperatriz, Maranhão

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Alencar, Yáron Santos de.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO MESOCARPO DE BABAÇU / Yáron Santos de
Alencar. - 2023.

46 f.

Orientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, 2023.

1. Attalea Speciosa. 2. Compostos Fenólicos. 3.
Citotoxicidade. I. Reis, Aramys Silva dos. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ
CURSO DE MEDICINA

YÁRON SANTOS DE ALENCAR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO MESOCARPO DE BABAÇU

Orientador: Aramys Silva dos Reis

A Banca Julgadora de trabalho de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, em
sessão pública realizada a 06/10/2023, considerou

(X) Aprovado

() Reprovado

Banca examinadora:

Profa. Dra. Michelli Erica Souza Ferreira

Universidade Federal do Maranhão – Curso de Medicina/CCIM

Profa. Ma. Caroline Martins de Jesus

Faculdade Florence

Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis

Universidade Federal do Maranhão – Curso de Medicina/CCIM

Imperatriz – MA, 06 de Outubro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter exercido de sua Graça infinita em minha vida por diversos momentos na confecção deste trabalho e na minha jornada na Medicina.

Agradeço aos meus pais e avós, por terem me ensinado no caminho que deveria andar quando era novo, e agora pelas incríveis quantidades de amor, carinho e suporte durante cada passo de minha formação pessoal e profissional.

Agradeço ao meu professor e orientador, Dr. Aramys Silva dos Reis, não só por toda a paciência e compreensão no ensino da pesquisa científica, mas acima de tudo por ter depositado fé em mim em todos os projetos que realizamos.

Agradeço aos meus amigos, Edson Júnior e Henrique Costa, que me aconselharam nos momentos de ansiedade e tornaram meu curso mais proveitoso, alegre e memorável.

Agradeço ao grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiopatologia e Intervenção Terapêutica e em especial à Mércia Machado Araújo Lima por todo o apoio, cooperação e aprendizados recebidos durante a fase experimental do meu trabalho.

Agradeço o Movimento Interestadual das Mulheres Quebradeiras de Coco Babaçu pelo fornecimento da farinha de mesocarpo de babaçu para o nosso projeto.

Agradeço tanto a Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) quanto o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo da ciência e pelo apoio à nossa pesquisa.

Agradeço também à Universidade Federal do Maranhão, pelas oportunidades de pesquisa e pelo apoio integral à formação profissional.

Título: BABASSU MESOCARP FLOUR ACTS AS A PHOTOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT AGENT

Autores: Yáron Santos de Alencar, Aramys Silva dos Reis

Status: Submetido

Revista: Acta Amazonica

ISSN: 1809-4392

Qualis: A3

Fator de Impacto: 1.091

DOI: Ainda não possui.

**Evaluation of the in vitro antioxidant activity of Babassu mesocarp hidroalcoholic
extract**

Yáron Santos ALENCAR¹, Aramys Silva REIS^{1,2*}

¹Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Centro de Ciências de Imperatriz, Curso de Medicina, Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica (LAFIT), Avenida da UFMA, Dom Afonso Gregory, CEP 65.915-240, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

²Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências de Imperatriz, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, Avenida da UFMA, Dom Afonso Gregory, CEP 65.915-240, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

Corresponding author: yaron.alencar@discente.ufma.br / <https://orcid.org/0000-0003-4642-9331>

Evaluation of the in vitro antioxidant activity of Babassu mesocarp hidroalcoholic extract

Abstract

In the search for new natural alternatives for antioxidant therapies in the context of chronic pathologies, we have identified babassu mesocarp flour as a promising candidate, considering its availability, chemical composition, and cost-effectiveness compared to traditional treatments. After selecting the hidroalcoholic extract, we investigated the amount of phenolic compounds and proanthocyanidins, as well as assessed antioxidant effects using DPPH, ABTS, and lipid peroxidation assays. To verify cell viability, we conducted the MTT cytotoxicity assay. We have confirmed that the sample exhibited concentration-dependent antioxidation, being more effective in reducing pre-existing free radicals. Furthermore, the extract did not show toxicity to the RAW cell line at the tested concentrations. Our results suggest that the hidroalcoholic extract of babassu mesocarp flour holds promise for neutralizing free radicals and developing new therapies for patients with conditions related to oxidative stress.

Keywords: *Attalea speciosa*, phenolic compounds, cytotoxicity

Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de Babaçu

Resumo

Através da busca de novas alternativas naturais para terapias antioxidantes no contexto de patologias crônicas, encontramos a farinha de mesocarpo de babaçu como uma pretendente favorável, considerando sua disponibilidade, composição química e módico custo comparado aos tratamentos tradicionais. Após a seleção do extrato hidroalcoólico, investigamos a quantidade de compostos fenólicos e proantocianidinas, além de avaliar efeitos antioxidantes com os ensaios de DPPH, ABTS e peroxidação lipídica. Para verificar a viabilidade celular, fizemos o ensaio de citotoxicidade MTT. Comprovamos que a amostra demonstrou antioxição de forma concentração-dependente, sendo mais efetiva para redução de radicais livres pré-existentes. Além disso, o extrato não demonstrou toxicidade para a linhagem RAW, nas concentrações que foram testadas. Nossos resultados sugerem que o extrato hidroalcoólico da farinha de mesocarpo de babaçu se mostra como uma possibilidade auspiciosa no sentido de neutralizar radicais livres e desenvolvimento de novas terapias para pacientes com condições relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Attalea speciosa*, compostos fenólicos, citotoxicidade

INTRODUÇÃO

O papel vital do oxigênio em reações de oxidação-redução e processos enzimáticos é amplamente reconhecido, uma vez que o oxigênio é um ator central na produção de energia celular e na manutenção de equilíbrio bioquímico (Rigoulet et al. 2020). Contudo, em certos contextos, a transferência de elétrons durante essas reações pode resultar em elétrons desemparelhados, originando os temíveis radicais livres, ou Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Embora desempenhem papéis fisiológicos essenciais na regulação da homeostase celular, as EROs também podem infligir danos significativos às moléculas biológicas, incluindo lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas. Quando os sistemas de defesa antioxidante do organismo não conseguem neutralizar de forma eficaz esses radicais livres, surge um estado de desequilíbrio conhecido como estresse oxidativo (Barbosa et al. 2010). Condições médicas crônicas, como o Alzheimer e a aterosclerose, revelam indicadores desse estresse, apontando para a sua influência prejudicial em processos biológicos críticos e na progressão dessas patologias (Chen and Zhong 2014, Kattoor et al. 2017, Teleanu et al. 2022).

Para enfrentar os desafios associados aos antioxidantes sintéticos, a pesquisa tem se voltado para fontes naturais de compostos bioativos, entre elas, os vegetais (Penkov et al. 2018, Salekzamani et al. 2019). Dentre esses compostos, os fenólicos têm se destacado por suas notáveis propriedades antioxidantes. Eles atuam não apenas como agentes que neutralizam radicais livres, mas também desempenham um papel vital na preservação de moléculas essenciais, contribuindo assim para a manutenção da integridade celular (Soares 2002, Nunes et al. 2018, Gulcin 2020). Uma das espécies que se destacam como fonte de compostos fenólicos é o babaçu (*Attalea speciosa*), tendo em vista os achados na

farinha e no amido do mesocarpo (Maniglia and Tapia-Blácido 2016, Maniglia et al. 2017, Silva et al. 2017).

O babaçu (*Attalea speciosa*) é uma palmeira nativa da região de transição amazônica e encontrada principalmente na região da "Mata dos Cocais"(Reis et al. 2017). Estudos confirmaram a presença de flavonoides, triterpenoides e saponinas em sua composição, todos esses componentes mostraram possuir considerável atividade antioxidante em investigações anteriores (Soares 2002, Gülçin et al. 2004, Gulcin et al. 2006, Oliveira et al. 2016). Consequentemente, é importante prospectar essa possibilidade, através de ensaios que meçam a atividade antioxidante do babaçu (Carrazza et al. 2012, Oliveira et al. 2016, Nobre et al. 2018).

Nesse contexto, nossa pesquisa concentrou-se em avaliar a atividade antioxidante da farinha de mesocarpo de babaçu, particularmente enfocando sua fração hidroalcóolica. Além disso, empregamos análises detalhadas para caracterizar o perfil químico dessa amostra, buscando identificar e quantificar os compostos fenólicos e outros constituintes bioativos presentes. Adicionalmente, conduzimos estudos in vitro para investigar os efeitos citotóxicos da amostra, contribuindo assim para uma compreensão mais abrangente de suas propriedades biológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Farinha do mesocarpo de babaçu

A farinha do mesocarpo de babaçu, armazenada em embalagem de 500g, foi obtida da pela Cooperativa Interestadual das Mulheres Quebradeiras de Coco Babaçu, São Luís, Maranhão, Brasil.

Preparação do extrato

Para o preparo do extrato hidroalcoólico, utilizamos 200g de farinha de mesocarpo. Dessa forma, a maceramos a farinha em uma relação de 1:4 (extrato:solvente) em solução hidroetanólica 70% por 48h ao abrigo da luz. Em sequência, o filtramos o extrato e armazenamos a solução em frasco âmbar para ser então conservada na geladeira até a etapa de concentração. Submetemos o extrato à concentração em evaporador rotativo (Quimis, modelo Q34432) na temperatura de 45°C. Ao final desta etapa, armazenamos o extrato em dessecador com sílica. O rendimento final foi 3,45g (4,23%).

Determinação de compostos fenólicos

Para determinar os compostos fenólicos em todos os extratos e frações, utilizamos o reagente Folin Ciocalteu e o carbonato de sódio a 20%. Ao final das preparações, colocamos os tubos de ensaio que continham as diluições em homogeneização e depois de 120 minutos armazenados ao abrigo da luz, os levamos para leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Perkin-Elmer, Inc., Walthman, EUA) a 760 nm e então

construímos uma curva de calibração através do uso do ácido gálico como padrão. Analisamos as amostras em triplicata e calculamos as médias dos valores encontrados para que fossem expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG g⁻¹) (Silva et al. 2017).

Determinação de proantocianidinas

Determinamos o valor da concentração de flavonoides com o uso de Cloreto de Alumínio e Metanol a 5%. Efetuamos este ensaio em triplicata e se sucedeu de forma que colocamos as amostras ao abrigo da luz por 30 minutos após homogeneização para então analisarmos no espectrofotômetro com as mesmas condições do ensaio anterior, agora em 425 nm e com uma curva de calibração com catequina. Com a obtenção dos resultados, foi calculamos a média e expressamos os valores em equivalentes de quercetina (mg EAQ g⁻¹) (Silva et al. 2017).

Atividade antioxidante in vitro

Ensaio de sequestro de radicais DPPH•

Para determinar a atividade antioxidante com o método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), foi realizarmos a diluição da amostra em metanol em concentrações que variaram de 2,5 a 100 ug mL⁻¹ a uma solução de DPPH em 40 ug mL⁻¹, sendo o DPPH como controle e o Metanol como branco. Depois de 30 minutos em abrigo da luz, realizamos a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Gehaka UV-340G) a 517 nm. As concentrações de catequina em 2 a 8 µg mL⁻¹ e ácido ascórbico em 2,5 a 10

$\mu\text{g mL}^{-1}$ foram utilizadas como controles positivos. A atividade antioxidante (AA) foi calculada usando a equação:

$$AA(\%) = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100 / A_{\text{radical}}],$$

onde A é a absorbância.

Realizamos as análises em triplicata e os resultados foram expressos pela concentração efetiva (CE50), correspondente à concentração das amostras necessárias para eliminar 50% dos radicais (Dutra et al. 2014).

Ensaio de formação de radicais ABTS•+

Realizamos inicialmente com a preparação do radical a ser usado nos ensaios através de 7mM L^{-1} de solução de ABTS com persulfato de sódio a $2,45\text{ mM L}^{-1}$ e armazenamos a mistura ao abrigo da luz por 16 horas. Depois, usamos o radical diluído em etanol P.A e lemos em espectrofotômetro UV-Vis a 734 nm, onde uma absorbância de $0,700 \pm 0,020$ UA é tida como o ideal para se iniciarem os testes. Então, 400 μL do extrato foi adicionado em diferentes concentrações (10 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ao volume final de 3 mL de mistura do radical ABTS•+. Depois de 6 minutos, a absorbância foi determinada em 734 nm. O etanol foi utilizado como branco, sendo que a catequina e o ácido ascróbico foram usados como controles positivos. A

atividade antioxidante (AA) foi calculada usando a equação: $AA (\%) = 100 - [(A_{amostra} - A_{branco}) \times 100 / A_{radical}]$, onde A é a absorbância. Fizemos as análises em triplicata e expressamos os resultados como concentração efetiva (CE50), que corresponde à concentração dos extratos necessária para eliminar 50% dos radicais (Dutra et al. 2014).

Ensaio de peroxidação lipídica

Para o experimento, utilizamos um ensaio adaptado de reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) tendo uma solução de gema de ovo com água destilada como substrato lipídico para peroxidação. Associamos a gema homogeneizada (250 uL) a uma proporção de 10% do extrato de babaçu diluído em Etanol PA ACS (20 mg mL⁻¹) esterilizado e ao reagente de Fenton, uma solução de sulfato de ferro II em água destilada e peróxido de hidrogênio [50% FeSO₄ (50% H₂O₂)⁻¹] criada para gerar peroxidação no composto. Realizamos o mesmo processo com ácido ascórbico no lugar do extrato para gerar uma comparação do potencial antioxidante do babaçu com uma substância que sabidamente já tem essa propriedade amplamente registrada. Também preparamos 2 grupos controle: 1 sem reagente de Fenton e o outro com reagente de Fenton, mas sem fator antioxidante. Após uma incubação ao abrigo da luz por 30 min para induzir a peroxidação, adicionamos 750 uL de TBA (0,8% peso volume⁻¹), 750 uL de ácido acético (20% v v⁻¹) e 25 uL de ácido tricloroacético (20% peso volume⁻¹) e levamos a mistura ao banho-maria a 95°C por 60 min. Então, adicionamos 3 mL de álcool butílico e centrifugamos a solução a 3000 RPM por 10 min. Por último, avaliamos a propriedade antioxidante em espectrofotômetro, configurado para 532 nm através da identificação de

seu valor de absorbância na camada superior do tubo de ensaio, que contém butanol (Nobre et al. 2018).

Ensaio de citotoxicidade in vitro

Realizamos um ensaio de citotoxicidade in vitro utilizando a linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, que são leucócitos encontrados na derme, a camada intermediária da pele (Kolter et al. 2019). Adicionamos as células RAW 264.7 a placas de 96 poços em uma concentração de 1×10^6 células mL^{-1} , com um volume final de 100 μL de meio RPMI (Sigma-Aldrich, Reino Unido). Suplementamos o meio com soro bovino fetal a 10% (Gibco, Reino Unido), 100 U mL^{-1} de penicilina (Sigma-Aldrich, Brasil), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Brasil), 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anfotericina (Gibco, Israel), 2 mM de glutamina (Gibco, Brasil) e 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, Brasil) para facilitar a distribuição e adesão das células. Incubamos então a 37°C , 5% de CO_2 e 95% de umidade por 12 horas.

Após a incubação, tratamos as células com a amostra selecionada em concentrações seriadas na proporção de 1:4 (500 a $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 48 horas, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. Para o grupo de controle, utilizamos amostras com diferentes concentrações ou apenas meio de cultura, enquanto usamos as células RAW 264.7 em meio RPMI suplementado como controle negativo. A fim de avaliar a viabilidade celular, adicionamos 10 μL de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Brasil) a uma concentração de 5 mg mL^{-1} por poço.

O ensaio de MTT se baseia em uma reação colorimétrica que converte o MTT, um composto amarelo solúvel em água, em cristais roxos e insolúveis de formazan. Essa

reação ocorre devido à atividade da enzima mitocondrial tetrazólio succinato redutase, que está ativa somente em células vivas (Mosmann 1983). Após 3 horas de incubação no escuro, descartamos o sobrenadante e adicionamos 100 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) (Synth, Brasil) para dissolver os cristais de formazan. Medimos a absorbância em 550 nm utilizando um leitor de microplacas (Biotek, EUA) para determinar a viabilidade e atividade celular.

Calculamos a viabilidade celular utilizando a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100 / (A_{\text{controle negativo}} - A_{\text{branco}})]$$

onde A = absorbância.

Nós realizamos análises em triplicata (Oliveira-Neto et al. 2022).

RESULTADOS

Compostos fenólicos e proantocianidinas

O extrato da farinha do mesocarpo apresentou uma concentração de 604,05mg EAG g⁻¹ de compostos fenólicos. Por outro lado, a concentração de proantocianidinas foi de 194,88 mg CAT g⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos fenólicos totais e proantocianidinas no extrato hidroetanólico da farinha de mesocarpo de babaçu.

	CFT (mg EAG g ⁻¹)	PT (mg CAT g ⁻¹)
Extrato	604,05 ± 33,47	194,88 ± 8,16

Os valores representam a média das medidas em triplicata ± desvio-padrão. CFT = compostos fenólicos totais; PT = proantocianidinas.

Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato (DPPH e ABTS)

No ensaio DPPH, obtivemos um valor de concentração efetiva superior ao controle positivo da catequina, porém inferior ao ácido ascórbico. Já no ensaio ABTS, observamos que o extrato se demonstrou inferior aos controles positivos, por ter permitido até 2 vezes mais radicais serem formados no substrato, no caso da catequina, e cerca de 1,6 vezes mais, no caso do ácido ascórbico (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antioxidante DPPH e ABTS⁺ do extrato hidroetanólico da farinha de mesocarpo de babaçu.

	DPPH (CE ₅₀ µg mL ⁻¹)	ABTS (CE ₅₀ µg mL ⁻¹)
Extrato	5,16 ± 0,19 ^a	4,79 ± 0,08 ^a
CAT	4,55 ± 0,04 ^a	2,34 ± 0,20 ^b
AA	5,28 ± 0,55 ^a	2,85 ± 0,02 ^b

Os valores representam a média das medidas em triplicata ± desvio-padrão. CAT = catequina; AA = ácido ascórbico. Valores com letras diferentes em 2 colunas do mesmo parâmetro indicam uma diferença significativa (Teste Tukey, one-way ANOVA) em $p \leq 0,05$.

Ensaio de peroxidação lipídica

Os valores de absorbância obtidos tanto para o extrato na concentração de 5 mg mL⁻¹ quanto de 10 mg mL⁻¹ apresentaram inibição da formação e/ou degradação efetiva de radicais livres em comparação com o controle negativo. Demonstramos que esses resultados aparecem de forma concentração-dependente, sem que haja intersecções entre as duas concentrações pelas variações dos valores das triplicatas (Figura 1).

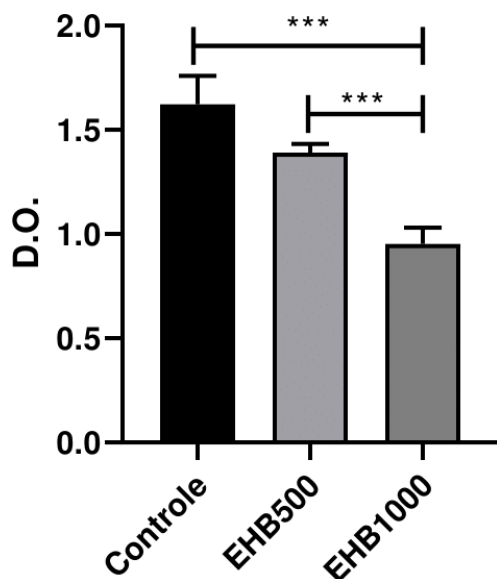


Figura 1. Valores de absorvância espectrofotométrica das análises de peroxidação lipídica do extrato hidroalcóolico do mesocarpo de babaçu. Controle = Controle negativo sem presença de amostra; EHB500 = Extrato hidroalcóolico bruto a 5 mg mL^{-1} ; EHB1000 = Extrato hidroalcóolico bruto a 10 mg mL^{-1} ; *** = P valor abaixo de 0,01. As barras acima das colunas demonstram a variação dos valores pelos testes em triplicata.

Ensaio de citotoxicidade

Nas diversas concentrações avaliadas, avaliamos que a viabilidade celular se demonstrou superior a 80% em comparação com as células não tratadas. Isso sugere que o extrato hidroalcóolico bruto não apresenta atividade citotóxica significativa nas concentrações testadas (Figura 2).

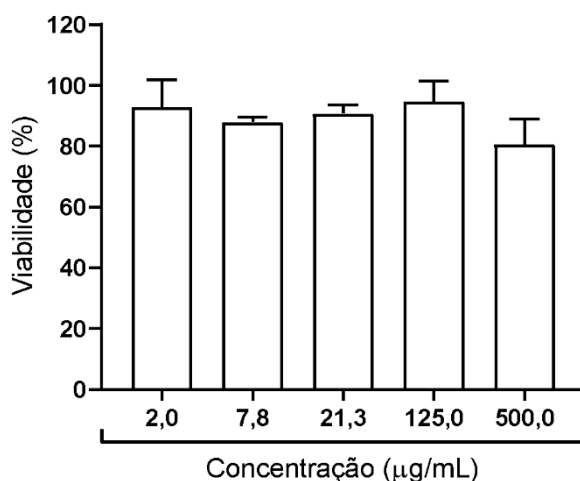


Figura 2. Efeito extrato hidroalcoólico da farinha de mesocarpo de babaçu contra a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7. As células foram tratadas com concentrações seriadas de extrato hidroalcoólico por 48 horas e a citotoxicidade foi medida pelo ensaio MTT. Os dados representam as médias $\pm$ os desvios padrões das culturas em triplicata.

DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta resultados que abordam a atividade intrínseca do extrato hidroalcoólico da farinha de mesocarpo de babaçu. Avaliamos a amostra usando diferentes abordagens no sentido de obter uma visão mais integral de suas características e possibilidades, tanto por meio de sua constituição quanto pela interação com processos de formação e/ou transformação de radicais livres. Ademais, avaliamos o princípio de citotoxicidade em sua composição através da interação com macrófagos.

Dentre as substâncias encontradas na análise estrutural do extrato, se destacam os compostos fenólicos, um grupamento químico que engloba grande gama de substâncias de origem vegetal caracterizadas por um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (Khoddami et al. 2013). Representados principalmente pelos flavonoides e ácidos fenólicos, eles têm um fundamental papel na preservação das espécies vegetais, pois realizam o sequestro de radicais livres e inibem a oxidação lipídica, tanto na iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (Soares 2002). Esse potencial de conservação biológico é demasiadamente desejado na indústria alimentícia e farmacêutica, sendo ele encontrado de forma eminente em uma subclasse dos flavonoides, cujos representantes são conhecidos como proantocianidinas (Soares 2002, Rauf et al. 2019, Gulcin 2020).

Devido a importância bioquímica dessa classe por seu potencial antioxidante, fizemos também a quantificação de seus compostos no extrato analisado. A correlação da atividade antioxidante com a presença dessas moléculas já foi analisada em outras espécies vegetais e no próprio babaçu (SUN et al. 2016, Santos 2020, Lima et al. 2023). Apesar de todos os artigos terem características em comum por se basearem em alguns dos mesmos métodos, todos tiveram suas variações na aplicação experimental, o que influenciou diretamente na obtenção dos resultados (Singleton and Rossi 1965, Sun et al. 1998).

Com base na comparação dos ensaios realizados, o nosso estudo teve proporcionalmente a maior efetividade na quantificação dos compostos fenólicos totais pela exclusão da etapa de abrigo de luz antes da adição de carbonato de sódio e pela preservação dos ajustes de mistura estabelecidas na metodologia original (Singleton and Rossi 1965). Apesar disso, a modificação da prática original por meio da alteração dos

volumes de vanilina e ácido clorídrico na análise de proantocianidinas teve o efeito reverso, pois o nosso estudo teve o menor resultado dentre os artigos observados (Sun et al. 1998, Silva et al. 2017, Santos 2020). Apesar dos baixos valores da subclasse de flavonoides, o resultado obtido de fenólicos totais serviu como preditor para o que foi encontrado no sentido de atividade antioxidante, considerando que os complexos mencionados têm atividade antioxidante registrada (Soares 2002, Gulcin 2020).

Considerando as observações em estudos anteriores sobre as propriedades antioxidantes nos compostos analisados tanto no babaçu quanto em outras espécies vegetais, utilizamos alguns testes para avaliar o potencial do extrato hidroalcoólico. O primeiro deles foi o ensaio de DPPH, que avalia a capacidade de uma substância de reduzir o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil em uma solução de metanol (Brand-Williams et al. 1995). A partir dessa análise, observamos que a amostra foi inferior à catequina e superior ao ácido ascórbico em reduzir 50% de radicais DPPH, conforme a concentração efetiva na Tabela 2.

Essa natureza diversa de resultados pode ser observada na comparação com outros estudos que também utilizaram o mesocarpo de babaçu em uma solução com presença de etanol. O ensaio de Lima et al. 2023 utilizou a mesma concentração de DPPH que o nosso estudo em uma de suas análises, porém modificou o tempo de incubação, o comprimento de onda do espectrofotômetro e a proporção de babaçu na amostra, fatores que levaram a resultados proporcionalmente inferiores em capacidade de redução do DPPH. Ainda assim, o teste realizado por Santos 2020 demonstrou um resultado superior pela média das concentrações utilizadas em sua amostra do extrato. Nesse ensaio, o comprimento de onda utilizado foi o mesmo de nosso ensaio, mas o autor se valeu de 5 minutos a menos

de incubação e valor fixo de solução de DPPH em metanol para todas as frações de babaçu.

Além do ensaio de DPPH, o teste de ABTS foi utilizado para avaliar o potencial antioxidante de nossa amostra. Esse ensaio consiste na observação da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) em solução com persulfato de sódio (Re et al. 1999). Inicialmente, o comparamos com os controles já testados na literatura, porém o extrato de babaçu teve resultado inferior nesse teste em relação à catequina e o ácido ascórbico. Essa proposta se confirma quando também observamos o estudo de Silva et al. 2017, que apesar de ter testado o mesmo extrato obteve resultado mais efetivo na atividade antioxidante. Isso se deve ao fato de nosso estudo ter utilizado diluições de concentração do extrato maiores que as do estudo mencionado, resultando em maior média estatística da concentração efetiva.

A última análise realizada para verificar o potencial antioxidante da farinha de mesocarpo do babaçu foi uma versão modificada do ensaio TBARS, que usa a gema de ovo como substrato lipídico (Ohkawa et al. 1979, Ruberto et al. 2000). Através da interação com o Reagente de Fenton, os ácidos graxos poli-insaturados formam um produto secundário chamado de Malondialdeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) usado no ensaio e demonstra uma coloração vermelho-arroseada, cuja intensidade é proporcional à quantidade de radicais gerados na solução (Upadhyay et al. 2014, Tsikas 2017, Reyhani et al. 2019). Esse método proporciona uma perspectiva diferente dos anteriores, pois a geração das EROs ocorre durante o ensaio em contraste com os outros que têm somente o radical pronto para ser neutralizado (Ohkawa et al. 1979, Gulcin 2020).

Outro diferencial do teste de peroxidação lipídica foram nossos resultados em comparação com outros estudos que utilizaram metodologia semelhante. Nosso estudo foi o primeiro a analisar o extrato hidroalcoólico do mesocarpo de babaçu com o ensaio modificado de TBA (Ohkawa et al. 1979, Ruberto et al. 2000). Por meio da inserção do extrato de babaçu na solução com TBA e Fenton, obtivemos resultado espectrofotométrico que indica redução de forma concentração-dependente da quantidade de radicais livres presentes em nossa amostra (Ohkawa et al. 1979, Reyhani et al. 2019). Análises com outras espécies vegetais, como a *Phyllanthus fraternus* Webster e a *Holarrhena floribunda*, indicaram que nosso extrato teve potencial antioxidante superior, conforme a comparação com a mesma concentração utilizada (Badmus et al. 2010, Upadhyay et al. 2014).

Com base na discussão dos 3 métodos abordados previamente, é possível afirmar que o nosso extrato tem atividade antioxidante comprovada (Lima et al. 2023). As análises realizadas neste estudo tiveram como objetivo a avaliação abrangente da amostra em sua interação com radicais livres, visando estabelecer uma base sólida para sua aplicação prática (Janero 1990). Isso se justifica devido à evidência de que o processo de estresse oxidativo no organismo humano é desencadeado fundamentalmente quando os mecanismos intrínsecos de prevenção da oxidação não funcionam adequadamente, muitas vezes devido à ocorrência de processos patológicos (Barbosa et al. 2010, Teleanu et al. 2022).

Há uma ampla quantidade de doenças que têm relação com o estresse oxidativo, sejam elas estimuladas por ele ou originadas por essa disfunção fisiológica (Barbosa et al. 2010). Muitas delas não têm tratamento definitivo, como a doença de Parkinson e o mal de Alzheimer, enquanto outras têm tratamentos, mas que não abordam diretamente

esse fator causal, como a hipertensão sistêmica e a aterosclerose (Chen and Zhong 2014, Ahmad et al. 2017, Kattoor et al. 2017, Teleanu et al. 2022). Para esses exemplos e outros, as terapias antioxidantes disponíveis ainda estão no máximo em estágio de estudo clínico ou em aplicações bem específicas, limitando as possibilidades terapêuticas considerando a multitude de doenças que têm estresse oxidativo em sua fisiopatologia (Zhang et al. 2020, Forman and Zhang 2021, Xu et al. 2022).

Com a perspectiva de analisar a possibilidade de nosso extrato ser utilizado como um fundamento para medicamentos que futuramente ajam como opções terapêuticas viáveis em patologias relacionadas ao estresse oxidativo, nós também estudamos seu potencial citotóxico em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 (Kolter et al. 2019). Nesse estudo, procuramos analisar fotometricamente a coloração demonstrada na solução da amostra com as células em meio RPMI e o brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que só muda sua tonalidade na presença de células vivas (Ghasemi et al. 2021). Além de não ter exibido efeitos citotóxicos notáveis em nossa avaliação com as células RAW, outros estudos demonstraram que o extrato de babaçu não exibiu prejuízo às células L929 também testadas em ensaio MTT (Santos 2020, Santos et al. 2020).

Levando em conta que nosso extrato de babaçu demonstrou a presença de compostos com atividade antioxidante conhecida, conseguiu neutralizar eficazmente radicais nos testes realizados e não exibiu atividade citotóxica significativa, é evidente que podemos prosseguir com segurança na realização de mais testes. Isso visa continuar explorando suas propriedades com o objetivo de desenvolver uma alternativa terapêutica para combater as patologias criadas pelo estresse oxidativo ou intensificadas por ele. Nossos resultados indicam consistentemente que o babaçu, em todos os testes realizados,

está em pé de igualdade ou até mesmo supera, em alguns casos, outras espécies vegetais atualmente estudadas para a prospecção de atividades antioxidantes (SUN et al. 2016, Penkov et al. 2018, Gulcin 2020).

CONCLUSÕES

Nosso estudo revelou novidades em relação ao extrato hidroetanólico da farinha de mesocarpo de babaçu, demonstrando seu potencial antioxidante nos testes DPPH, ABTS e de peroxidação lipídica. Isso decorre da presença de compostos fenólicos e proantocianidinas em sua composição. Ademais, também atestamos que é um produto com baixo potencial para citotoxicidade. Por causa dessas propriedades, o extrato hidroalcoólico de babaçu emerge como uma alternativa promissora em relação a antioxidantes sintéticos, oferecendo menor custo, eficácia comparável com o que já é utilizado no mercado e sem prejuízo celular significativo.

Reconhecimentos

Este trabalho foi fundado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA [concessão # 0429/18 – IECT BABAÇU]; pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES [Código de financiamento 001].

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ahmad, K.A.; Yuan Yuan, D.; Nawaz, W.; Ze, H.; Zhuo, C.X.; Talal, B.; et al. 2017. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. *Free Radical Research* 51: 428–438.
- Badmus, J.A.; Odunola, O.A.; Obuotor, E.M.; Oyedapo, O.O. 2010. Phytochemicals and in vitro antioxidant potentials of defatted methanolic extract of *Holarrhena floribunda* leaves. *African Journal of Biotechnology* 9: 340–346.
- Barbosa, K.; Costa, N.; Alfenas, R.; De Paula, S.; Minim, V.; Bressan, J. 2010. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição* 23: 629–643.

- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28: 25–30.
- Carrazza, L.R.; Carlos Cruz E Ávila, J.; Lima Da Silva, M. 2012. *Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto e da Folha do Babaçu (Attalea spp.)*. Brasília, 1–68p.
- Chen, Z.; Zhong, C. 2014. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin* 30: 271–281.
- Dutra, R.P.; Abreu, B.V. de B.; Cunha, M.S.; Batista, M.C.A.; Torres, L.M.B.; Nascimento, F.R.F.; et al. 2014. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of Geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 2549–2557.
- Forman, H.J.; Zhang, H. 2021. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 20: 689–709.
- Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. 2021. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 12827.
- Gulcin, İ. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* 94: 651–715.
- Gülçin, İ.; Mshvildadze, V.; Gepdiremen, A.; Elias, R. 2004. Antioxidant Activity of Saponins Isolated from Ivy: α -Hederin, Hederasaponin-C, Hederacolchiside-E and Hederacolchiside-F. *Planta Medica* 70: 561–563.

- Gulcin, I.; Mshvildadze, V.; Gepdiremen, A.; Elias, R. 2006. The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -d-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research* 20: 130–134.
- Janero, D.R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 515–540.
- Kattoor, A.J.; Pothineni, N.V.K.; Palagiri, D.; Mehta, J.L. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* 19: 42.
- Khoddami, A.; Wilkes, M.; Roberts, T. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 18: 2328–2375.
- Kolter, J.; Feuerstein, R.; Zeis, P.; Hagemeyer, N.; Paterson, N.; d’Errico, P.; et al. 2019. A Subset of Skin Macrophages Contributes to the Surveillance and Regeneration of Local Nerves. *Immunity* 50: 1482-1497.e7.
- Lima, R.C.; Carvalho, A.P.A. de; Silva, B.D.; Torres Neto, L.; Figueiredo, M.R. da S.; Chaves, P.H.T.; et al. 2023. Green ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds of babassu (*Attalea speciosa*) mesocarp: Effects of solid-liquid ratio extraction, antioxidant capacity, and antimicrobial activity. *Applied Food Research* 3: 100331.
- Maniglia, B.C.; Tapia-Blácido, D.R. 2016. Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. *Food Hydrocolloids* 55: 47–55.
- Maniglia, B.C.; Tessaro, L.; Lucas, A.A.; Tapia-Blácido, D.R. 2017. Bioactive films based on babassu mesocarp flour and starch. *Food Hydrocolloids* 70: 383–391.

- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.
- Nobre, C.B.; Sousa, E.O.; Camilo, C.J.; Machado, J.F.; Silva, J.M.F.L.; Filho, J.R.; et al. 2018. Antioxidative effect and phytochemical profile of natural products from the fruits of “babaçu” (*Orbignia speciose*) and “buriti” (*Mauritia flexuosa*). *Food and Chemical Toxicology* 121: 423–429.
- Nunes, A.R.; Rodrigues, A.L.M.; de Queiróz, D.B.; Vieira, I.G.P.; Neto, J.F.C.; Junior, J.T.C.; et al. 2018. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 189: 119–123.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351–358.
- Oliveira, A.I.T. De; Mahmoud, T.S.; Nascimento, G.N.L.D.; Silva, J.F.M. Da; Pimenta, R.S.; Morais, P.B. De. 2016. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Palm Leaf Extracts from Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Scientific World Journal* 2016: 9734181.
- Oliveira-Neto, J.G.; Filho, J.G.S.; Bittar, E.M.; Silva, L.M.; Sousa, F.F.; Domingos, H.V.; et al. 2022. Structural, thermal, electronic, vibrational, magnetic, and cytotoxic properties of chloro(glycinato-N,O)(1,10-phenanthroline-N,N')-copper(II) trihydrate coordination complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* 226: 111658.
- Penkov, D.; Andonova, V.; Delev, D.; Kostadinov, I.; Kassarova, M. 2018. Antioxidant Activity of Dry Birch (*Betula Pendula*) Leaves Extract. *Folia medica* 60: 571–579.

- Rauf, A.; Imran, M.; Abu-Izneid, T.; Iahtisham-Ul-Haq; Patel, S.; Pan, X.; et al. 2019. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 116: 108999.
- 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 and Medicine* 26: 1231–1237.
- Reis, M.Y.F.A.; Santos, S.M. dos; Silva, D.R.; Silva, M. V.; Correia, M.T.S.; Navarro, D.M.A.F.; et al. 2017. Anti-Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017: 1–14.
- Reyhani, A.; McKenzie, T.G.; Fu, Q.; Qiao, G.G. 2019. Fenton-Chemistry-Mediated Radical Polymerization. *Macromolecular Rapid Communications* 40: 1900220.
- Rigoulet, M.; Bouchez, C.L.; Paumard, P.; Ransac, S.; Cuvellier, S.; Duvezin-Caubet, S.; et al. 2020. Cell energy metabolism: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1861: 148276–148276.
- Ruberto, G.; Baratta, M.T.; Deans, S.G.; Dorman, H.J.D. 2000. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* Essential Oils. *Planta Medica* 66: 687–693.
- Salekzamani, S.; Ebrahimi-Mameghani, M.; Rezazadeh, K. 2019. The antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus*): A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Phytotherapy Research* 33: 55–71.

- Santos, J.A.A. 2020. *AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO BABAÇU (Attalea speciosa Mart. ex Spreng, Arecaceae) A PARTIR DO SEU USO ETNOMEDICINAL*. Doctorate Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1–159p.
- Santos, J.A.A.; Silva, J.W. da; Santos, S.M. dos; Rodrigues, M. de F.; Silva, C.J.A.; da Silva, M.V.; et al. 2020. In Vitro and In Vivo Wound Healing and Anti-Inflammatory Activities of Babassu Oil (*Attalea speciosa* Mart. Ex Spreng., Arecaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020: 1–10.
- Silva, V.C. Da; Barboza, J.R.; Dutra, R.P.; Cristina, M.; Batista, A.; Veras, K.S.; et al. 2017. Identification of phenolic compounds by LC/MS-MS and antioxidant and anti tyrosinase activities of the *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng. mesocarp. *Available online www.jocpr.com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2017: 268–276.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144–158.
- Soares, S.E. 2002. Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição* 15: 71–81.
- Sun, B.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Spranger, I. 1998. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4267–4274.
- SUN, Y.; XIU, C.; LIU, W.; TAO, Y.; WANG, J.; QU, Y. 2016. Grape seed proanthocyanidin extract protects the retina against early diabetic injury by activating the Nrf2 pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine* 11: 1253–1258.

- Teleanu, D.M.; Niculescu, A.-G.; Lungu, I.I.; Radu, C.I.; Vladâcenco, O.; Roza, E.; et al. 2022. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 5938.
- Tsikis, D. 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* 524: 13–30.
- Upadhyay, R.; Chaurasia, J.K.; Tiwari, K.N.; Singh, K. 2014. Antioxidant property of aerial parts and root of *Phyllanthus fraternus* webster, an important medicinal plant. *The Scientific World Journal* 2014.
- Xu, D.; Hu, Y.-H.; Gou, X.; Li, F.-Y.; Yang, X.-Y.-C.; Li, Y.-M.; et al. 2022. Oxidative Stress and Antioxidative Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension. *Molecules* 27: 3724.
- Zhang, P.; Li, T.; Wu, X.; Nice, E.C.; Huang, C.; Zhang, Y. 2020. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Frontiers of Medicine* 14: 583–600.

ANEXOS OU APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Instruções de confecção e submissão do artigo

Acta Amazonica publishes original research, in the form of full articles, reviews and short communications that focus on the Amazon biome. Studies concerned with parts of other biomes in the Legal Amazon (Cerrado and Caatinga) are not prioritized by the journal. Manuscripts have to be written in English and are submitted to a double-blind review process.

Submissions are accepted in the following research areas:

Agronomy and Forestry

Animal Sciences and Fisheries

Biodiversity and Conservation

Biotechnology

Chemistry and Pharmacology

Environmental Sciences

Food Sciences

Geosciences

Health Sciences

Human and Social Sciences

Materials Technology

GENERAL STYLE AND FORMAT

All manuscripts have to be submitted in English (both American and British English are accepted). As we use double-blind evaluation, all manuscripts have to be anonymized, i.e., all author information has to be submitted in a separate title-page file.

Manuscripts of all types have to be formatted as Office Word DOC/DOCX documents in A4 page size, with 3-cm margins all-round and continuous line numbering, written in Times Roman 12, with double line spacing throughout (including references and figure legends). Use single spacing for tables. Manuscript files should not exceed 2 MB.

Do not use one-sentence paragraphs. Avoid an excess of short paragraphs. Only one level of sub-titles is allowed within sections. Do not use sentences only to describe the content of tables or figures, as this information is redundant with figure legends and table captions.

Bibliographic citations are expected to be placed preferentially at the end of sentences, in parentheses. Use the format Smith (2007), (Smith 2007), Smith and Jones (2007), (Smith and Jones 2007), Smith et al. (2007), (Smith et al. 2007). Use the latter form for all references with more than three authors. List more than one citation in chronological order, and in alphabetical order for citations from the same year; for example: (Viana et al. 2001; Caldwell et al. 2007; Smith 2007; Benavides et al. 2017).

Cite figures and tables as (Figure 1) or (Table 1), etc. Cite figures and tables in the text in increasing numerical order. Place tables at the end of the manuscript. Figures have to be submitted separately (see below in Section Format).

Scientific names of species have to be written in italics and spelled out (e.g. *Leporinus macrocephalus*) in the title, and the first time they are cited in Abstract and Introduction. Use the abbreviated form (e.g. *L. macrocephalus*) in subsequent citations, except at the beginning of a sentence, when the name always has to be spelled out. Cite the author of the species (e.g. *Leporinus macrocephalus* Garavello and Britisk 1988) the first time it is cited after the Abstract.

Separate decimal fractions by a point, and separate numerals from measuring units by one space (e.g. 40.6 cm, 200.3 kcal), except for temperature units (e.g. 60°C, NOT 60 °C) and percentages (e.g. 5%, NOT 5 %). Use negative exponents instead of a slash (/) (e.g. cmol kg⁻¹ instead of cmol/kg; m s⁻¹, NOT m/s). Use space instead of point between symbols (e.g. m s⁻¹, NOT m.s⁻¹). Use kg instead of Kg and km instead of Km, etc. Formulas can be inserted in the text using the Office Word equation function tool.

Title page – Include in the title page file the title of the manuscript, the author names, authors' institutional affiliations, e-mail of the corresponding author, the Acknowledgments section, and the Data Availability section (see below in Data Policy).

Write in capital letters the part of the surname that each author wants to be used in citations, e.g., if Maria Souza Pereira wants to be cited as Pereira MS, she should write her name as Maria Souza PEREIRA. If she wants to be cited as Souza-Pereira M, she should write her name as Maria SOUZA PEREIRA.

Write the authors' institutional affiliation in the language of the country of the institution. Names of institutions in countries that do not use the latin alphabet should be written in English. Write the affiliation beginning with the higher hierarchical level (e.g. university, research institute), followed by city, state and country. Street address is optional. If the author is affiliated to more than one institution, list each affiliation separately. When two or more authors share the same affiliation, list it only once. Check a recent issue of the journal for the format of authors names and institutions. Do not include titles (PhD, MSc, etc.) or other "mini CV" information in the address.

Original article – Manuscripts submitted as “original article” have to be based on original research and are limited to a total length of 7500 words (including title, abstract, references, figure legends and tables). Up to five tables and seven figures can be included (see below in Section Format).

Organize the manuscript in the following sequence: title in English, Abstract, Keywords, version in Portuguese OR Spanish of title, abstract and keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Figure Legends, Tables.

Abstract and Resumo/Resumen are limited to 250 words. Results and Discussion are strictly separated sections. Do not repeat results, nor cite figures or tables, in the Discussion section.

Short Communication - Manuscripts submitted as “short communication” have to be based on original research that consists of more simple reports or data of not enough complexity for submission as an original article. They are limited to a total length of 2500 words (including title, abstract, references, figure legends and tables). Up to two tables and three figures can be included (see below in Section Format).

Organize the manuscript in the following sequence: title in English, Abstract, Keywords, version in Portuguese OR Spanish of title, abstract and keywords, body of the text (no section titles), References, Figure Legends, Tables.

Abstract and Resumo/Resumen are limited to 150 words. Although no section titles are used, the text should follow a logical sequence of introduction, methodology, results, discussion and conclusive remarks.

No supplementary material is allowed for short communications.

Review - Manuscripts submitted as “review” have to be based on original propositions of literature and data compilation, including an analytical interpretation and discussion, not only a simple description of the reviewed material. They are limited to a total length of 7500 words (including title, abstract, references, figure legends and tables). Up to five tables and seven figures can be included (see below for figure submission).

Organize the manuscript in the following sequence: title in English, Abstract, Keywords, version in Portuguese OR Spanish of title, abstract and keywords, Introduction, Material and Methods, body of the text, References, Figure Legends, Tables. An introduction and methodological section are mandatory, but the organization of the text after that is at the discretion of the authors.

Abstract and Resumo/Resumen are limited to 250 words.

Supplementary material – The submission of supplementary material is allowed for original articles and reviews, to provide access to support material that is not essential to the study, but aids in the interpretation of the results. It may be in the form of tables, images or figures, or other support material, such as, for example, lists of collection material examined or questionnaires applied in ethnological studies. These materials will be available only in the online version of the article. Refer to supplementary files in the text of the manuscript as (Supplementary Material, Table S1) or (Supplementary Material, Figure S1), or (Supplementary Material, Appendix S1), etc. For the review process, submit all supplementary material, including tables, figures plus figure legends in one DOC/DOCX file.

Audio and video files do not need to be referred to in the text as "Supplementary Material". It is sufficient to include the URL link of the source file. Access to these files has to be available for reviewers.

SECTION FORMAT

Abstract

The abstract should present an essential overview of the study that makes the gist of the study clear for readers that read only the abstract of the article. Make sure to present the justification and objective of the study, its geographical circumscription, general methodology used, main results, main discussion points and conclusion.

Keywords

Use up to six words or expressions as keywords. Do not use words that are already used in the title.

Introduction

This section should concentrate on introducing the specific subject of the study, avoiding information on the species, biome or research area that is unrelated to the specific objective of the study. The introduction should reflect the state of the art of the specific research topic, inform the knowledge gap addressed by the study, and make clear the interest of the study for the Amazon region. End the introduction with a paragraph stating the objectives of the study. State the working hypothesis of the study whenever pertinent.

Material and Methods

Description of study sites and general geographical and environmental contexts should be written for a non regional readership that is not familiarized with the region. Sampling design, experimental design, laboratory procedures and statistical analyses have to be described clearly and with sufficient detail as to be replicated by other researchers. Include informative location maps when required. Use past tense in this section.

Results

Provide here an objective report of observations, experiments, data analysis, etc. Always use past tense for reporting results. For the sake of transparency, report full test results, not only whether P is higher or lower than 0.05. Comments and interpretations belong to the Discussion. All tables and figures should be referred exclusively here. All samplings, experiments and analyses mentioned in Material and Methods have to be reported in the Results section and vice-versa.

Discussion

This section should not be a repetition of results followed by comments. The Discussion is not expected to contain any reporting of results, neither original nor repeated from the Results section. The Discussion is expected to have a content beyond the simple comparison with measures or test results obtained by other authors on the same subject. Tables and figures should not be referred here, unless it is very relevant for a point being highlighted. References should reflect the current state of the knowledge in the specific

research area of the study. Include references preferentially at the end of the sentence, in parentheses.

Conclusions

Conclusions have to be written in one paragraph, and should present the answer to the question posed in the objectives, how the it fits into the body of knowledge on the subject, and how it informs future research.

Acknowledgments

This section is mandatory (to be placed in the title page) and should include all funding agencies of research grants and scholarships involved in the study, as well as institutional and individual support received by the authors. Names of institutions and agencies have to be spelled out and written in the original language of their home country (in English if the country of origin does not use the latin alphabet). If no external funding, nor specific funding from the home institution, was received whatsoever, authors are requested to state that the study was carried out without third-party funding and without specific institutional support.

References

References should be mainly of up-to-date published peer-reviewed articles and books. The reference to preprints is not allowed in the published article.

Citation style templates for Acta Amazonica article, book, book chapter, webpage and thesis/dissertation format are available from Zotero Style Repository and Mendeley Reference Management.

In Zotero the style template can be downloaded from (<https://www.zotero.org/styles/acta-amazonica>).

In Mendeley, for the style template (acta-amazonica.csl) to be uploaded correctly, it needs to be saved in the <citationStyles-1.0> directory, usually located in:

C: > Program Files (x86) > Mendeley Desktop > citationStyles-1.0

Use the following formats for the reference list:

Articles in journals

Prestinaci, F.; Pezzotti, P.; Pantosti, A. 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health* 109: 309-318.

Publications with more than six authors

Massi, K.G.; Bird, M.; Marimon, B.S.; Marimon Jr., B.H.; Nogueira, D.S.; Oliveira, E.A.; et al. 2017. Does soil pyrogenic carbon determine plant functional traits in Amazon basin forests? *Plant Ecology* 218: 1047-1062.

Magnusson, W.E.; Lima, A.P.; Luizão, R.; Luizão, F.; Costa, F.R.C.; de Castilho, C.V.; et al. 2005. RAPELD: a modification of the Gentry method for biodiversity surveys in long-term ecological research sites. *Biota Neotropica* 5: 01005022005.

Books

Soares, C.P.B.; Paula-Neto, F.P.; Souza, A.L. 2011. *Dendrometria e inventário florestal*. 2nd ed. Editora UFV, Viçosa. 272p.

Book chapters

Morais, E.G.F.; Peronti, A.L.B.G.; Marsaro-Júnior, A.L.; Amaro, G.C. 2015. Cochonilla-rosada, *Maconellicoccus hirsutus* (Green). In: Vilela, E.F.; Zucchi, R.A. (Eds.). *Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros*. FEALQ, Piracicaba. p.328-344.

Grey literature (theses, unpublished technical reports, technical brochures, online resources, etc.) can be accepted, but should be cited only when absolutely necessary, and weblinks to permanent official repositories where the material may be accessed should be included whenever possible. In case of an excess use of grey literature (>25% of references), its use should be justified in the cover letter to the editor.

Master's dissertation

Tizuka, M.M. 2013. Geoarqueologia e paleohidrologia da planície aluvial holocênica do alto Rio Madeira entre Porto Velho e Abunã-RO. Master's dissertation. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brazil, 170p. (http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92805/tizuka_mm_me_rcla.pdf?sequence=1)

Doctoral thesis

Barbosa, C.E.A. 2012. Controles ambientais e bióticos da dinâmica de plântulas em uma floresta de terra-firme da Amazônia central. Doctoral thesis. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia <INPA>, Brazil, 130p. (<http://bdtd.inpa.gov.br/handle/tede/942>).

Examples of other formats

ASF. 2015. *Alaska Satellite Facility's data portal for remotely sensed imagery of the Earth*. (<https://vertex.daac.asf.alaska.edu/>). Accessed on 26 Jun 2016.

Brasil. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011. Protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agronômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. (<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>). Accessed on 15 Jan 2018.

IBGE. 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Informações sobre o município de Barcelos, Amazonas. (<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/barcelos/panorama>). Accessed on 15 Jan 2018.

SVS. 2014. *Vigilância da Esquistossomose Mansonii*. Diretrizes técnicas. 4th ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. 146p. (http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf). Accessed on 05 Jan 2018.

USGS. 2004. Shuttle Radar Topography Mission, 1 Arc Second scene SRTM_u03_n008e004, Unfilled Unfinished 2.0. Global Land Cover Facility, University of Maryland, College Park, Maryland, February 2000. (<http://glcf.umd.edu/data/srtm/>). Accessed on 05 Jan 2018.

WHO. 2015. *World Malaria Report 2015*. World Health Organization. (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>). Accessed on 08 Feb 2016.

Figure legends

Legends of figures should include sufficient metadata to be self-explanatory. Identify the legend with the format: Figure 1.

Tables

Table captions should include sufficient metadata to be self-explanatory. Start the caption with the format: Table 1. Format tables with Office Word. Do not paste tables from other programs. Mark no vertical lines in tables. Use single spacing for table caption and content. When a table exceeds the size of the page, do NOT separate it in two independent tables.

Figures

Figures can be photographs, drawings or graphics. Submit figures exclusively as separate JPG or TIF files in high resolution, minimum 300 x 300 dpi, and maximum 6 MB individual file size. Photographs should be of high quality, sharp focus and adequate contrast. Do not use web posting resolution. Use at least resolution for printed documents. Figures should be formatted to fit within one column or two columns of the journal page format (check a recent issue for reference).

In graphs, mark the X and Y axes with a black solid line, and use inward-facing indentations for the scale-value positions only. Avoid the use of gridlines within the graph area. Place plot legends inside the graph area whenever possible. Both axes should have a title and scale values. Use a font size for axis titles and values that is large enough to assure good visibility in one or two column width of the journal page. The meaning of symbols and acronyms used in figures must be defined in the figure legend. Do NOT use titles placed on top of the graph, nor outer encasing lines for the graph area.

In composite figures, label each panel with an uppercase letter (A, B, C, etc.).

Maps can have gridlines and have to include a scale bar.

Photographs, illustrations, maps and graphs can be submitted in color and will appear in color in the electronic version of the journal, but will appear in black and white in the printed version. If the authors wish that the figure appears in color in the printed version, the extra printing costs will be charged to the authors. When a color figure is submitted and intended only for the electronic version, please add "This figure is in color in the electronic version." to the figure legend.

Authors are kindly requested to give preference, whenever possible, to black and white graphs, which will be equally readable in the electronic and printed versions.

For figures that have been previously published elsewhere, it has to be clearly stated in the figure legend that a permission for reproduction has been granted, along with the source of the figure. Authors may be asked at any time to provide the document that conceded the permission for reproduction. State the author of original drawings and photographs in the figure legend.

DATA POLICY

Nomenclature and units should follow internationally accepted rules and conventions. Use the metric system for measure units, following the International System of Units (SI) (<https://www.nist.gov/publications/international-system-units-si-2019-edition>). Include the equivalent in metric units when citing quantities in other systems. Biological nomenclature should follow the International Code of Nomenclature of Algae, Fungi and Plants (<https://www.iaptglobal.org/icn>), the International Code of Nomenclature of Prokaryotes (<https://www.the-icsp.org/>), and the International Code of Zoological Nomenclature (<https://code.iczn.org/>). All biological species (crops, other plants, bacteria, yeasts, plants, fungi, animals, etc.) should be identified by their scientific name along with their common name in English, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds, including active ingredients of formulations and extracts, should follow the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (<https://iubmb.qmul.ac.uk/>).

Voucher material has to be deposited in at least one official institutional zoological collection, herbarium or tissue collection, which has/have to be named in the manuscript, including voucher numbers. If voucher numbers are not available, the deposit must be attested in written form to the editor-in-chief by the collection curator.

Geographical coordinates of study areas and collected material have to be provided. Use the grades, minutes, seconds. For distributional data the datum of coordinates should be provided.

New animal species descriptions (or description of previously unknown life forms of a species) have to include the Official Register of Zoological Nomenclature from ZooBank (<https://zoobank.org>) as a hyperlink or registration code in the version of the manuscript accepted for publication.

Studies that involve essays with living organisms, such as fungi, bacteria, plants, etc., as well as DNA sequences, have to present in the version of the manuscript accepted for publication the registration code of deposit of voucher material in a scientific collection or data repository of public access.

All pertinent permits, licenses and authorizations that were mandatory to carry out the study (environmental authorities, health safety authorities, ethics committees, etc.) have to be cited in the Material and Methods section. Adherence to international and/or national protocols related to experiments and laboratory procedures have to be stated whenever necessary.

Data availability

All original research articles have to include a “Data availability” section informing whether the dataset is available to the public and where it is deposited. Include this section in the title page.

According to Scielo's guide on data availability statements (<https://wp.scielo.org/wp-content/uploads/dados.pdf>), the use of one of the following alternatives is mandatory:

Data not available – The data that support the findings of this study are not publicly available.

Data available – The data that support the findings of this study (a) were published in this article; (b) were published in this article and in its attached “Supplementary Material” section; (c) are available in [name of repository] and can be accessed at [URL or DOI]; or (d) are available in [name of repository] with the identifying codes [list of identifiers]. In the case of anonymized data, use (e) the anonymized data that support the findings of this study are available in [name of repository] and can be accessed at [URL or DOI].

Data available upon request – The data that support the findings of this study are available, upon reasonable request, (a) from the corresponding author [name of the corresponding author]; or (b) from [name of the organization]. The dataset is not publicly available because [detail the motive, e.g. the data contain information that compromise the privacy of participants in the research].

If the manuscript is accepted for publication, this information will appear in a “Data availability statement” at the end of the article.

SUBMISSION PROCESS

Access (<https://mc04.manuscriptcentral.com/aa-scielo>) and follow the instructions therein.

All authors of the study have to be registered with a valid e-mail in the online submission form. When registering authors in the system, please use the official institution name in the language of the country of origin. Institutions from countries that do not use the latin alphabet should be registered in English.

Always upload the main document file before the figure files, and upload figure files in increasing order. This is necessary for the system to configure correctly the PDF file for reviewers.

When uploading figure files, include the complete figure legend (including the figure number) in the "Caption/Legend" box.

Submit supplementary material files as “Supplemental file for review”.

Create a cover letter by typing or pasting text directly into the appropriate space in the submission panel, or by uploading a file as a "Supplemental file NOT for review". Address the cover letter to the editor-in-chief and include the following statements:

- (a) The research data are original and accurate;
- (b) All authors participated actively in the discussion of results and have read and approved the final version of the manuscript, and assume public responsibility for its content;
- (c) The submitted manuscript has not previously been published, nor has it been submitted for publication elsewhere, in print or online format, entirely or in part, and will not while being considered for publication in *Acta Amazonica*;
- (d) The manuscript does not infringe third-party copyright or intellectual property rights; otherwise I will be solely responsible and liable for any such infringement in all applicable administrative and legal instances;
- (e) All ethical principles and guidelines that apply to the research presented in the submitted manuscript have been duly observed, and all pertinent declarations, authorizations and/or licenses are presented in the manuscript.

Further inquiries on the submission process should be directed to acta@inpa.gov.br. If you already have submitted a manuscript, please make sure to inform the submission number.

LICENSING AND COPYRIGHT

All content of the journal is licensed under the Creative Commons Attribution License (CC-BY). Under CC-BY, authors retain copyright of their work. The license allows re-distribution and re-use of the published work on the condition that the creator is appropriately credited.

SUBSCRIPTIONS

Acta Amazonica does not charge submission or publication fees. Access to the online version is free of charge.

Subscriptions to Acta Amazonica (printed version) are available for an annual fee of USD 100.00 for institutional subscriptions and USD 75.00 for individual subscriptions, payable by check or bank transfer. Inquiries regarding subscriptions should be directed to e-mail acta@inpa.gov.br, or phone +55 92 3643-3236.

APÊNDICE 2 – Carta de aceite

----- Forwarded message -----

De: **Claudia Keller** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Date: dom., 27 de ago. de 2023 às 15:11

Subject: Acta Amazonica [AA-2023-0089.R1] - Decision on manuscript

To: <aramys.reis@ufma.br>

27-Aug-2023

Dear Dr. Reis,

I am pleased to inform that your manuscript entitled "Babassu mesocarp flour acts as a photoprotective and antioxidant agent", has been accepted for publication in Acta Amazonica.

The manuscript has been reevaluated by the main reviewer of the previous version. Her comments and those of the associate editor are available below. Both were satisfied with the improvements to this latest version, and recommended publication.

Attached I send you the title page and manuscript, which were proofread by me for conformity with the formatting guidelines. I have also marked a few adjustments for a clearer and more usual writing.

Please revise the files carefully, accept the editions you agree with and provide the necessary adjustments where required. Also make sure that the language edition did not alter the meaning of the authors in any way, and that author names and institutional affiliations are written correctly.

Mark with yellow highlight any edition points you do not agree with, to make my review easier. At this stage you can make your comments directly on the text where you feel it is needed.

You can send the revised files in response to this e-mail, as it is not possible to submit via the online system anymore.

We expect your response within the next 10 days.

Thank you very much for your fine contribution and for considering Acta Amazonica as an outlet for your research.

We look forward to your further contributions.

Sincerely,

Dr. Claudia Keller

Editor-in-Chief, Acta Amazonica

actaamazonica.eic@gmail.com