



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO CIÊNCIA EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS



DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS
DE PLANTAS AMAZÔNICAS UTILIZANDO IMAGENS
DIGITAIS

OZIEL RIBEIRO MARINHO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO CIÊNCIA EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PARA RECURSOS AMAZÔNICOS

OZIEL RIBEIRO MARINHO

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS
DE PLANTAS AMAZÔNICAS UTILIZANDO IMAGENS
DIGITAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia, área de concentração Desenvolvimento Científico de Recursos Amazônicos.

Orientador: Prof^o. Dr. Valdomiro Lacerda Martins

Co-orientador: Prof^o. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M338d MARINHO, Oziel Ribeiro
Determinação da atividade antioxidante de óleos de plantas amazônicas utilizando imagens digitais / Oziel Ribeiro MARINHO. 2014
63 f.: il.; 7 x 13 cm.

Orientador: Valdomiro Lacerda Martins
Coorientador: Anderson Cavalcante Guimarães
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Imagens digitais. 2. Atividade antioxidante. 3. Plantas amazônicas. 4. scanner. I. Martins, Valdomiro Lacerda II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

OZIEL RIBEIRO MARINHO

Determinação da atividade antioxidante de óleos de plantas amazônicas utilizando imagens digitais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado em 30 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Valdomiro b. Martins

Dr. Valdomiro Lacerda Martins, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Wellington da Silva Lyra

Dr. Wellington da Silva Lyra, Membro
Universidade Federal da Paraíba

Margarida Carmo de Souza

Dra. Margarida Carmo de Souza, Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Faço homenagem em dedicar este trabalho a meus pais Jonilson e Fátima, a todos de minha família, aos colegas do instituto por sempre acreditarem na minha capacidade de conhecimentos.

A você Maria do Rosário, minha companheira no amor, na vida e nas diversas realizações, que sempre me apoiou nos momentos difíceis e compartilhou comigo as alegrias.

AGRADECIMENTOS

Ficam registrados meus agradecimentos a todos os que compartilharam o caminho percorrido nesta pesquisa, contribuindo, direta e indiretamente, para que eu realizasse este trabalho, auxiliando-me e dando-me forças nos momentos em que mais precisei;

Minha gratidão, em primeiro lugar, a Deus, por estar comigo em todos os momentos e iluminando-me, sendo meu refúgio e fortaleza nos momentos mais difíceis. A ele, minha eterna gratidão;

Agradeço, especialmente, à minha família, pelo apoio para que eu concretizasse essa pesquisa: minha mãe e meu pai e, em especial, minha esposa, Maria do Rosário, que esteve sempre ao meu lado, entendendo-me nos momentos de ausência, dando-me apoio e carinho;

Ao professor doutor Valdomiro Lacerda Martins, meu orientador que acreditou na minha capacidade científica, por meio do grande incentivo e orientação que me foram concedidos durante essa jornada;

Aos demais professores do mestrado, em especial, ao professor Anderson Cavalcante Guimarães (Co-orientador), por tudo o que com eles aprendi e por partilharem a construção do meu estudo;

Aos colegas de curso por nossas conversas, aos amigos do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET;

A Universidade Federal do Amazonas e a todos os que fazem parte desta comunidade;

A FAPEAM pela bolsa concedida.

AGRADEÇO

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.

Paulo Freire

RESUMO

O presente trabalho visa determinar a atividade antioxidante de óleos de plantas amazônicas utilizando imagens digitais. Neste trabalho, a metodologia baseada em imagem digital para determinação de atividades antioxidantes dos óleos busca demonstrar sua viabilidade para o fim a que se propõe comparando seus resultados com metodologias já bem estabelecidas, como a espectrofotometria UV-Vis. O método usado para determinar as atividades foi o de sequestro de radicais livres, DPPH (di(fenil)-(2,4,6-trinitro-fenil)-imino-azônio). Os ensaios com padrão quercetina e amostras foram conduzidos em solução metanólica de DPPH com as medidas espectrofotométricas realizadas em 517 nm, em seguida foi feito a captura das imagens através do *scanner*, com tratamento das mesmas pelo sistema de cor HSV. As atividades antioxidantes dos padrões e amostras foram determinadas para uma capacidade de sequestro (CS) de DPPH de 50%. Os óleos que apresentaram melhores atividades antioxidantes foram de andiroba que requereu uma concentração de 24,84 µg/mL, seguido da castanha-do-Brasil 25,84 µg/mL, copaíba 27,59 µg/mL e tucumã (polpa) 35,65 µg/mL para o método espectrofotométrico. Para o método DIB os óleos que apresentaram melhor atividade antioxidante foram tucumã (amêndoa) 34,94 µg/mL, andiroba 35,30 µg/mL, cupuaçu 36,84 µg/mL e castanha-do-Brasil 49,34 µg/mL. Embora os resultados obtidos pelas duas metodologias, via de regra, sejam discrepantes, quando submetidos à análise estatística pelo uso do teste *t* pareado as duas metodologias não apresentaram diferenças significativas para um nível de confiança de 95 %.

Palavras-Chave: Imagens digitais, atividade antioxidante, plantas amazônicas, *scanner*.

ABSTRACT

This study aims to determine the antioxidant activity of oils from Amazonian plants using digital images. In this work, a methodology based on digital imaging for determination of antioxidant activities of the oils seeks to demonstrate its viability for the purpose it is proposed to compare their results with well established methods such as UV-Vis spectrophotometry. The method used to determine the activities was to scavenging free radicals, DPPH (di (phenyl) - (2,4,6-trinitro-phenyl) imino-azônio). Tests with standard quercetin and samples were conducted in a methanol solution of DPPH with the spectrophotometric measurements at 517 nm then was made to capture images through the scanner with their treatment by the HSV color system. The antioxidant activities of samples and standards were determined for a sequestering capacity (SC) of 50% DPPH. The oils showed better antioxidant activities were Andiroba which required a concentration of 24.84 mg / mL, followed by Brazil-nut 25.84 mg / mL, copal 27.59 mg / mL and tucumã (pulp) 35, 65 mg / mL for the spectrophotometric method. DIB method for the oils showed better antioxidant activity were tucumã (almond) 34.94 mg / mL, Andiroba 35.30 mg / mL, cupuaçu 36.84 mg / mL and Brazil-nut 49.34 mg / mL . Although the results obtained by the two methods, as a rule, are discrepant, when subjected to statistical analysis by use of the paired t test two methods showed no significant differences for a confidence level of 95%.

Key words: Digital image, antioxidant activity, Amazonian plants, scanner.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore do tucumã-do-amazonas.	18
Figura 2	- Árvore de andiroba.....	20
Figura 3	- Cupuacuzeiro árvore nativa da Amazônia.	22
Figura 4	- Copaibeira (a) forma de extração do óleo-resina (b).....	24
Figura 5	- Castanheira-do-Brasil ou do Pará.	25
Figura 6	- Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} ..	28
Figura 7	- Estabilização do radical ABTS $^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	30
Figura 8	- Espectro eletromagnético, com destaque para as subdivisões da região de luz visível.	32
Figura 9	- Representação da mistura das cores primárias para formação de cores secundárias e coordenadas cartesianas em forma de cubo para o modelo RGB.	33
Figura 10	- Modelo RGB aditivo.	34
Figura 11	- Redução do radical livre DPPH pelo flavonóide antioxidante quercetina.	42
Figura 12	- Esquema para a preparação das soluções para avaliar o método DPPH por espectrofotometria.	43
Figura 13	- Esquema para a realização das medidas por imagem digital pelo método DPPH.....	45
Figura 14	- Interface do programa <i>ImageJ</i> utilizado para tratamento e seleção da área das imagens.	46
Figura 15	- Janela do programa <i>ImageJ</i> apresentando os resultados das análises das componentes RGB da área selecionada.....	47
Figura 16	- Representação gráfica do modelo HSV.	47
Figura 17	- Espectro obtido a partir da mistura do DPPH (0,3 mM) e padrão quercetina (13,33 μ g/mL).....	49
Figura 18	- Capacidade de sequestro versus concentrações do padrão quercetina. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).....	50
Figura 19	- Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo do tucumã (amêndoa). Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).	51
Figura 20	- Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo do tucumã (polpa). Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).....	51
Figura 21	- Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo da andiroba. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).....	51
Figura 22	- Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo do cupuaçu. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).....	52
Figura 23	- Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo da copaíba. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).....	52
Figura 24	- Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo da castanha do brasil. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).	52

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das oleaginosas em estudo.....	17
Tabela 2 - Composição dos principais ácidos graxos do óleo bruto de tucumã.	19
Tabela 3 - Características físico-químicas do óleo bruto extraído epicarpo-mesocarpo do tucumã.	19
Tabela 4 - Composição química do óleo da andiroba em ácidos graxos*	21
Tabela 5 - Dados físico-químicos do óleo da andiroba*	21
Tabela 6 - Composição de ácidos graxos do óleo resina da copaíba.	24
Tabela 7 - Composição em ácidos graxos da amêndoa da castanha-do-brasil (g. 100g-1)*	26
Tabela 8 - Dados físico-químicos do óleo da castanha-do-brasil.*	26
Tabela 9 – Atividade antioxidante do padrão quercetina e dos óleos das amostras.	53

LISTAS ABREVIATURAS

A	Absorbância
ABTS	Azinobis-etilbenzenotiazolina
Cat	Catalase
CCD	Dispositivo de Carga Acoplado.
CMOS	Semicondutor Metal-Oxido Complementar.
CMYK	Ciano, Magenta, Amarelo e Preto.
DIB	Baseado em imagens digitais
DMPD	Radical N,N-dimetil-p-fenilenodiamina
DPPH	Di(fenil)-(2,4,6-trinitro-fenil)-imino-azônio
FRAP	Potencial Antioxidante/ Redutor do Ferro
GPx	Gluliona Peroxidase.
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos.
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto desempenho
HSV	matiz, saturação e brilho.
pH	Produto Hidrogeniônico.
RGB	Vermelho, Verde e Azul.
SOD	Superóxido Dismutase.
UV-Vis	Ultravioleta Visível.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTAS DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTAS DE TABELAS.....	x
LISTAS ABREVIATURAS	xi
SUMÁRIO.....	xii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	14
1.1 Caracterização da problemática	15
1.2 Objetivos	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos	16
1.3 Plantas oleaginosas da Amazônia	16
1.3.1. Tucumã - <i>Astrocaryum vulgare</i> , Arecaceae.....	17
1.3.2. Andiroba - <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	19
1.3.3 Cupuaçu - <i>Theobroma Grandiflorum</i> Malvaceae	22
1.3.4. Copaíba - <i>Copaifera spp.</i>	23
1.3.5 Castanha do Brasil - <i>Bertholletia excelsa Bonpl</i>	25
1.4 Antioxidantes e determinação de sua atividade	26
1.4.1 Métodos utilizados para determinar atividade antioxidante	27
1.5 Sistema de cor RGB	31
1.6 Uso de imagens digitais em espectrometria de absorção molecular UV-Vis	35
CAPÍTULO 2 – EXPERIMENTAL.....	40
2.1 Reagentes, soluções e amostras	40
2.2 Equipamentos e softwares	41
2.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH	42
2.4 Escolha do comprimento de onda	44
2.5 Determinação de Atividade Antioxidante por Imagem Digital – DIB	45
2.6 Equações matemáticas para conversão das imagens em RGB para HSV	47
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.1 Escolha do comprimento de onda para as medidas por espectrofotometria	49
3.2 Definição dos parâmetros de medidas por espectrofotometria e DIB	50

3.3 Determinação da atividade antioxidante por espectrofotometria e DIB ...	50
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO.....	54
4.1 Propostas futuras	55
REFERÊNCIAS.....	56

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Em química com a finalidade de determinar, ou, isolar componentes e substâncias químicas têm sido desenvolvido variedades de pesquisas ao longo dos anos. Partes dessas pesquisas têm sido desenvolvidas na Amazônia, voltado para plantas de diversas espécies em diferentes áreas do conhecimento.

A química analítica desenvolve métodos de referência para vários tipos de análises. Nesse sentido o desenvolvimento e a validação de novos métodos são importantes, tanto no sentido científico, quanto econômico. A viabilidade de implementação de uma metodologia de baixo custo, contribui para que pesquisadores desenvolvam análises em laboratórios mesmo dispendo de poucos recursos financeiros.

Uma vez que os óleos de vegetais são usados como produto industrializado necessita-se de um controle de qualidade, e neste caso a química analítica surge como uma ferramenta. Ela é responsável, diariamente, por um grande número de análises e para controle de qualidade de alimentos e de bebidas, podendo ser utilizada, por exemplo, para a determinação da atividade antioxidante de substâncias.

Algumas dessas análises baseiam-se na capacidade de determinadas substâncias formarem compostos coloridos. Assim, a medida da intensidade da cor formada permite determinar a quantidade do analito na amostra. Essas medidas são realizadas espectrofotometria UV-Vis. Análises por esse método depende de tempo e elevado uso de reagentes.

O método baseado em imagem digital – DIB é usado neste trabalho com objetivo de determinar atividade antioxidante de óleos de plantas amazônicas.

1.1 Caracterização da problemática

O método DPPH tem sido intensamente usado por pesquisadores para determinação atividade antioxidante (BLOIS, 1958; MOLYNEUX, 2004). É um método que baseia-se na capacidade de sequestrar radical livre. Porém, o método tem como instrumento de detecção espectroscopia UV-Vis.

Equipamentos que varrem na faixa do UV-Vis disponíveis no mercado geralmente carece de auto custos. Esses instrumentos de detecção varrem de uma a três amostras de cada vez. Isso depende de um tempo significativamente demorado no ato da determinação, como também elevado uso de reagente na amostra.

Com intuito de superar essas dificuldades, propõe-se a utilização de um scanner como um novo instrumento de detecção e captura de imagens. Essa técnica oferece, entre outras vantagens, como por exemplo, economia de reagente, tempo de varredura e custo de equipamentos.

Até o presente momento, não foi encontrado na literatura trabalho envolvendo o uso de um scanner para a aquisição de imagens digitais para implementação de determinação de atividade antioxidante de óleos de plantas amazônicas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver metodologia baseada em imagem digital (DIB) obtida com scanner, para determinação da atividade antioxidante de óleos de plantas Amazônicas.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Usar como sistema de detecção um scanner para obtenção das imagens digitais produzidas durante as análises;
- ✓ Relacionar as imagens digitais com as concentrações das amostras de óleos;
- ✓ Aplicar a metodologia (DIB) à determinação de atividades antioxidantes em amostras de óleos;
- ✓ Comparar os resultados obtidos com o DIB com aqueles usando a espectrofotometria UV-Vis na determinação da atividade antioxidante de óleos de plantas Amazônicas;
- ✓ Avaliar o desempenho analítico em termos das figuras de mérito.

1.3 Plantas oleaginosas da Amazônia

A Amazônia possui uma imensa área territorial com uma grande variedade de espécies, animais e vegetais. Dentre essas riquezas estão incluídas as plantas oleaginosas. Essas plantas continuam sendo fonte de referência para estudos sobre a flora oleífera da região, como também de sobrevivência de muitos amazônidas. Pesce (2009) em seu livro “Oleaginosas da Amazônia” apresenta uma lista de 100 espécies nativas, incluindo aquelas de porte florestal arbóreo, arbustivo, herbáceo e alguns cipós.

Os principais campos de aplicação dos óleos vegetais estão nas indústrias alimentícias e de cosméticos sendo que, na segunda opção, em substituição a componentes não renováveis presentes em tais produtos. Entre os óleos, que são atualmente utilizados na indústria de cosméticos destacam-se os óleos de plantas como: o de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.), castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), a gordura obtida das sementes fermentadas do cupuaçu [*Theobroma grandifolium* (Willd. ex

Spreng.) K. Schum.] e o extrato obtido das sementes do cumaru (PESCE, 2009, p. 29). As plantas escolhidas para estudo neste trabalho são descritas na **Tabela 1.1**.

Gênero: ASTROCARYUM	
TUCUMÃ-AÇU	<i>Astrocaryum aculeatum</i> G. Mey
TUCUMÃ-ARARA	
Família: MELIACEAE	
ANDIROBA	<i>Carapa guianensis</i> Aubl.
Família: STERCULIACEAE	
CUPUAÇU	<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schu
Família: CAESALPINOIDEAE	
COPAÍBA	<i>Copaifera</i> spp., <i>Leguminosa</i>
Família: LECYTHIDACEAE	
CASTANHA DO BRASIL	<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl

Tabela 1- Classificação das oleaginosas em estudo.

1.3.1. Tucumã - *Astrocaryum vulgare*, *Arecaceae*

Esta espécie é nativa da região Amazônica, possivelmente do Estado do Pará, onde tem o seu centro de dispersão, até a Guiana Francesa e Suriname. É uma palmeira característica de terra firme alta, de cobertura vegetal baixa, ou mesmo de campo limpo (CAVALCANTE, 1996). Na Amazônia se destacam duas variedades de tucumã, o tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare*) e o tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey). A árvore do tucumã-do-pará é menor com 10 a 15 m de altura, regenera facilmente por perfilhar possuindo vários estipes, enquanto o tucumã-do-amazonas pode alcançar 25 m de altura e forma um tronco único. Seus frutos são maiores e a sua polpa é mais carnuda, menos fibrosa e menos adocicada do que o tucumã-do-pará. Dentre essas espécies oleaginosas nativas, destaca-se o tucumã-do-amazonas **Figura 1** que é uma palmeira que pertence à família *Arecacea*, cujo mesocarpo é comestível e muito apreciado pela população do Estado do Amazonas (LORENZI, 2004). O alto consumo desse fruto

vem gerando como resíduo o endocarpo, que contém uma amêndoa, a partir da qual se pode extrair óleo (CAVALCANTE, 1996).



Figura 1 Árvore do tucumã-do-amazonas.
Local: Fazenda Santa Maria – Barreirinha – Am – Brasil.

A resistência do tucumã às doenças e a alta produtividade, fazem desta espécie uma solução para a produção de biodiesel, uma vez que os custos operacionais de um plantio ordenado são menores que o do dendê (BORA *et al.*, 2001). O óleo de tucumã extraído da polpa contém 25,6% de ácidos graxos saturados e 74,4% de insaturados, representados pelos ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico e linoléico. Como ele é rico em ômega 3, 6 e 9 comporta-se como um excelente hidratante sendo empregado em produtos cosméticos para a hidratação da pele, loções corporais e produtos capilares para cabelos danificados. É também um excelente emoliente que apresenta alto poder de espalhabilidade. O valor do “ β -caroteno” no óleo de tucumã é mais concentrado na polpa, atingindo o valor de 180 a 330 mg/100g de óleo (BORA *et al.*, 2001).

A composição química de ácidos graxos e os dados físico-químicos (FERREIRA *et al.*, 2008) são mostrados nas **Tabelas 2 e 3**.

Ácidos graxos	Composição percentual
Cáprico	0,8 ± 0,01
Palmítico	22,90 ± 1,34
Estearico	2,95 ± 0,05
Oléico	67,62 ± 1,22
Linoléico	1,15 ± 0,01
n-Nonadécilico	2,63 ± 0,02
Saturados	29,28
Monoinsaturados	67,62
Polinsaturados	1,15
N.D.	1,95

N.D. Identidade não determinada.

Tabela 2 - Composição dos principais ácidos graxos do óleo bruto de tucumã.

Índices	Unidades	Valores de Referência
Ácidos Graxos Livres	%	2,75 ± 0,01
Índice de Refração (40°C)	Zeiss	1,4562
Índice de Iodo	g I ₂ / 100g	82
Índice de Saponificação	mg KOH/g	202,71 ± 0,36
Matéria Insaponificável	%	1,4
Acidez	mg KOH/g	5,47 ± 0,01
Índice de Peróxido	meq/kg	2,99 ± 0,02
Densidade	g/MI	0,91
Ponto de Fusão	°C	27-35

Tabela 3 - Características físico-químicas do óleo bruto extraído epicarpo-mesocarpo do tucumã.

1.3.2. Andiroba - *Carapa guianensis* Aubl.

Outra espécie que chama a atenção devido o seu grande potencial na produção de óleo é a andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Ela é uma árvore da família *Meliaceae*, que pode atingir mais de 30 m de altura quando adulta. Apresenta sapopemas baixas, tronco reto e cilíndrico e folhas compostas **Figura 2**. No Brasil, pode ser encontrada em toda a bacia Amazônica, preferencialmente nas várzeas e áreas alagáveis (FERRAZ *et al.*, 2003), mas também são encontradas em locais bem drenados de terra firme (RAPOSO *et al.*, 2003).

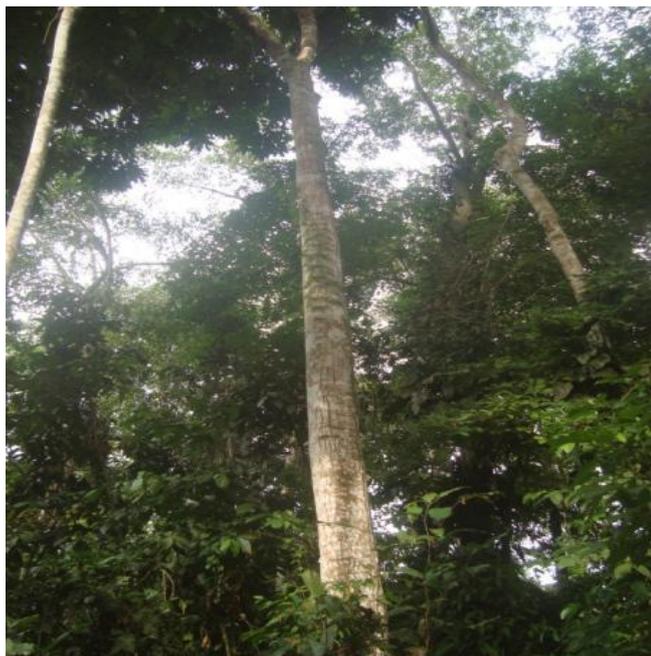


Figura 2 - Árvore de andiroba.

Local: Estrada do Tabocal – Urucurituba – Am – Brasil.

O óleo extraído de suas sementes é usado principalmente como linimento contra contusões musculares e como anti-inflamatório, além de seu uso na produção de repelentes, principalmente na forma de velas aromáticas, e na indústria de cosméticos (NEVES *et al.*, 2004).

A amargura do óleo de andiroba é atribuída a um grupo de terpenos chamados de meliacinas, que são muito semelhantes às químicas amargas de antimalária. Uma destas meliacinas, chamada gedunina, foi documentada com propriedades antiparasíticas e antimalárias com efeito semelhante a quinina (MARCKINNON *et al.*, 1997). Análises químicas de óleo de andiroba identificaram as propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e insetífugas que são atribuídas à presença de limonóides, nomeado de andirobina (ROY *et al.*, 2006).

O óleo de Andiroba é uma fonte rica de ácidos graxos essenciais inclusive oléico, palmítico, mirístico e ácidos de linoléico além de conter componentes não

graxos como triterpenos, taninos e alcalóides isolados, como a andirobina e carapina, **Tabelas 4 e 5.**

Ácidos graxos	Composição percentual
Palmítico	25,76
Palmitoléico	0,81
Esteárico	9,08
<i>Cis</i> -Oléico	51,81
<i>Trans</i> -Oléico	0,92
Linoléico	8,3
Linolênico	0,24
Araquídico	1,61
Gadoléico	0,15
Behênico	0,43

Tabela 4 - Composição química do óleo da andiroba em ácidos graxos*.

*Fonte: Silva, 2005.

Índices	Unidades	Valores de Referência
Ácidos Graxos Livres	%	18,6
Índice de Refração (40°C)	Zeiss	50
Índice de Iodo	gI ₂ / 100g	56,76 ± 2,10
Índice de Saponificação	mg KOH/g	193,84 ± 1,89
Matéria Insaponificável	%	3-5
Acidez	mg KOH/g	1,87 ± 0,01
Índice de Peróxido	meq/kg	8-10
Densidade	g/L	0,98
Ponto de Fusão	°C	22

Tabela 5 - Dados físico-químicos do óleo da andiroba*

*Fonte: Silva, 2005.

A vela de andiroba é usada como repelente eficaz para o mosquito *Aedes aegypti*, vetor da febre amarela e da dengue. Ao ser queimada, exala um agente ativo que inibe a fome do mosquito, conseqüentemente, reduz a sua necessidade de picar as pessoas. Pesquisas revelaram uma eficiência de 100% na repelência do mosquito, resultado jamais encontrado em qualquer outro produto existente no mercado destinado ao combate do mosquito. Além desta característica, a vela é totalmente atóxica, não produz fumaça e não contém perfume (GILBERT *et al.*, 1999).

1.3.3 Cupuaçu - *Theobroma Grandiflorum* Malvaceae

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum) é considerado um fruto importante tipicamente amazônico e apresenta polpa ácida, de aroma característico. É uma fruta originária do sul e sudeste da Amazônia (LANNES, 2003). O cupuaçu é apreciado por sua polpa ácida e de aroma intenso **Figura 3**.



Figura 3 - Cupuacuzeiro árvore nativa da Amazônia.

Fonte: <http://hotsites.stc.embrapa.br>

Devido ao seu sabor forte, a polpa dos frutos não é normalmente consumida sozinha, mas é utilizada para fabricação de bebidas (“vinho do cupuaçu” e suco), sorvetes, licores, geleias, conservas e doces (YANG *et al.*, 2003). O fruto contém uma polpa suculenta e cremosa de sabor característico aderida à 20 a 30 sementes ovuladas grandes (MULLER *et al.*, 1995). A manteiga do cupuaçu, semelhante a “manteiga” do cacau, porém com qualidade superior, é extraída das sementes que contem aproximadamente 45% de óleo (MORAIS, 2009). O óleo extraído das sementes do cupuaçu oferece propriedades fantásticas para a indústria cosmética. A

manteiga de cupuaçu é um triglicerídeo que apresenta uma composição equilibrada de ácidos graxos saturados e insaturados, o que confere ao produto um baixo ponto de fusão (aproximadamente 30°C) e aspecto de um sólido macio que se funde rapidamente ao entrar em contato com a pele. A manteiga de cupuaçu possui alto poder de absorção de água, aproximadamente 120% superior a da lanolina, atuando como um substituto vegetal da mesma. Ela contém fitoesteróis (especialmente β -sitosterol) que atuam a nível celular regulando o equilíbrio hídrico e a atividade dos lipídeos da camada superficial da pele (CHLEBAROV, 1990).

O alto poder de absorção da água da manteiga de cupuaçu pode ser atribuído às pontes de hidrogênio formadas entre as moléculas de água e os fitoesteróis (WINKLER, 1977). Os fitoesteróis têm sido utilizados no tratamento de dermatites e afecções por estimular o processo de cicatrização.

1.3.4. Copaíba - *Copaifera spp.*

A copaíba é uma planta de grande porte de 30 metros em habitat natural **Figura 4**. As utilizações da medicina tradicional para o óleo-resina de copaíba são muitas e indicam uma grande variedade de propriedades farmacológicas. É muito usado como cicatrizante e anti-inflamatório para tratar infecções nas vias respiratórias e urinárias (PAIVA *et al.*, 2002). É conhecido como um antibiótico natural altamente eficaz contra bactérias gram-positivas (TINCUSI *et al.*, 2002). No processo industrial-cosmético é utilizado como um componente de fragrância em perfumes e em preparações de cosméticos como sabões e cremes por suas propriedades antibactericidas, anti-inflamatórias e emolientes (WILKINS *et al.*, 2002).



Figura 4 - Copaibeira (a) forma de extração do óleo-resina (b).
Local: Lago do Arrozal – Urucurituba – Am – Brasil.

A composição química do óleo-resina de copaíba pode ter aproximadamente 72 sesquiterpenos (hidrocarbonetos) e 28 diterpenos (ácidos carboxílicos), sendo o óleo composto por 50% de cada tipo de terpenos **Tabela 6**.

Ácidos graxos	Átomos de carbono	Composição percentual
Octanóico (caprílico)	8:00	1,9
Decanóico (cáprico)	10:00	1,8
Hexadecanóico (palmítico)	16:00	20,2
Octadecanóico (esteárico)	18:00	7,0
9-octadecanóico (oléico)	18:10	33,1
9,12-octadecadienoico (linoléico)	18:20	2,6
Eicosanóico (araquídico)	20:00	2,7
Cis-11-eicosenóico (gôndico)	20:10	1,7
Docosanóico (behênico)	22:00	3,6
Tetracosanóico (lignocérico)	24:00	5,7
Hexacosanóico (cerótico)	26:00	1,5
Total	-	81,8

Tabela 6 - Composição de ácidos graxos do óleo resina da copaíba.

Fonte: Neto, 2008.

Aos diterpenos é atribuída a maioria das propriedades terapêuticas, fato comprovado cientificamente (MACIEL *et al.*, 2002). Aos sesquiterpenos é atribuída a

fração responsável pelo aroma do óleo-resina de copaíba bem como algumas propriedades como antiúlcera, antivirais e antirrinovírus (VEIGA JUNIOR, 2002).

Um dos principais problemas da comercialização do óleo resina de copaíba é a sua adulteração, geralmente com óleo vegetal. Uma das formas convencionais de atestá-la é determinando seu índice de acidez, inferior a 80 mg KOH/g de óleo resina é indício de contaminação. Quanto menor for o índice de acidez do óleo resina de copaíba, maior a quantidade de óleo vegetal nele misturado. Por sua vez o índice de éster do óleo resina de copaíba pode auxiliar na determinação do tipo de contaminante. Se o índice de éster for superior a 23 mg KOH/g de óleo resina, indica que o contaminante é material graxo, ou seja óleo vegetal ou de origem animal, se for menor indicará que o contaminante é não graxo, como por exemplo óleo mineral (DE VASCONCELOS, 2002).

1.3.5 Castanha do Brasil - *Bertholletia excelsa* Bonpl

A castanheira-do-Brasil ou do Pará (*Bertholletia excelsa*) **Figura 5** é uma espécie arbórea de grande porte, podendo medir de 50m a 60m, nativa da Amazônia (CAVALCANTE, 1972; 1991).



Figura 5 - Castanheira-do-Brasil ou do Pará.
Fonte: www.wwf.org.br/natureza

É constituída por 60 a 70% de lipídios, expressivamente de ácidos graxos poliinsaturados, de 15% a 20% de proteína de boa qualidade biológica (CARDARELLI, 2000), além de fonte reconhecida de selênio, cálcio, fósforo, magnésio e vitaminas do complexo B (CARDARELLI, 2000; SOUZA, 2004). O resíduo da castanha obtido a partir da extração do óleo por prensagem da amêndoa, torna-se objeto de interesse para estudos devido ao seu elevado teor proteico (GLORIA, 2000). As propriedades físico-químicas são apresentadas nas **Tabelas 7 e 8**.

Ácidos graxos	Composição percentual
Hexadecanóico (palmítico)	14,31
Octadecanóico (esteárico)	10,64
Eicosanóico (araquídico)	0,40
Docosanóico (behênico)	0,12
Tetracosanóico (lignocérico)	-
Mono (oléico)	28,92
Gadoléico	0,11
Poli-linoléico	44,12
Lino-lênico	0,28

Tabela 7 - Composição em ácidos graxos da amêndoa da castanha-do-brasil (g. 100g-1)*.

***Fonte:** Naves & Freitas, 2010.

Índices	Resultados	Valores de Referência
Ácidos Graxos Livres (%)	0,104 ± 0,00	n. d.
Índice de Refração (20°C)	1,466 ± 0,00	n. d.
Índice de Saponificação (mgKOH/g)	198,58 ± 0,05	n. d.
Índice de Acidez (mgKOH/g)	0,207 ± 0,05	4,0
Índice de Peróxido (mEq/kg)	0,970 ± 0,01	15,0
Densidade (g/mL)	0,910 ± 0,00	n. d.

n. d. = não especificado

Tabela 8 - Dados físico-químicos do óleo da castanha-do-brasil.*

***Fonte:** Ferreira *et al.*, 2006.

1.4 Antioxidantes e determinação de sua atividade

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam a ação dos radicais livres (DOSSIÊ ANTIOXIDADES, 2009, p.17). Quimicamente, são definidos como substâncias capazes de prevenir e atrasar

os processos oxidativos dos substratos oxidáveis. Podem ser classificados em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos são compostos por enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Catalase (Cat), enquanto o não enzimático é representado pelos oligoelementos, vitaminas, carotenóides, flavonóides, dentre outros compostos (MARTINS, 2010).

Os antioxidantes apresentam-se como uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos (BAUER *et al.*, 2001). Estruturalmente, os antioxidantes são compostos aromáticos que possuem pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, largamente utilizados pela indústria de alimentos, ou naturais, como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (RAMALHO & JORGE, 2006).

Os antioxidantes podem ser classificados, segundo o mecanismo de ação, em primários ou secundários. Os antioxidantes primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres (ADEGOKE *et al.*, 1998), enquanto os antioxidantes secundários atuam na complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singleto (DECKER, 2002).

1.4.1 Métodos utilizados para determinar atividade antioxidante

Numerosos são os métodos utilizados para medir a capacidade antioxidante de amostras de alimentos, bebidas e óleos. Contudo, a complexidade da composição de cada tipo de amostras é muito variada, sabido que os antioxidantes são uma mistura heterogênea e não atuam sozinhas, ou separadamente, então, variadas são as metodologias para medir a capacidades antioxidantes das

substâncias. Nesse sentido, são elencadas algumas das principais metodologias utilizadas nesses tipos análises.

O FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é um método para determinação da atividade antioxidante que se baseia na redução do íon férrico para o íon ferroso. O complexo formado, tripiridiltriazina-ferroso, apresenta coloração azul intensa e pode ser medido em 593 nm (BENZIE:STRAIN, 1996).

Pulido *et al.*, (2000) descrevem o método FRAP – Poder Antioxidante de Redução do Ferro **Figura 6** como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas.

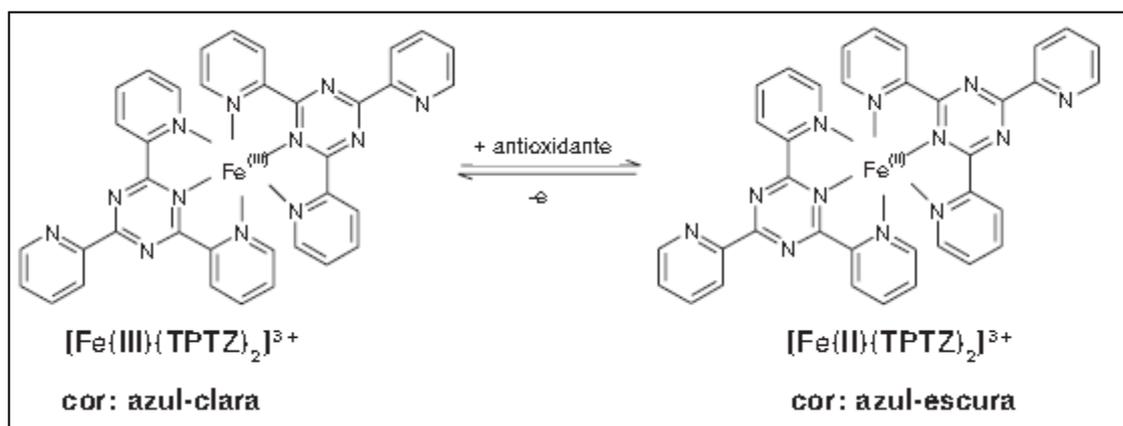


Figura 6 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} .
Fonte: Rufino, 2006.

Para calcular a AAT, deve-se substituir na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 μM do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo x

Equação 1 corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de sulfato ferroso (PULIDO, 2000 apud RUFINO, 2006).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde, y = Absorbância correspondente a 1000 µM de sulfato ferroso, x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de sulfato ferroso.

O resultado final **Equação 2** é calculado pela divisão de 1000 (µM) pelo valor de X(g) e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em µM sulfato ferroso/g de fruta (porção comestível).

$$X \text{ g} = \frac{X}{1000} \leftrightarrow Z = \frac{1000}{X(g) \times 1} \quad (2)$$

O ABTS (radical 2,2-anzobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) é um método para determinação da atividade antioxidante que se baseia na geração de um cátion radical, ABTS•⁺. O radical é produzido durante a ativação de metilmioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de ABTS, com ou sem antioxidantes (RE *et al.*, 1999). O radical ABTS **Figura 7** é gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

A vantagem do teste ABTS consiste na sua relativa simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com ABTS•⁺, bem como em inibir processos oxidativos. Como muitos compostos fenólicos e em outras amostras com substâncias com atividade antioxidante isso ocorre lentamente (CAMPOS,1997).

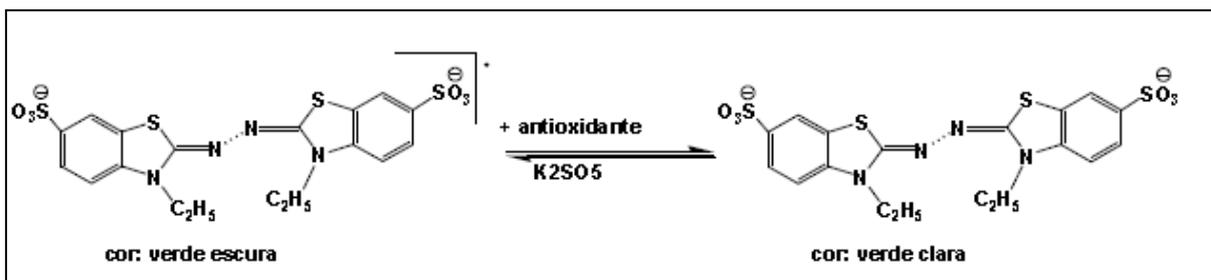


Figura 7 - Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: Souza *et al.*, 2007.

O método ABTS tem sido extensivamente usado para avaliar a capacidade antioxidante de vinhos (LOPEZ-VELEZ *et al.*, 2003; VILLANO *et al.*, 2004), bebidas e alimentos (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2000; VAN DEN BERG *et al.*, 2000) e fluidos biológicos (KIRSCHBAUM, 2001; MAZZA *et al.*, 2002).

Vários estudos foram realizados com o objetivo de verificar a relação existente entre a atividade antioxidante e a concentração de polifenóis (SALAH *et al.*, 1995; CASTILLO *et al.*, 2000). Villano *et al.* (2004), por exemplo, verificaram que existe uma boa correlação entre o conteúdo de fenol total e o potencial antioxidante, sendo que o potencial antioxidante de vinhos tintos se apresenta 10 vezes maior que o de vinhos brancos, em função da maior concentração de fenóis.

Lee & Rennaker (2007) determinaram a capacidade antioxidante e o conteúdo de estilbenos livres em amostras de quatro variedades de vinhos (Cabernet Sauvignon, Merlot, Riesling e Chardonnay). O estudo demonstra que a capacidade antioxidante e o nível de estilbenos variam consideravelmente com a variedade do vinho.

Mensor *et al.*, (2001) utilizou o método DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila) em triagem de extratos vegetais brasileiros para determinação de atividade antioxidante. Esse método foi proposto por Brand-Williams *et al.*, (1995), se baseia na redução da absorvância medida a 515 nm do radical DPPH^{\bullet} , por

antioxidantes. Segundo Wojdylo, Osmianski e Czemerys (2007), os métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante são o do radical ABTS e do DPPH. Ambos são caracterizados por sua excelente reprodutibilidade sob condições estabelecidas, porém, podem mostrar diferenças significantes em suas respostas antioxidantes. O método de inibição de radicais DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante.

Fogliano *et al.*, (1999) fez uso do método DMPD (radical N,N-dimetil-p-fenilendiamina) para determinação de atividade antioxidante de diferentes áreas de Campanha, Itália. A eficácia do método foi semelhante ao do ABTS. Esses métodos são mais comuns para quantificação da capacidade antioxidante de substâncias e fundamentam-se na captura de radicais livres.

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (MARCO, 1968; MILLER, 1971, apud DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. Por fim, o RANCIMAT é padrão para determinação da estabilidade oxidativa de óleos, gorduras e alimentos lipídicos, e utiliza equipamentos automatizados.

1.5 Sistema de cor RGB

A percepção de cor pelo sistema nervoso central humano estudado no processo psicofisiológico, embora não seja totalmente compreendida, porém estudado há muitos anos por inúmeros cientistas e engenheiros, constitui atualmente um sólido conjunto de conhecimentos teóricos.

Em 1666, Newton descobriu que um prisma de vidro atravessado pela luz branca é capaz de decompô-la um amplo espectro de cores que varre do violeta, num extremo, ao vermelho, no outro, **Figura 8** chamado espectro de luz visível (MARQUES FILHO, 1999).

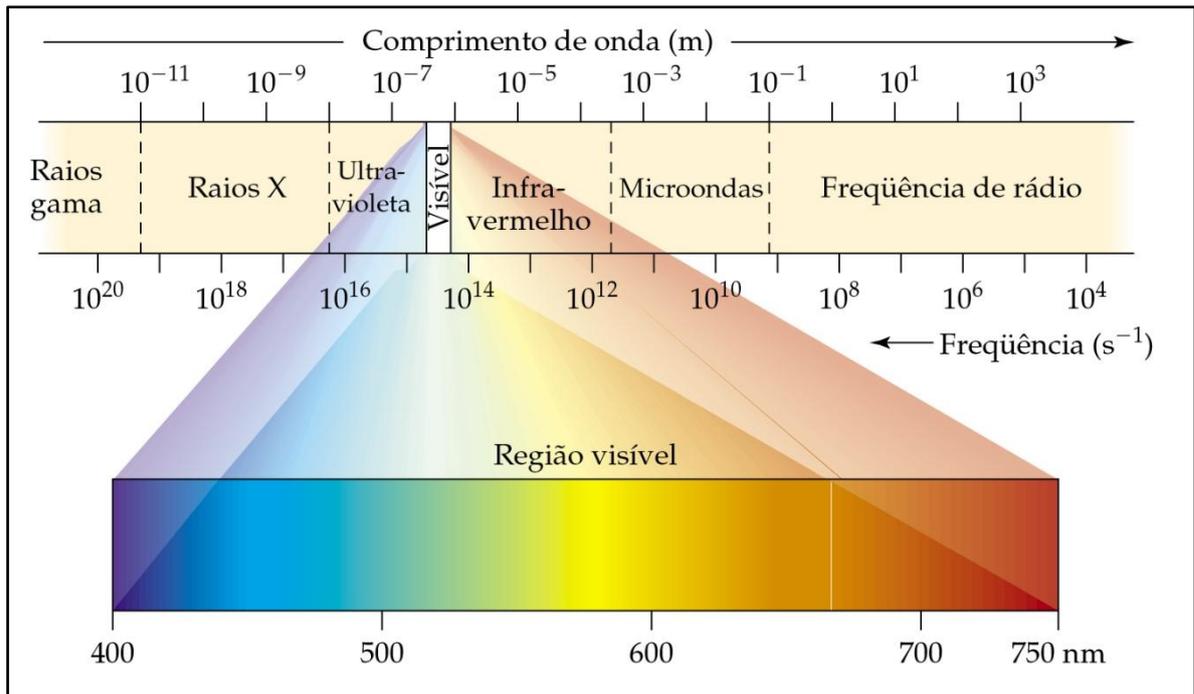


Figura 8 - Espectro eletromagnético, com destaque para as subdivisões da região de luz visível.
Fonte: Brown, 2005.

A teoria de percepção cromática pelo olho humano baseia-se em hipótese formulada por Young em 1801, que estabelece que os cones (células fotossensíveis que compõem a retina juntamente com os bastonetes) se subdividem em três classes, com diferentes máximos de sensibilidades situados em torno do vermelho (*R – Red*), do verde (*G – Green*) e do azul (*B – Blue*) (CASTLEMAN, 196; KOYA, 2001; GONZALEZ & WOODS, 2002). Essas classes são chamadas cores primárias. Os seus respectivos comprimentos de onda: azul = 435,8 nm, verde = 546,1 nm e vermelho = 700 nm.

As combinações de cores consideradas até o momento pressupõem a emissão de radiações coloridas situadas dentro do espectro de luz visível, as quais combinadas aditivamente produzem um efeito final correspondente à soma dos efeitos individuais.

Marques Filho, 1999 afirma que a mistura das cores primárias, duas a duas, produz as chamadas cores secundárias, que são: magenta ($R+B$), amarelo ($R+G$) e ciano ($G+B$). A mistura das três cores primárias ou de uma secundária com sua cor 'oposta' produz a luz branca **Figura 9**.

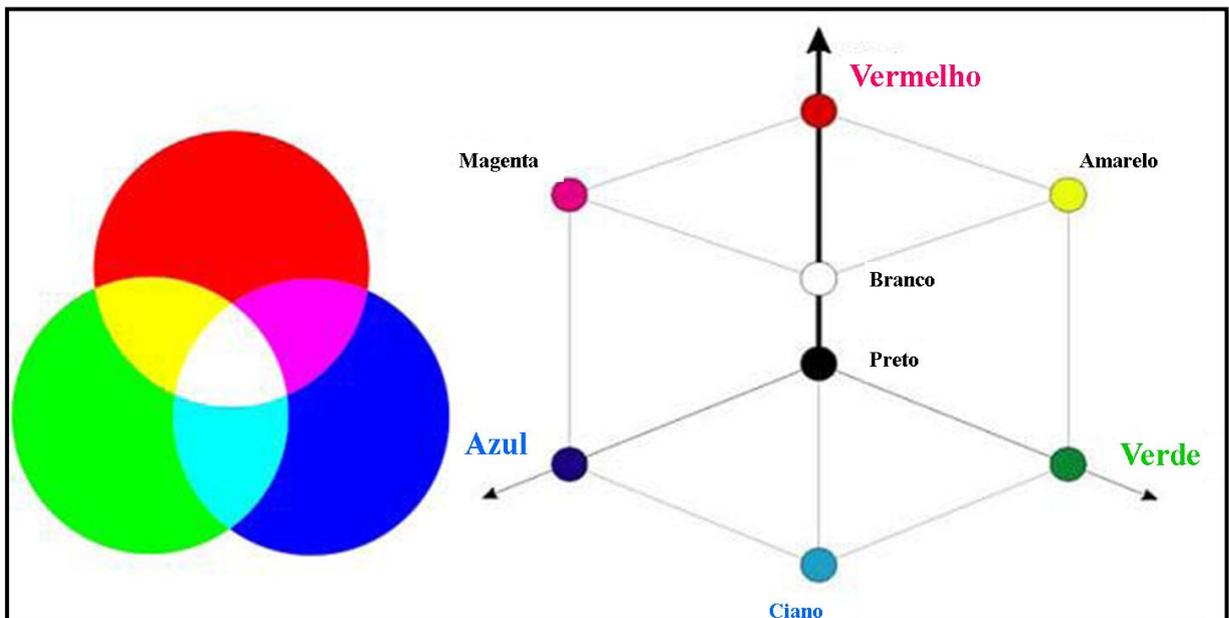


Figura 9 – Representação da mistura das cores primárias para formação de cores secundárias e coordenadas cartesianas em forma de cubo para o modelo RGB.

O modelo RGB é baseado em um sistema de coordenadas cartesianas, que pode ser visto como um cubo onde três de seus vértices são as cores primárias, outras três as cores secundárias, vértice junto à origem é o preto e o mais afastado da origem corresponde à cor branca. Neste modelo, a escala cinza se entende através de uma linha (a diagonal do cubo) que sai da origem (preto) até o vértice

mais distante dela (branco). A normalização dos valores máximos de R, G e B estão na faixa de 0 a 1 **Figura 10**.

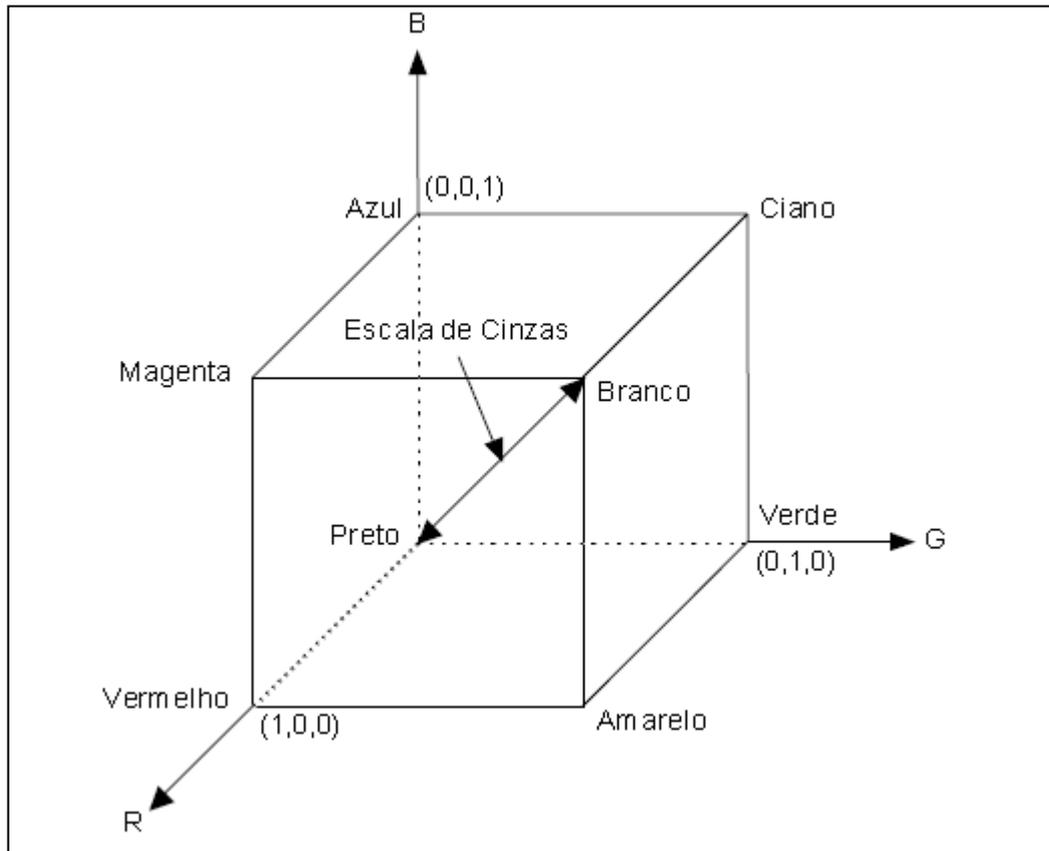


Figura 10 - Modelo RGB aditivo.
Fonte: Marques Filho, 1999.

No modelo RGB a representação utilizada é a de 8 *bits* para cada canal de informação, fazendo um total de 24 *bits* por *pixel*. Com isso é possível gerar mais de 16 milhões de cores diferentes (KOYA, 2001). O sistema de cores RGB, ou seja, um conversor de 8 *bits* que pode assumir valores de 0 (zero) a 255, assim cada *pixel* pode assumir um entre 16.777.216 ($2^8 \times 2^8 \times 2^8$) valores possíveis de cor.

1.6 Uso de imagens digitais em espectrometria de absorção molecular UV-Vis

Geladi & Grahn (1996) definiram imagem como sendo a reprodução de um objeto real ou cena, preservada em um meio. Uma pintura a óleo, uma aquarela, uma fotografia, uma escultura, são exemplos dessa definição. O uso de imagem em química começou com a utilização do microscópio, mas este instrumento nunca foi um assunto importante em química como foi para biologia, fisiologia, medicina e geologia. Isso mudou quando o microscópio eletrônico e depois o microscópio de íon se tornaram disponíveis, com possibilidade de mapeamento das concentrações dos elementos (GELADI E GRAHN, 1996). Sendo assim, diversos trabalhos foram publicados envolvendo esse dispositivo.

Machado, Leite e Souki (2004) definiram imagem digital como sendo nada mais do que uma série de dígitos binários (0 e 1), ou seja, uma longa sequência desses dois números que, então, se “transformam” numa estrutura, geralmente quadriculada, denominada *pixel*, que representam uma intensidade de luz e de cor, onde todos estes *pixels* em conjunto irão formar uma imagem digital.

As imagens digitais podem ser produzidas por diversos aparelhos, incluindo câmeras de vídeo e fotografias digitais, *scanners*, aparelhos de raio-X, microscópios eletrônicos, aparelhos de ultra-som e radares, como também webcams e telefones celulares com câmeras (MACHADO, LEITE E SOUKI, 2004).

Em química analítica diversos artigos têm sido publicados na literatura envolvendo o uso de imagens digitais obtidos a partir de algum desses aparelhos eletrônicos. Os transdutores de imagens monitoram a radiação incidente de forma contínua e reversível para aquisição de imagens. No mercado estão disponíveis os transdutores do tipo dispositivos de carga acoplada (do inglês: Charge-Coupled Device - CCD) e os semicondutores metal-óxido complementar (do inglês:

Complementary Metal-Oxide-Semiconductor - CMOS) (LYRA, 2008). Alguns trabalhos encontrados na literatura discorrem sobre câmeras CCD e as imagens digitais, como sendo ferramentas promissoras em medidas analíticas de cunho geral.

Byrne *et al.* (2000) investigou os meios de tratamento da alta densidade de pontos das matrizes geradas pela imagem digital. Usando uma câmera digital CCD de alta resolução, um ponto da matriz de uma imagem a cores foi tomada e processada utilizando o software de desenvolvimento LabVIEW, para retornar aos valores numéricos dos componentes da cor vermelho, verde e azul de cada ponto. O uso de câmeras digitais como detector para reações colorimétricas tem mostrado grande potencial para medidas que envolvam a produção química da mudança de cor, possibilitando análises qualitativas e quantitativas.

Withagen, Groen e Schutte (2007) analisaram diferentes tipos de câmeras para utilização em medidas experimentais. Baseando-se em experimentos foi verificando um modelo geral de câmera CCD. Este modelo inclui ganho e *offset*, ruído aditivo e multiplicativo, e correção gama. Para a *webcam*, no estudo do ruído, a parte do ruído aditivo é mais importante que a parte do ruído multiplicativo sobre a escala de intensidade. Em geral, os estudos demonstraram que o modelo CCD é suficiente para todas as câmeras, exceto para webcams de baixa qualidade. Resultados para webcam mostram que é perigoso escolher um modelo de câmera geral e assumir a sua validade. É importante validar o modelo para cada câmera específica utilizada. Como apenas uma câmera foi testada para cada marca, os valores do parâmetro do modelo não são necessariamente válidos para outras câmeras do mesmo tipo.

No que diz respeito ao uso de imagens digitais, obtidas particularmente por uma webcam, destacam-se os trabalhos de Gaião *et al.* (2006), Lyra (2008) e recentemente o trabalho de Wongvilai *et al.* (2010). A webcam é uma câmera digital de baixo custo que captura imagens digitais de modo quase instantâneo. Esse tipo de câmera utiliza comumente um CCD ou CMOS como sensor de imagem.

Gaião *et al.*, (2006) explorou o uso de imagens digitais em química analítica, empregando uma webcam como detector do ponto final em titulações de neutralização. Neste trabalho, os valores de RGB para cada pixel da imagem obtida pela webcam foram convertidos para valor de cor pela **equação 3**:

$$\text{Cor} = B + 2^8G + 2^{16}R \quad (3)$$

A viabilidade da técnica requer uma variação das componentes RGB da imagem e uma descontinuidade nas curvas de titulação onde está o ponto final associado à condição de equivalência química.

Wongvilai *et al.* (2010) utilizaram uma webcam como um detector de baixo custo em um reator simples *lab-on-chip*. O sistema proposto utiliza uma webcam para monitorar as mudanças de cor, em tempo real, do indicador fenolftaleína na zona contínua de uma reação de neutralização ácido-base. O desaparecimento da cor rosa do indicador, quando a solução ácida difundia na solução básica, foi registrada como a mudança no valor das componentes RGB. Esta mudança estava relacionada com a concentração do ácido.

O uso de imagens obtidas por *scanner* em química analítica foi descrita inicialmente no trabalho de Shishkin Yu *et al.* (2004). Neste trabalho, os autores estudaram a possibilidade de usar um *scanner* de mesa e um software de processamento de imagem digital para avaliação numérica da intensidade da cor das substâncias adsorvidas em espuma de poliuretano. O método permite realizar a

digitalização das imagens de amostras coloridas de espuma de poliuretano usando um *scanner* de mesa. A quantificação das substâncias adsorvidas baseava-se na construção de curvas analíticas a partir das medidas de luminosidade do canal selecionado (R, G ou B) em função da concentração das soluções de calibração.

Gomes *et al.* (2008) realizou a determinação de ácido ascórbico pela digitalização das amostras no *scanner*, e uma região da imagem foi selecionada para tratamento. Os valores médios das cores primárias vermelho (R), verde (G) e azul (B) foram calculadas através de programa computacional para cada amostra. O princípio da técnica foi baseada na reação entre o ácido ascórbico, hexacianoferrato de potássio e cloreto de ferro (III) para formar o complexo azul da Prússia.

Soldat, Barak e Lepore (2009) também utilizaram um *scanner* para obter as imagens digitais e explorá-las com finalidade analítica. Neste artigo, os autores demonstraram que a análise de imagem digital digitalizada de microplacas em *scanner* pode substituir um espectrofotômetro comum para vários procedimentos quantitativos em microescala. Esta descoberta permite baixo custo e microquantificação de diversos compostos em laboratório. O método foi utilizado na determinação de vários íons de interesse ambiental.

Martinez *et al.*, (2008) desenvolveram um sistema que utiliza dispositivos baseados em papel microfluídico. Os resultados dos ensaios colorimétricos foram obtidos com dois tipos de celulares com câmera, um *scanner* portátil, um *scanner* de mesa e uma câmera digital. Os celulares com câmera são portáteis e cada vez mais acessíveis, leves e equipados com alta resolução (≥ 2 megapixels). Neste trabalho foi utilizado o sistema de cores primárias subtrativas: ciano, magenta, amarelo e preto (CMYK).

Métodos baseados em imagem digital vêm sendo empregados como uma alternativa de baixo custo para determinações em química analítica. A possibilidade de monitoramento em linha e a capacidade de avaliar parâmetros como a textura, intensidade das cores e sua distribuição na superfície, também contribuíram para essa tendência (GAIÃO, 2006; LOPEZ-MOLINERO, 2010; TÔRRES, 2011).

CAPÍTULO 2 – EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes, soluções e amostras

Determinações de atividade antioxidante envolveram o uso de DPPH (2,2-di(fenil)-2,4,6-trinitro-fenil)-imino-azônio, Quercetina 2-(3,4-di(hidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona 98% (HPLC), metanol (CH₃OH). Todos os reagentes empregados possuem grau analítico de pureza.

Para avaliar o método DPPH e determinar as atividades antioxidantes das amostras de óleo foram preparadas:

- a) Solução estoque do padrão quercetina em metanol 1:1 (m/v). Para preparar essa solução pesou-se 10 mg de quercetina e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando o mesmo com metanol.
- b) Solução trabalho do padrão quercetina, pela diluição de 200 µL da solução (a) em um balão volumétrico de 5 mL. O balão foi aferido com metanol. As
- c) Soluções trabalho do padrão quercetina foram preparadas sempre em triplicata e identificado como: P1-1, P1-2 e P1-3.
- d) Solução dos extratos das amostras de óleo em metanol 1:1 (m/v). Para preparar essas soluções pesou-se 10 mg de cada amostra e dissolveu-se em 10 mL de metanol. A solução foi centrifugada por 10 minutos com rotação de 2000 RPM para uma melhor homogeneização.
- e) Solução trabalho dos extratos por diluição em metanol 1:10 (m/v). Essas soluções foram preparadas pipetando-se 500 µL da solução (c) e 5000 µL de metanol. As soluções trabalho dos extratos foram preparadas sempre em triplicata e identificadas como: E1-1, E1-2 e E1-3.
- f) Solução de DPPH 0,3 mM. Para preparar essa solução, pesou-se 2,9 mg de DPPH e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL, completando o

mesmo com metanol. As soluções de DPPH foram preparadas sempre no dia em que as medidas eram realizadas e em quantidades suficientes para essas medidas para evitar o desperdício de reagentes.

Foram coletadas as sementes das plantas oleaginosas oriundas das microrregiões, médio e baixo Amazonas nos municípios Barreirinha, Itacoatiara e Urucurituba, para então, fazer a prensagem das sementes e conseqüentemente obter as amostras de óleos do tucumã (polpa), tucumã (amêndoa), andiroba (amêndoa), manteiga do cupuaçu (amêndoa), óleo resina de copaíba e óleo bruto de castanha do Brasil (amêndoa). Foram analisadas 6 amostras de óleos todas em triplicatas para determinação da atividade antioxidante.

2.2 Equipamentos e softwares

Espectros na região do UV-Vis foram registrados no espectrofotômetro de marca BEL, modelo LGS53, empregando uma cubeta de vidro com caminho óptico de 1,0 cm e volume de 1,0 mL. O espectrofotômetro opera na faixa de 200 a 1000 nm, com varredura a cada 1 nm.

Imagens digitais foram capturadas por um *scanner* de marca HP, modelo Scanjet G2710, rearranjado para capturar imagens de microplacas com capacidade de 500 µL cada poço.

Um computador com um processador AMD Athlon tm LE-1620 (2,4GHz, 1MB L2 cache), HD de 320 GB e memória de 2 GB, foi empregado para controle e gerenciamento das imagens digitais.

Um *software* (*IMAGEJ*, 2014) disponibilizado grátis para *download* na *internet*.

2.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por espectroscopia na região do visível, utilizando-se o método DPPH. O método é baseado na metodologia de Blois (1958) e Brand-Williams *et al.* (1995) apud Negri (2009), utilizando o radical estável DPPH• **Figura 11** que se reduz na presença de antioxidantes com mudança de coloração de violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra.

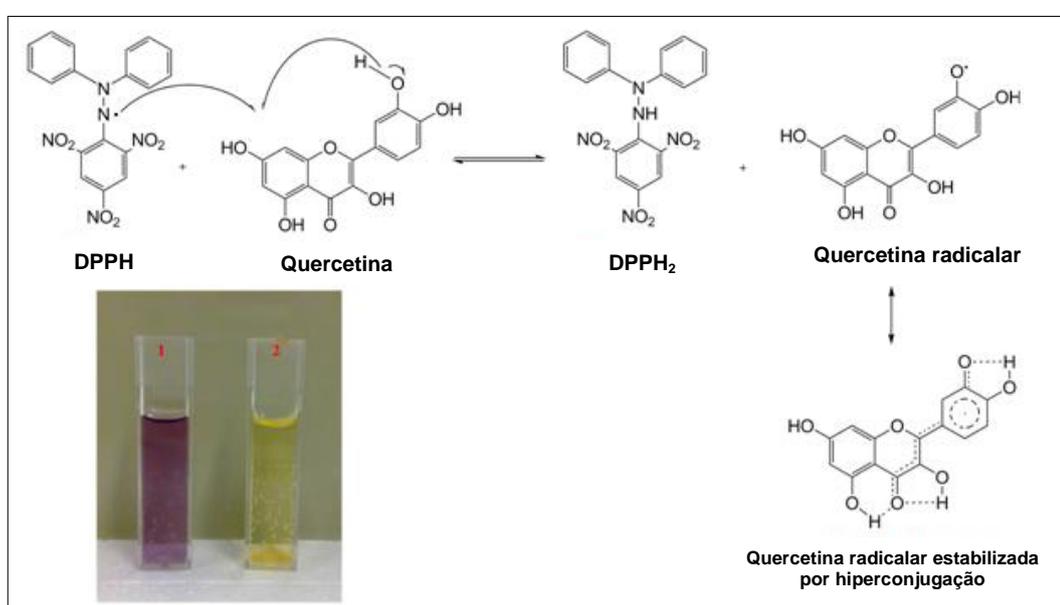


Figura 11 - Redução do radical livre DPPH pelo flavonóide antioxidante quercetina.
Fonte: Teixeira & Silva 2013.

A substância quercetina foi utilizada como padrão antioxidante para avaliar o método DPPH. O padrão foi diluído a partir da solução trabalho 40 µg/mL nas seguintes concentrações: 13,33; 4,44; 1,48; 0,49; 0,16; 0,05; 0,02 µg/mL. As soluções foram preparadas em microcubetas, conforme esquema apresentado na **Figura 12**.

	Controle	Padrão sem DPPH			Padrão com DPPH		
[] µg/mL	1	2 (1.1)	3(1.2)	4(1.3)	5(1.1)	6(1.2)	7(1.3)
A	■	□	□	□	■	■	■
B	■	□	□	□	■	■	■
C	■	□	□	□	■	■	■
D	■	□	□	□	■	■	■
E	■	□	□	□	■	■	■
F	■	□	□	□	■	■	■
G	■	□	□	□	■	■	■

Figura 12 – Esquema para a preparação das soluções para avaliar o método DPPH por espectrofotometria.

- Adicionou-se 1000 µL de metanol nas microcubetas das **colunas** de **1** a **4** e 500 µL nas microcubetas das **colunas** de **5** a **7**.
- Adicionou-se 500 µL da solução trabalho (quercetina) (P1-1, Seção 2.2b), nas microcubetas da **linha A**, das **colunas 2** e **5** (13,33 µg/mL).
- Adicionou-se 500 µL das soluções trabalho do padrão quercetina, (P1-2, Seção 2.2b), nas microcubetas da **linha A**, das **colunas 3** e **6** (13,33 µg/mL).
- Adicionou-se 500 µL das soluções trabalho do padrão quercetina, (P1-3, Seção 2.2b), nas microcubetas da **linha A**, das **colunas 4** e **7** (13,33 µg/mL).
- Transferiu-se 500 µL da **linha A** para a **linha B** das **colunas** de **2** a **7**. Este procedimento foi realizado sucessivamente até a **linha G**, de modo a produzir diluições seriadas (**linha B** 4,44 µg/mL; **linha C** 1,48 µg/mL; **linha D** 0,49 µg/mL; **linha E** 0,16 µg/mL; **linha F** 0,05 µg/mL; **linha G** 0,02 µg/mL).

- f) Adicionou-se 500 μL de DPPH nas microcubetas das **colunas 1, 5, 6 e 7**.
- g) Incubou-se as microcubetas à temperatura ambiente e sem exposição da luz por 30 minutos.
- h) Realizou-se as medidas de absorvância em 517 nm.

Para os extratos das amostras de óleo, foram repetidos os procedimentos de (a) a (h) substituindo o padrão quercetina pelos extratos. As soluções trabalho (100 $\mu\text{g/mL}$, Seção 4.2d) foram diluídas, alcançando as concentrações finais de: 33,33; 11,11; 3,70; 1,23; 0,41; 0,14; 0,05 $\mu\text{g/mL}$.

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual da capacidade de sequestro (%CS) do radical, conforme a **equação 4**.

$$\%CS = 100 - \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{extrato}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \quad (4)$$

Onde A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH (absorvância do controle) e $A_{\text{extrato}} - A_{\text{branco}}$ é a absorvância corrigida do extrato da amostra. A absorvância corrigida do extrato é calculada pela diferença entre a absorvância do extrato com DPPH (A_{Extrato}) e a absorvância do extrato sem DPPH (A_{Branco}). O valor de $\%CS_{50}$ é definido com a concentração final em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato/óleo requerido para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

2.4 Escolha do comprimento de onda

Para definir o comprimento de onda a ser utilizado nas medidas, foi obtido um espectro da mistura do padrão quercetina e do DPPH. Para isso, foi utilizada uma

mistura de 500 μL da solução DPPH (0,3 mM), 500 μL solução de quercetina na concentração de 40,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 500 μL metanol. A escolha do comprimento de onda foi baseada na maior sensibilidade do método DPPH.

2.5 Determinação de Atividade Antioxidante por Imagem Digital – DIB

Após as medidas por espectrofotometria, foram transferidos 350 μL de cada solução para os poços da microplaca, seguindo a mesma orientação descrita no item 4.4.1, conforme a **Figura 13**.

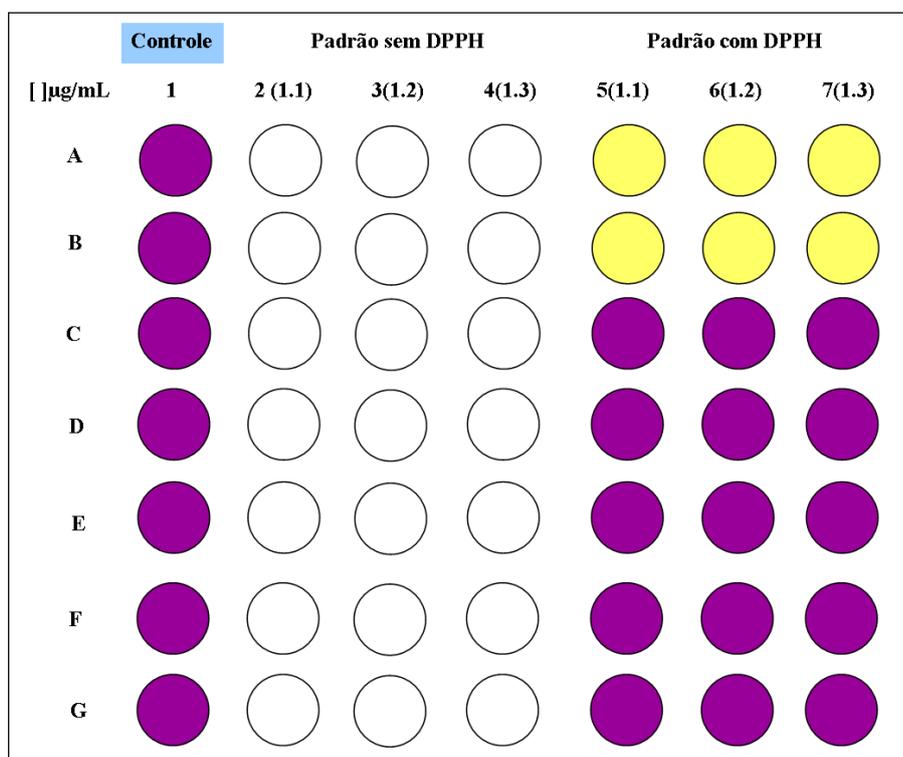


Figura 13 – Esquema para a realização das medidas por imagem digital pelo método DPPH.

As imagens capturadas durante as análises para determinação da atividade antioxidante dos óleos de plantas amazônicas, usando o sistema DIB, foram tratadas com o programa (IMAGEJ, 2014) disponibilizado grátis para *download* na *internet*. Esse *software* de domínio público, escrito em *Java*, possui o código – fonte

aberto, possibilitando alteração em sua arquitetura e também na sua interface, conforme é mostrado na **Figura 14**.

Com o *software ImageJ* é possível editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 *bits*. Além disso, programa *ImageJ* permite calcular estatística de valor de *pixel* em áreas pré definidas da imagem e criar histograma de densidade e parcelas de perfil de linha. O *ImageJ* suporta ainda funções de processamento de imagem padrão de contraste, nitidez, detecção de borda de suavização e filtragem mediana.

Primeiro, o usuário seleciona a região mais homogênea da imagem desejada (**Figura 14**). As coordenadas da região selecionada são então armazenadas para serem usadas em todas as outras imagens. O *software* verifica todos os *pixels* (coluna por coluna) para extrair as componentes RGB de cada *pixel* e calcular o valor médio, mínimo e máximo para cada componente RGB, conforme solicitado pelo usuário. Os resultados são exibidos em uma janela **Figura 15** e, em seguida armazenados no computador.

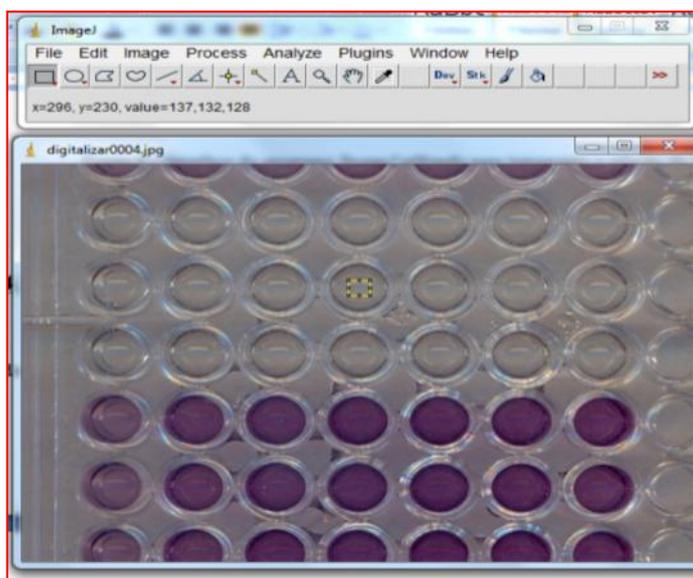
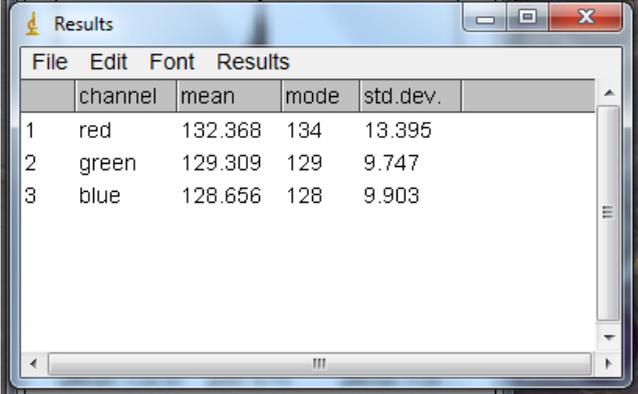


Figura 14 – Interface do programa *ImageJ* utilizado para tratamento e seleção da área das imagens.



	channel	mean	mode	std.dev.
1	red	132.368	134	13.395
2	green	129.309	129	9.747
3	blue	128.656	128	9.903

Figura 15 – Janela do programa *ImageJ* apresentando os resultados das análises das componentes RGB da área selecionada.

2.6 Equações matemáticas para conversão das imagens em RGB para HSV

Os valores das componentes RGB foram convertidos para o modelo HSV, definidos pelos parâmetros matiz (H , *Hue*), saturação (S , *Saturation*) e luminância (V , *value*). A representação gráfica tridimensional do modelo é uma pirâmide hexagonal derivada do cubo RGB **Figura 16**.

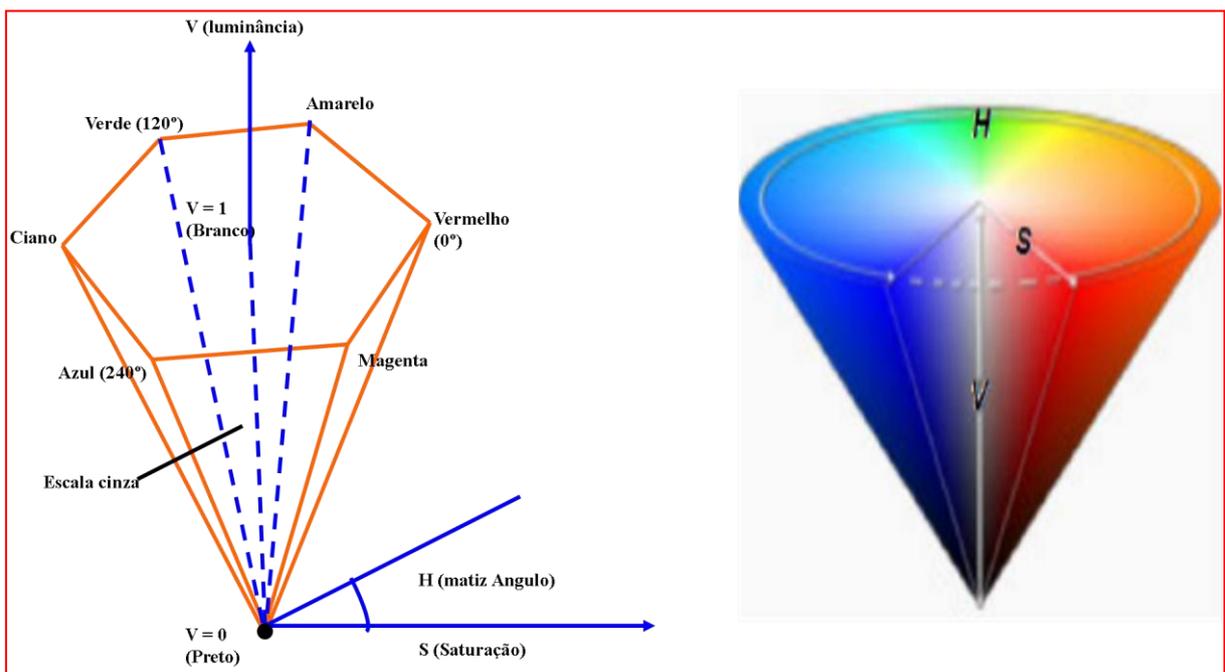


Figura 16 - Representação gráfica do modelo HSV.

A conversão do modelo RGB para o modelo HSV é feita por **Equação 5**:

$$\begin{aligned}
 H &= \begin{cases} 60 * \frac{(G - B)}{(M - m)}, \text{ se } M = R \\ 60 * \frac{(B - R)}{(M - m)} + 120, \text{ se } M = G \\ 60 * \frac{(R - G)}{(M - m)} + 240, \text{ se } M = B \end{cases} \\
 S &= \begin{cases} \frac{(M - m)}{M}, \text{ se } M \neq 0 \\ 0, \text{ caso contrário} \end{cases} \\
 V &= M
 \end{aligned} \tag{5}$$

Onde m e M correspondem ao menor e maior valor entre as componentes RGB. A luminância V está normalizada entre 0 e 1. A matiz H varia entre 0 e 360 graus. Para determinar a atividade antioxidante dos óleos das plantas foram utilizados os valores de S.

A capacidade de sequestro de radical livre foi calculado pela **Equação 3** descrita no **item 2.3**.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Escolha do comprimento de onda para as medidas por espectrofotometria

A **Figura 17** mostra o espectro obtido da mistura de 500 μL da solução DPPH (0,3 mM), 500 μL solução de quercetina 40,00 $\mu\text{g/mL}$ e 500 μL metanol.

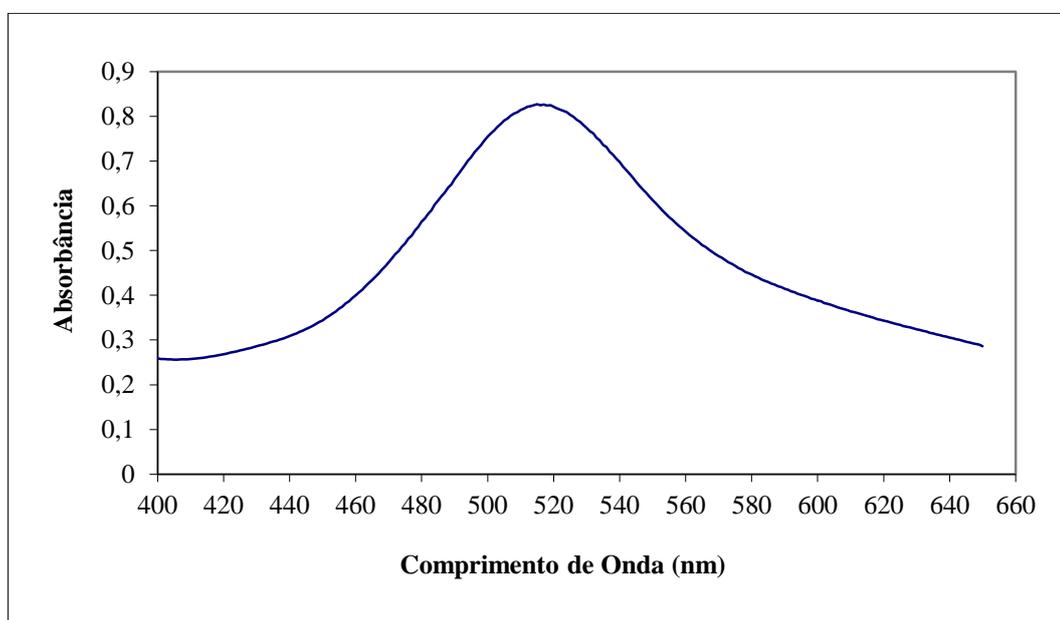


Figura 17 – Espectro obtido a partir da mistura do DPPH (0,3 mM) e padrão quercetina (13,33 $\mu\text{g/mL}$).

Como pode ser visualizada na **Figura 17**, a solução DPPH/quercetina apresenta um máximo de absorção entre 515 e 520 nm. Segundo Molineux (2004), as medidas de absorbância podem ser realizadas em 515, 516, 517, 518 e 520 nm. Neste trabalho foi escolhido o comprimento de onda de 517 nm para determinar a atividade antioxidante do padrão e das amostras.

3.2 Definição dos parâmetros de medidas por espectrofotometria e DIB

Para encontrar uma melhor relação entre o sinal de absorbância e a concentração do padrão/extratos metanólicos, variou-se as quantidades dos reagentes: DPPH, padrão/extrato e metanol, definindo as quantidades: 500 μ L (DPPH), 500 μ L (padrão/extrato) e 500 μ L (metanol) como ótimas. Além disso, foi estudado também a influência da centrifugação do extrato em 2000 RPM, verificando uma melhor reprodutibilidade das medidas quando o extrato era centrifugado.

3.3 Determinação da atividade antioxidante por espectrofotometria e DIB

Para avaliar a metodologia do DPPH construiu-se um gráfico relacionando a capacidade de sequestro ($\%CS_{50}$) do radical livre DPPH em função da concentração do padrão quercetina, **Figura 18**.

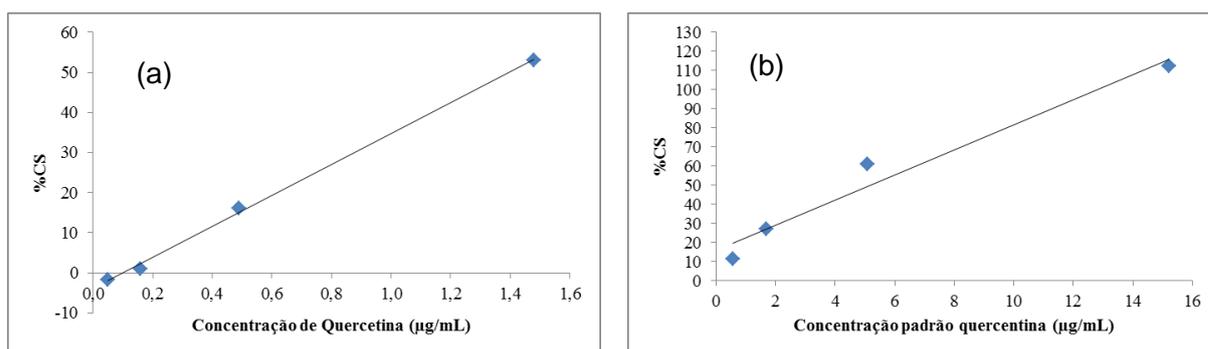


Figura 18 – Capacidade de sequestro versus concentrações do padrão quercetina. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).

Realizados os ajustes na metodologia do DPPH, a mesma foi empregada para avaliar os extratos. Do mesmo modo, gráficos relacionando a capacidade de sequestro ($\%CS$) do radical livre DPPH em função das concentrações das amostras

foram construídos, com as medidas realizadas por espectrofotometria e por DIB (FIGURAS 19 a 24).

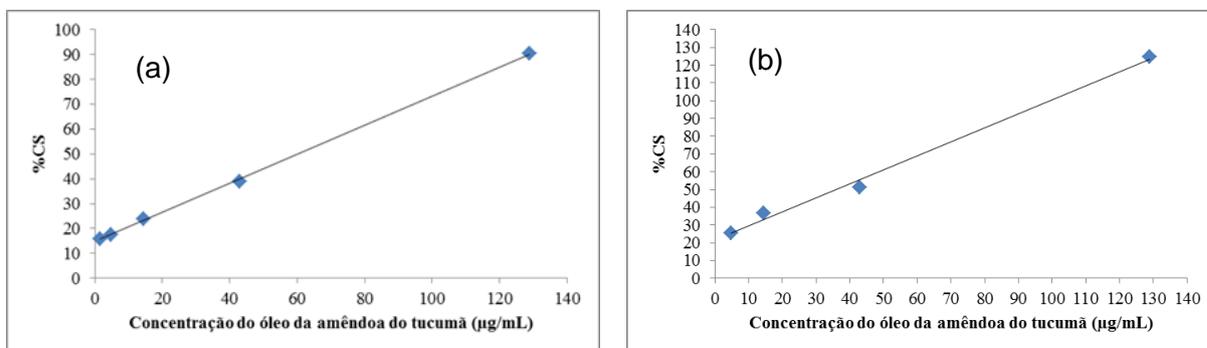


Figura 19 – Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo do tucumã (amêndoa). Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).

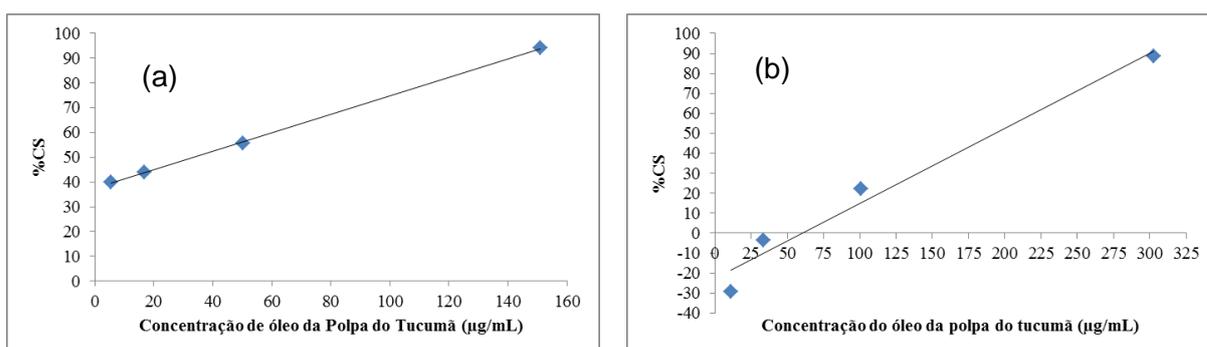


Figura 20 – Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo do tucumã (polpa). Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).

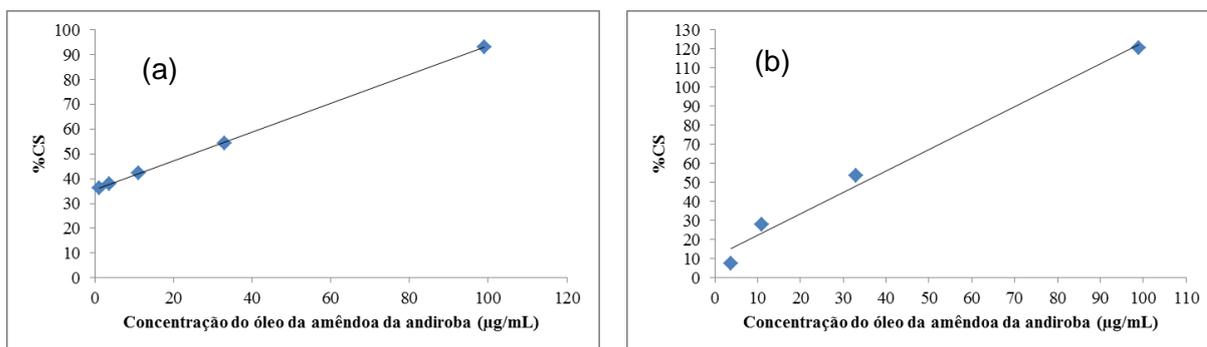


Figura 21 – Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo da andiroba. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).

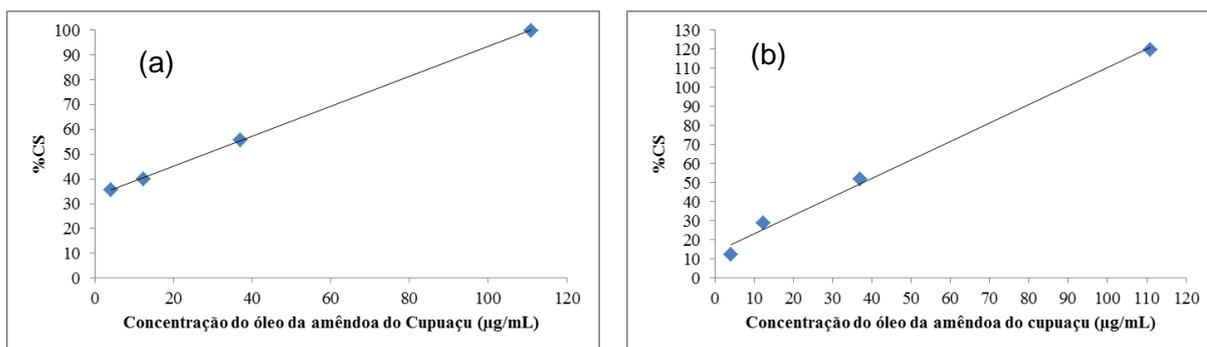


Figura 22 – Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo do cupuaçu. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).

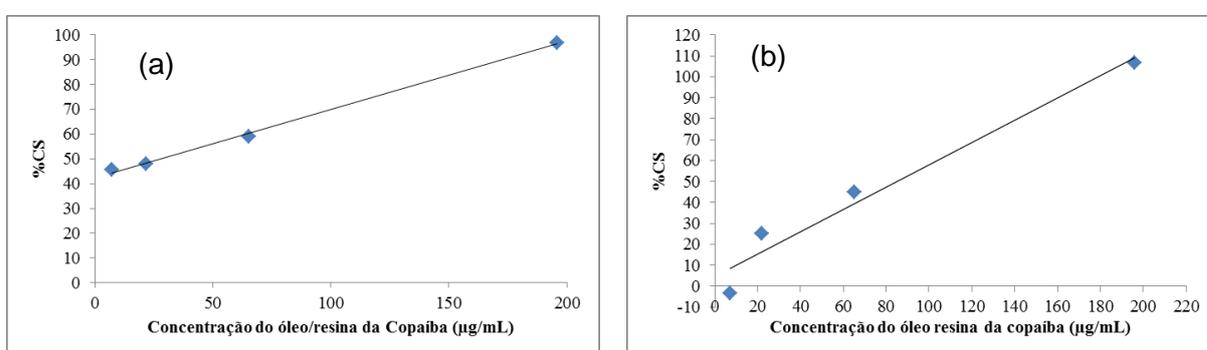


Figura 23 – Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo da copaíba. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).

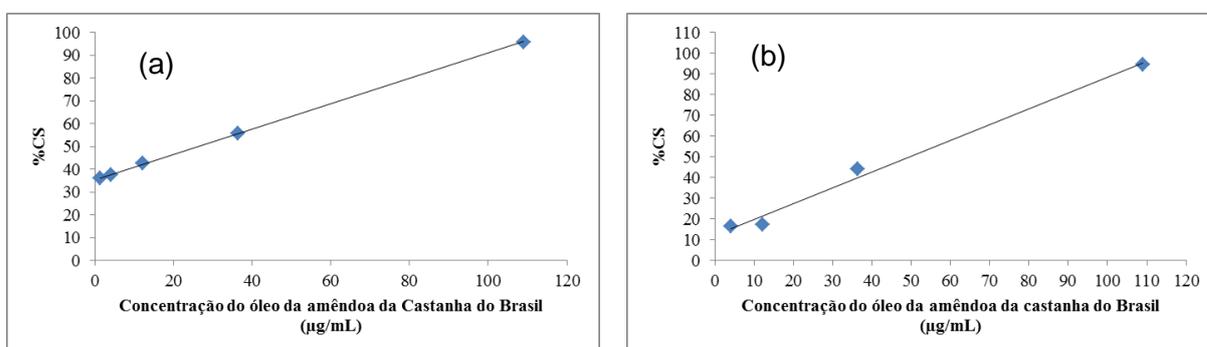


Figura 24 – Capacidade de sequestros versus concentrações do óleo da castanha do brasil. Medidas por espectrofotometria (a) e por DIB (b).

A capacidade de sequestro do radical DPPH foi calculada com a concentração dos extratos na ordem de µg/mL. Os resultados para %CS₅₀ destes extratos, obtidos das curvas das **Figuras 19 a 24**, bem como do padrão quercetina, obtido da curva da **Figura 17**, estão apresentados na **Tabela 9**. Os valores entre parênteses representam os desvios padrão para três determinações.

Padrão/Amostra	Concentração %CS ₅₀ (µg/mL)	
	Espectrofotométrica	DIB
Quercentina	1,42 (0,20)	5,18 (1,52)
Tucumã (Amêndoa)	60,21 (1,92)	34,95 (20,61)
Tucumã (Polpa)	35,65 (4,70)	193,18 (14,58)
Andiroba (Amêndoa)	24,84 (4,96)	35,30 (8,51)
Cupuaçu (Amêndoa)	78,10 (2,75)	36,84 (13,86)
Copaíba (Resina)	27,59 (9,38)	83,76 (23,61)
Castanha do Brasil (Amêndoa)	25,84 (4,40)	49,34 (7,91)

Tabela 9 – Atividade antioxidante do padrão quercetina e dos óleos das amostras.

Para efeito de comparação, os resultados obtidos pelo método DIB foram avaliados em relação ao método espectrofotométrico. Embora os resultados obtidos pelas duas metodologias (**TABELA 9**), via de regra, sejam discrepantes, a análise baseada no teste *t* pareado não indica diferença significativa entre as metodologias para um nível de confiança de 95 %.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia baseada em imagens digitais para determinação de atividade antioxidante de óleo de plantas da região Amazônica. Utilizado como sistema de detecção um *scanner* para obtenção de imagens

As determinações das amostras foram feitas pelo sequestrador de radicais livres DPPH com as medidas realizadas por espectrofotometria UV-Vis e DIB. Os valores relacionados à cor das imagens digitais RGB, convertido para saturação do sistema de cor HSV, aos quais estão associados às emissões no UV-Vis, guardam uma relação linear com a concentração.

Diante dessa constatação, propôs-se um modelo matemático linear baseado no conceito de saturação de cores do sistema HSV, e então, construído as curvas analíticas DIB. Embora os resultados obtidos pela metodologia proposta (DIB), via de regra, sejam discrepantes daqueles obtidos pela espectrofotometria, uma análise estatística baseada em teste *t* pareado não indica diferença significativa entre as duas metodologias para um nível de confiança de 95 %. Por outro lado, os altos desvios padrão para os resultados obtidos pela metodologia DIB indica a necessidade de ajustes no tratamento matemático das imagens.

Em relação a espectrofotometria, a metodologia DIB requer uma instrumentação mais barata e, assim como a primeira, pode ser facilmente automatizada pelo uso de analisadores automáticos (FIA, SIA, FBA).

A pesquisa contribuiu para o avanço da ciência e da tecnologia, como também, abriu um leque de possibilidades futuras para pesquisas envolvendo a flora Amazônica pelo uso de imagens digitais.

4.1 Propostas futuras

Além de a pesquisa ser inédita no campo de determinação da atividade antioxidante de óleos de plantas amazônicas, onde focalizou-se no uso de um *scanner* como detector para obtenção de sinais analíticos com maior sensibilidade. Vantagens são enfatizadas como economia de soluções e reagentes, baixo custo de equipamentos, por outro lado, a questão do modelo matemático não foi bem explorado no trabalho abrindo assim um leque para pesquisas futuras.

Para obtenção de resultados ainda melhores utilizando a metodologia DIB, pretende-se:

- Avaliar a influência do uso de diferentes poços para construção da curva dos valores de CS em função das concentrações dos extratos.
- Reavaliar os procedimentos utilizados para tratar as imagens obtidas por *scanner*, no que diz respeito a área selecionada para obtenção dos valores das componentes RGB.
- Reavaliar os cálculos feitos para os valores de CS utilizando o sistema de cor HSV.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G. O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food - a critical appraisal. **Journal of Food Science & Technology**, v.35, n.4, p.283-98, 1998.
- BAUER, A.K. et al. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**, v.169, n.1, p.1-15, 2001.
- BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUNO, A. DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 457-462, 2000.
- BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BLOIS, Marsden S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. 1958.
- BORA, P. S. et al.: Characterization of the oil and protein fractions of tucuma (*Astrocaryum vulgare* Mart) fruit. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, Ourense, Espanha, 3 (2001), 111-116.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. and BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- BROWN, T. L et al. **Química Central**. Pearson Prentice Hall, 2005.
- BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements, *Trends Anal. Chem.* 19: 517, 2000.
- CAMPOS, A. M, LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics*. 219-224. 1997.
- CARDARELLI, H. R.; OLIVEIRA, A. J. Conservação do leite de Castanha-do-Brasil. *Sci. Agríc.*, v.57, p. 617- 622, 2000.
- CASTILLO, J., BENAVENTE-GARCIA, O., LORENTE, J., ALCARAZ, M., REDONDO, A. ORTUNO, A. DEL RIO, J. A. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by x-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 1738-1745, 2000.

CASTLEMAN, K. R. Digital image processing. Prentice Hall, New Jersey, 667p, 1996.

CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi, ESALQ/USP, 1972. 84p.

CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia. 5. ed. Belém: CEJUP, 1991. 279p.

_____. *Frutas comestíveis da Amazônia*; coleção Adolfo Ducke, 6ª edição, Belém Pará. 1996, 219-220.

CHLEBAROV; S. 1990: "Die Kosmetischen Eigenschaften der Phytosterole"1 TW Dermatologie.

DECKER, E. A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p.517-42.

DE VASCONCELOS, A. F. F., GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1057-1060, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, J. R. GENOVESE, M. I. LAJOJO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FERRAZ, I. D. K., CAMARGO, J. L. C., SAMPAIO, P. T. B. **Manual de sementes da Amazônia**. Fascículo 1. 2003. Disponível em: ftp://ftp.inpa.gov.br/pub/documentos/sementes/manuais/fasciculo1_carapa.pdf. Acesso em: 02/10/2012.

FERREIRA, E. S., SILVEIRA, C. S., LUCIEN, V. G., AMARAL, A. S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K). **Alim. Nutr.** v. 17, p.203-208, 2006.

FERREIRA, E. S., LUCIEN, V. G., AMARAL, A. S., SILVEIRA, C. S. Caracterização físico-química do fruto e do Óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum Vulgare* Mart). **Alim. Nutr.**, v. 19, p. 427-433, 2008.

FOGLIANO, V., VERDE, V., RANDAZZO, G., RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 3, p. 1035-1040, 1999.

GIAIO, E. D. N., MARTINS, V. L., LYRA, W. D. S., ALMEIDA, L. F. D., SILVA, E. C. D., & ARAÚJO, M. C. U. Digital image-based titrations. **Analytica chimica acta**, v. 570, pp. 283-290, 2006.

GILBERT, B., et al. "Activities of the Pharmaceutical Technology Institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants." *An. Acad. Bras. Cienc.* 1999; 71(2): 265-71.

GELADI, P. & GRAHN, H. Grahn. **Multivariate Image Analysis**: First Edition. New York: Ltd, John Wiley & Sons, 1996.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de Castanha-do-Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciênc. Technol. Alim.**, Campinas, v.2, p. 240-245, 2000.

GOMES, M. S., TREVIZAN, L. C., NÓBREGA, J. A., & KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 31, pp. 1577-1581, 2008.

GONZALES, R. C.; WOODS, R. E. Processamento de imagens digitais. Editora Edgard Blucher, 510 p. São Paulo, 2002.

IMAGEJ, software para processamento e análise de imagens em java, disponível em: < <http://rsb.info.nih.gov/ij/> >. Acessado em 23/06/2014.

JUNIOR, V. F. V., PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

KIRSCHBAUM, B. Total urine antioxidant capacity. *Clinica Chimica Acta*, v. 305, n. 1-2, p. 167-173, 2001.

KOYA, T. K. Sistema Automático para Contagem das Células do Sangue. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2001.

KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G., TRONCOSO, A. M., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LANNES, S. C. S. *et al.* Cupuassu - A new confectionery fat from Amazonia. *Inform-AOCS*, v.14, n.1, p.40-41, 2003.

LEE, J., RENNAKER, C. D. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chemistry*, v. 105, p. 195-203, 2007.

LOPEZ-MOLINERO, A. et al. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics, *Microchem. J.* 96:380, 2010.

LOPEZ-VELEZ, M., MARTINEZ-MARTINEZ, F., VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, n. 3, p. 233-244, 2003.

LORENZI, H., SOUZA, H. M., CERQUEIRA, L. S. C., COSTA, J. T. M., FERREIRA, E. *Palmeiras Brasileiras e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2004, 44.

LYRA, W.S. Espectrometria de emissão em chama baseada em imagens. João Pessoa, Departamento de Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 103p, 2008.

MACIEL, M. A. M, et al.: Plantas Mediciniais: As Necessidades de Estudos Multidisciplinares. 2002, Química Nova, v. 25, n. 3, p. 429.

MACHADO, A. W., LEITE, E. B., SOUKI, B. Q. Fotografia Digital em Ortodontia: Parte IV – Sugestão de Equipamento. J Bras Ortodon Ortop Facial, Curitiba, v. 9, n. 52, p. 323-327, jul/ago, 2004.

MACKINNON, S., et al. "Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives." J. Nat. Prod. 1997; 60(4): 336-41.

MARQUES FILHO, Ogê; VIEIRA NETO, Hugo. Processamento Digital de Imagens, Rio de Janeiro: Brasport, 1999, 331p.

MARTINS, Carolina de Aguiar. **Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro e in vivo do Guaraná (Paullinia cupana) em pó**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594-598, 1968.

MARTINEZ, A. W., PHILLIPS, S. T., CARRILHO, E. THOMAS, S. W. SINDI, H. WHITESIDES, G. M. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, pp. 699-707, 2008.

MAZZA, G., KAY, C. D., COTTREL, T., HOLUB, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p.7731-7737, 2002.

MENSOR, L. L., MENEZES, F. S., LEITAO, G. G., REIS, A. S., SANTOS, T. C. dos, COUBE, C. S., LEITAO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p.91, 1971.

MORAIS, L. R. B. Química de Oleaginosas: Valorização da biodiversidade amazônica. Brasília: GTZ, 2009. 83p.

MÜLLER, C. H. *et al.*: A cultura do cupuaçu. 1995, Embrapa-CPATU, coleção plantar 24, p.61.

NEGRI, M. L. S., POSSAMAI, J. C. and NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(2B): 553-556, Abr./Jun. 2009.

NETO, J. S. L., GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *copaifera langsdorffi* Desf. *Química Nova*, n. 31, n. 5, p. 1078-1080, 2008.

NEVES, O. S. C., BENEDIO, D. S., MACHADO, R. V., CARVALHO, J. G. Crescimento, produção de matéria seca e acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S na parte aérea de mudas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) cultivadas em solo de várzea, em função de diferentes doses de fósforo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 28, p. 343-349, 2004.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2002.

PESCE, Celestino. **Oleaginosas da Amazônia**. 2 ed., rev. e atual./ Celestino Pesce;. – Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, 2009. 334p.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAMALHO, V. C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-60, 2006.

RAPOSO, A., SILVA, J. M. M., SOUSA, J. A. **Estudos fenológicos de andiroba (*Carapa guianenses*) no município de Rio Branco**. 2003. Disponível em: <http://adaltech.com.br/evento/museugoeldi/resumoshtm/resumos/R0437-1.htm>. Acesso em: 02/10/2012.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

ROY, A., et al. "Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29(2): 191-201.

RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E; BRITO, E. S; MORAIS, S. M; SAMPAIO, C. G; PÉREZ-JINÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza, CE. Comunicado Técnico on line, n. 125, p1-4, Dezembro de 2006.

SALAH, N., MILLER, N. J., PAGANGA, G., TIJBURG, L., BOLWELL, G. P.; RICEEVANS, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals

and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 322, n. 2, p. 339-346, 1995.

SHISHKIN, Y. L., DIMITRIENKO, S. G., MEDVEDEVA, O. M. BADAKOVA, S. A., PYATKOVA, L. N. Use of a scanner and digital image-processing software for the quantification of adsorbed substances. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, pp. 102-106, 2004.

SILVA, Cleber Luiz Maia da. Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol. 2005. 60f. Dissertação (mestrado em química inorgânica). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

SOLDAT, D. J., BARAK P., LEPORE, B. J. "Micro scale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis." *Journal of chemical education*, v. 86, pp. 617-620. 2009.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de Castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.24, n.1, p. 120-128, 2004.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S., CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355, 2007.

TEXEIRA, F. A., SILVA, C. G. DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$. *Química Nova Interativa*. Disponível em: <http://qnint.sbq.gov.br>, acessado em 05/02/2014.

TINCUSI, Benigna M. et al. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta medica*, v. 68, n. 09, p. 808-812, 2002.

TÔRRES, A. R., LYRA, W. S., ANDRADE, S. I. E, ANDRADE, R. A. N, SILVA, C. E, ARAÚJO, M. C. U, GAIÃO, E. N. Um método baseado em imagem digital para a determinação da acidez total em vinhos tintos utilizando titulação ácido-base, sem indicador. **Talanta** , v. 84, pp. 601-606, 2011.

VAN DEN BERG, R., HAENEN, G. R. M. M., VAN DEN BERG, H., VANDER V. W., BAST, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, v. 703, p. 391-395, 2000.

VILLANO, D., FERNANDEZ-PACHON, M. S., TRONCOSO, A. M., GARCIA-PARRILLA, M. C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS(+) method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, v. 64, n. 2, p. 501-509, 2004.

WILKENS, Marcela et al. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. *Planta médica*, v. 68, n. 05, p. 452-454, 2002.

WINKLER, A. 1977: Experimental studies of effect of water content of upper layers of human skin. *Arztl. Kosmetologie*, 7, 65-77.

WITHAGEN, P. J., GROEN, F. C. A., SCHUTTE, K. CCD Color Camera Characterization for Image. Measurements, v. 56, pp. 199-203, 2007.

WOJDYŁO, A., OSZMIANSKI, J., CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, Kidlington, v. 105, p. 940-949, 2007.

WONGWILAI, W. et al. Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach, *Talanta*, **81:1137, 2010**.

YANG, H. et al. New bioactive polyphenols from ***Theobromagrandiflorum*** ("Cupuaçu"). **Journal of Natural Products**, v.66, n.11, p.1501-1504, 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/np034002j>>. Acesso em 02/10/2012.

_____. **Dossiê antioxidantes**. Food Ingredients Brasil, v 6, p. 17, 2009.