



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

PEDRO HENRIQUE DA SILVA BARATA

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DO
ÓLEO DE *Berthalletia Excelsa* (CASTANHA DO BRASIL) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

**Macapá
2019**

PEDRO HENRIQUE DA SILVA BARATA

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DO
ÓLEO DE *Berthalletia Excelsa* (CASTANHA DO BRASIL) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Projeto do Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura em
Química da Universidade Federal do Amapá,
como requisito da disciplina de TCC II.

Orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira.

**Macapá
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Aline Farias Bandeira Couto – CRB-2 0017/O

B226s Barata, Pedro Henrique da Silva
Síntese enzimática de amidas graxas derivadas do óleo de *Bertholletia excelsa* (castanha do Brasil) e avaliação da atividade anti-inflamatória [recurso eletrônico] / Pedro Henrique da Silva Barata. - Macapá, 2019.
31 f.

Orientador: Irlon Maciel Ferreira
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá – UNIFAP,
Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Curso de Licenciatura em Química. 2024.

Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Castanha-do-brasil. 2. *Bertholletia excelsa*. 3. Aminólise. I. Ferreira, Irlon Maciel, orientador. II. Universidade Federal do Amapá - UNIFAP. III. Título.

CDD 23. ed. – 634.55

BARATA, Pedro Henrique da Silva. **Síntese enzimática de amidas graxas derivadas do óleo de *Bertholletia excelsa* (Castanha do Brasil) e avaliação da atividade anti-inflamatória**. Orientador: Irlon Maciel Ferreira. 2019. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

BANCA EXAMINADORA

Aluno: Pedro Henrique da Silva Barata.

Orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira.

Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira/ Presidente

Professor Titular do Curso de Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Prof. Me. Alex Bruno Lobato Rodrigues/ Membro Titular

Professor Titular do Curso de Química da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Prof. Me. Fabrício Holanda e Holanda / Membro Titular

Discente do Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF) da
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Data: 02/07/2019

Dedico este trabalho ao Prof. Dr. Irlon M. Ferreira pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho. À minha família, mãe e meu pai pelos cuidados, companheirismo dedicação que foram, em alguns momentos, a esperança para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu orientador, pelo empenho e várias noites usufruídas dedicadas à elaboração deste trabalho.

Agradeço a minha mãe Eliane Silva, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Assim como ao meu pai Henrique Bastos que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e me incentivou todos esses anos de universitário.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro, eivado pela confiança no mérito e ética aqui presentes.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Amidas graxas (AG).....	1
1.2 Obtenção de AG.....	1
1.3 Aplicação da biocatálise nas sínteses orgânicas.....	1
1.4 Castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>).....	2
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Gerais.....	3
2.2 Específicos.....	3
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
3.1 Reagentes e solventes.....	4
3.2 Transesterificação do Óleo de Castanha do Brasil (OCB) por catálise enzimática.....	4
3.3 Procedimento geral da reação de aminólise dos triglicerídeos do OCB.....	4
3.4 Animais usados na análise.....	4
3.5 Teste de toxicidade aguda.....	4
3.6 Análise estatística.....	5
3.7 Medição da Absorção de Amostras e Controle.....	5
3.8 Avaliação cinética da degradação do DPPH contra amostra e ácido ascórbico.	6
3.9 Análises espectrais das substâncias sintetizadas.....	6
3.9.1 <i>Análise de CG-EM</i>	6
3.9.2 <i>Análise de RMN de C¹³</i>	6
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
4.1 Síntese das amidas graxas (AG).....	7
4.2 Análise de CG-EM e composição química do OCB.....	8
4.3 Atividade antioxidante.....	11
4.4 Atividade Antiinflamatória.....	12
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	15
6. REFERÊNCIAS.....	16

LISTA DE TABELAS, FIGURAS, ANEXOS E APÊNDICES

FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química da anandamida.....1
- Figura 2** – Espectro de massas dos compostos EEAG (A) e AG (B).....9
- Figura 3** – Cromatogramas gasosos (CG) de éster etílico derivado de *Bertholletia excelsa* por catálise de LPF.....10
- Figura 4** – Espectro de RMN de C^{13} (100 MHz, $CDCl_3$) do óleo de castanha do Brasil ‘OCB’ (A), ésteres etílicos de ácidos graxos ‘EEAG’ (B) e amida graxas ‘AG’ (C).....11
- Figura 5** – (A) Atividade antioxidante *in vitro* de OCB, EEAG, AG e ácido ascórbico (AA) na inibição do DPPH (%). (B) Cinética de degradação antioxidante em DPPH (%).....12
- Figura 6** – Ação anti-inflamatória do óleo de castanha do Brasil (OCB 100mg/kg), Amidas Graxas (AG 20 e 40 mg/kg) e Indometacina (Indo 10 mg/kg) para edema de pata em ratos Wistar. Os objetos de valor representam a média±desvio padrão (n = 5/grupo). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,0, e descrevem os resultados estatisticamente significativos na comparação com o grupo de veículos.....13

TABELAS

- Tabela 1** – Otimização da reação de amidação dos triglicerídeos de *Bertholletia excelsa* (óleo de castanha do Brasil)³³8
- Tabela 2** – Composição de éster etílico de amostras derivadas do OCB determinados por análise CG-EM^a.....9
- Tabela 3** – Efeito do tratamento com óleo de castanha do Brasil (OCB 100mg/kg) e amida graxas (AG 20 e 40 mg/kg) em parâmetros bioquímicos de ratos Wistar.....14

1. SIGLAS

- 1.1 **AG** – Amidas Graxas
- 1.2 **OCB** – Óleo de Castanha do Brasil
- 1.3 **EEAG** – Éster Etílico de Ácido Graxo
- 1.4 **LPF** – Lipase de *Pseudomonas fluorescens*
- 1.5 **AA** – Ácido Ascórbico
- 1.6 **CG-EM** – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
- 1.7 **RMN de C¹³** – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
- 1.8 **AST** – Aspartato aminotransferase
- 1.9 **ALT** – Alanina aminotransferase

2. ABREVIATURA

- 2.1 **Indo** – Indometacina
- 2.2 **DPPH** – 2,2- difenil-1-picril-hidrazil

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DO ÓLEO DE *Bertholletia Excelsa* (CASTANHA DO BRASIL) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

RESUMO

Introdução: As amidas graxas são um dos endocanabinóides mais estudados devido sua versatilidade em atividades biológicas como analgésico, antimicrobiano, antidepressivo, anti-inflamatório e anticancerígeno. As AG podem ser sintetizadas a partir do éster graxo com um derivado de alcanolamina na presença de um catalisador heterogêneo ou enzimático, nestes casos, a reação normalmente envolve duas etapas em altas temperaturas com formação incompleta do produto, o que aumenta o custo de produção e consequentemente, exigem mais etapas de purificação. Uma alternativa para estes problemas é a aminólise direta dos triglicerídeos do óleo via catálise enzimática. **Objetivos:** Diante disso, o objetivo foi obter amidas graxas a partir do óleo de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) via síntese enzimática e avaliar atividade anti-inflamatória do produto obtido. **Metodologia:** As AG foram obtidas por biocatálise, LPF (10-15%), e o OCB (1 ml) com etanolamina (3 ml ~ 2,166 mg); posteriormente foram realizadas as análises de CG-EM, RMN de C^{13} e testes de antioxidantes com DPPH. O teste de toxicidade aguda seguiu o protocolo da Diretriz 423 da OCDE. Animais machos foram separados em quatro grupos ($n = 3$), e tratados com: Veículo (0,5 ml/animal); AG20 (20 mg/kg); AG40(40 mg/kg); OCB100 (100 mg/kg). **Resultados e discussões:** Os melhores rendimentos na síntese das AG foram obtidos nas reações 4^a e 5^b (91% e 98% com 15% e 10% de lipase, respectivamente). A inibição do radical DPPH, em comparação com o padrão de ascorbato, foi bastante significativa para as AG, enquanto o OCB e EEAG não apresentaram atividade. Na análise anti-inflamatória não observou diferença significativa OCB e AG, entretanto, este demonstrou maior potência anti-inflamatória. **Conclusões:** Os resultados demonstram que AG do OCB podem ser produzidas por aminólise direta com rendimentos acima de 90% usando lipase de *P. fluorescens* e ser uma amida graxa atrativa para a atividade anti-inflamatória e antioxidante.

Palavras-Chave: *Bertholletia excelsa*; Aminólise direta; Amida graxa; Antiinflamatório.

Agradecimentos: UNIFAP, BIORG, CNPq e FAPEAP.

**ENZYMATIC SYNTHESIS OF LOW FERTILIZERS DERIVED FROM OIL OF
Bertholletia excelsa (BRAZIL NUTS) AND EVALUATION OF ANTI-
INFLAMMATORY ACTIVITY**

ABSTRACT

Introduction: Fatty amides are one of the most studied endocannabinoids because of their versatility in biological activities such as analgesic, antimicrobial, antidepressant, anti-inflammatory and anticancer. FA can be synthesized from the fatty ester with an alkanolamine derivative in the presence of a heterogeneous or enzymatic catalyst, in which case the reaction usually involves two steps at high temperatures with incomplete product formation, which increases the cost of production and consequently, require further purification steps. An alternative to these problems is the direct aminolysis of the triglycerides of the oil via enzymatic catalysis. **Objectives:** Therefore, the objective was to obtain fatty amides from Brazil nut oil (*Bertholletia excelsa*) via enzymatic synthesis and to evaluate the anti-inflammatory activity of the obtained product. **Methodology:** FAs were obtained by biocatalysis with LPF (10-15%) and substrates such as BNO (1 ml) and ethanolamine (3 ml ~ 2.166 mg); GC-MS, C^{13} NMR and antioxidant tests with DPPH were performed. The acute toxicity test followed the OECD Guideline 423 protocol. Male animals were separated into four groups (n = 3), and treated with: Vehicle (0.5 ml / animal); FA20 (20 mg / kg); FA40 (40 mg / kg); BNO100 (100 mg / kg). **Results and discussion:** The best yields in FA synthesis were obtained in reactions 4a and 5b (91% and 98% with 15% and 10% lipase, respectively). Inhibition of the DPPH radical, compared to the ascorbate standard, was quite significant for the FA, whereas BNO and EEFA did not show activity. In the anti-inflammatory analysis did not observe significant difference BNO and FA, however, this showed a greater anti-inflammatory potency. **Conclusions:** The results demonstrate that FA of BNO can be produced by direct aminolysis with yields above 90% using *P. fluorescens* lipase and is an attractive amide grease for anti-inflammatory and antioxidant activity.

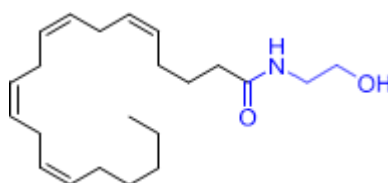
Keywords: *Bertholletia excelsa*; Direct Aminolysis; Fatty amide; Antiinflammatory activity.

Acknowledgements: UNIFAP, BIORG, CNPq e FAPEAP.

1.1 Amidas de Ácidos Graxos (AAG).

A anandamida é um composto químico, conhecida como *N*-araquidonol etanolamida da classe de amidas graxas (AG),¹ foi identificada e caracterizada como um neuromodulador da classe dos endocanabinóides em 1992. Embora na época a atenção fosse negada devido à simplicidade da molécula^{2,3} (**Figura 1**), atualmente essas moléculas são um dos endocanabinóides mais estudados, não apenas por atividades vasorelaxantes, mas também pela sua versatilidade em atividades biológicas como analgésico, antimicrobiano, antidepressivo, anti-inflamatório e anticancerígeno.^{1, 4-6 7-9 10} Além disso, as amidas de ácidos graxos têm considerável interesse devido às suas extensas aplicações em lubrificantes, surfactantes, cosméticos, detergentes e outras indústrias afins.¹¹

Figura 1 – Estrutura da anandamida.



1.2 Obtenção de AG.

As AG podem ser sintetizadas a partir de um de ácido graxo ou éster graxo com um derivado de alcanolamina na presença de um catalisador heterogêneo¹² ou enzimático,¹³⁻¹⁵ nesses casos, a reação normalmente envolve duas etapas em altas temperaturas¹⁶⁻¹⁸ com a formação incompleta do produto, o que aumenta o custo de produção e consequentemente, exigem mais etapas de purificação. Lopes et al (2010) relataram a formação de amidas graxas catalisada por metóxido de sódio a partir do ricinoleato de metila na presença de pirrolidina, piperidina e etanolamina, entretanto, seus rendimentos não ultrapassaram 65% de conversão. Uma alternativa para obtenção de amidas graxas é a síntese direta a partir do ácido carboxílico do respectivo triglicerídeo.¹⁹ Araújo et al (2018), observaram que reações de aminólise direta do óleo de *Oenocarpus Bataua* podem ser catalisadas por óxido de alumínio (Al_2O_3 '5-10%') com rendimentos de 90-98% em 12-24 h de reação.

1.3 Aplicação da biocatálise nas sínteses orgânicas.

O conceito de química verde tem se intensificado em busca de metodologias sintéticas sustentáveis, eficientes e seguras; um exemplo importante é a catálise enzimática que tem mostrado pesquisas interessantes.^{11, 20} As reações promovidas por enzimas podem ocorrer em condições brandas de pH e temperatura, assim como impedem a formação de subprodutos indesejáveis no final do processo reacional, evitando a purificação e a geração de gastos adicionais na obtenção dos produtos.¹⁹

Além dessas vantagens da aplicação de enzimas na síntese química, destacam-se características como alta atividade catalítica, alta quimio, regio e estereosseletividade.²⁰

1.4 Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*).

O interesse medicinal em produtos derivados de plantas superiores aumentou significativamente em todo o mundo. A *Bertholletia excelsa* popularmente conhecida como “Castanha do Brasil”, são formadas por uma grande árvore de floresta tropical da família *Lecythidaceae* que cresce em toda a bacia Amazônica da América do Sul,²¹ A amêndoa consiste em 60-70% de gordura, 15-20% de proteína (boa qualidade biológica), vitaminas lipossolúveis (A, E) e minerais (Ca, Fe, Zn, Na, K e Se).²² Nos últimos 25 anos, foi demonstrada a atividade anti-inflamatória e antioxidante²³ do óleo de *Bertholletia excelsa* (Figura 2).²⁴⁻²⁶

De acordo com os achados de nosso estudo, ainda não existem estudos prévios sobre AG de óleo de castanha do Brasil (OCB) que tenham relatado atividade antioxidante contra radicais DPPH e anti-inflamações, também evidenciamos o desenvolvimento de uma metodologia eficiente, direta e sem solventes, que usou o Amano Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) como catalisador enzimático do óleo de *Bertholletia excelsa*.

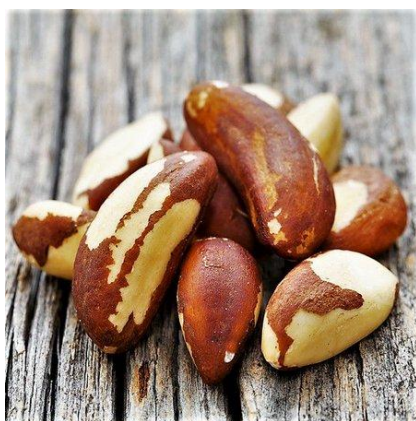


Figura 2. Ilustração de Castanha do Brasil (<https://www.jardimexotico.com.br/castanha-do-para-ou-castanha-do-brasil>)

2.1 GERAL

- Obter amidas graxas a partir do óleo de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) através de síntese enzimática;
- Avaliar atividade anti-inflamatória das amidas graxas obtidas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Sintetizar diretamente do óleo de Castanha do Brasil (**OCB**) as amidas graxas (**AG**) usando o Amano Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) como catalisador enzimático;
- Desenvolver uma metodologia eficiente e sem solventes para a obtenção das **AG**;
- Caracterizar as **AG** e os **EEAG** obtidos, através de técnicas espectroscópicas como: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear de C^{13} (RMN C^{13});
- Verificar atividades antioxidantes das **AG** e do **OCB** contra radicais de DPPH;
- Relatar as atividades anti-inflamatórias das **AG** contra edema de pata induzido em ratos *Wistar*.

3.1 Reagentes e Solventes

A etanolamina (99,5%) foi comprada da Sigma-Aldrich, Amano Lipase da *Pseudomonas fluorescens* (20.000 U/g) foi adquirida da Sigma-Aldrich (CAS nº 9001-62-1). O hexano (98%) foi adquirido da Synth (SP, Brasil) e o etanol (99%) foi comprado da Solven (SP, Brasil). O clorofórmio deuterado foi comprado do Laboratório de Isótopos de Cambridge.

3.2 Transesterificação do Óleo de Castanha do Brasil (OCB) por catálise enzimática.

A catálise enzimática do éster etílico a partir do óleo foi realizada em frascos de erlenmeyer contendo 150 mg (154 µL) de OCB, 475 µL de etanol e 15 mg de LPF. As misturas foram incubadas a 32°C num agitador orbitalar com 130 rpm (LUCADEMA). Depois de 24 h, a reação foi completada, a mistura reacional foi filtrada, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e o solvente foi removido à pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica em gel com uma mistura de n-hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e caracterizada usando análise de CG-EM.²⁷

3.3 Procedimento geral da reação de aminólise dos triglicerídeos do OCB.

A reação de amidação foi realizada entre a etanolamina (3 mL ~ 2,166 g) e OCB (1,0 mL) à concentração variada de catalisador (LPF) sob agitação magnética (300 rpm, $40 \pm 2^\circ$ C) em 24 ou 96 h. Após este período, a enzima foi filtrada e lavada com hexano (3 x 1 mL). O filtrado foi evaporado à baixa pressão e purificado diretamente por cromatografia em coluna de sílica em gel, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2) como eluente.

3.4 Animais usados na análise.

Foram utilizados ratos *Wistar* do Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica do Laboratório de Zootecnia (CEMIB) da Universidade de Campinas (Unicamp) com 21 dias de idade em período de ambiência, agrupados em cinco animais por gaiola de polietileno, sob condições controladas de temperatura ($21 \pm ^\circ\text{C}$), livre acesso a alimentos e água *ad libitum*, e ciclos claro/escuro de 12 horas.

3.5 Teste de toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda seguiu o protocolo de Diretriz 423 (OECD, 2002). Animais machos pesando entre 300 ± 30 g foram separados aleatoriamente em quatro grupos ($n = 3$) e tratados com: **Veículo** (0,5 ml/animal); **AG20** (20 mg/kg); **AG40** (40 mg/kg); **OCB100** (100 mg/kg de óleo de Castanha do Brasil).

A presença de mortalidade associada aos tratamentos determinou a necessidade de testes subsequentes (24 h depois), com uma dose igual ou maior que a anterior OEDC (2001). Observações comportamentais foram realizadas de acordo com a triagem toxicológica, em que se atentou às alterações na atividade motora, contorções abdominais, cauda de Straub, convulsão, defecação, tremor vocal, força de preensão, irritabilidade, micção, olhos (aguado, exoftálmico), piloereção, postura (ataxia, perda de reflexos), ptose palpebral, resposta ao toque, resposta ao estímulo sonoro, salivação, tremor, outros comportamentos atípicos e morte. Durante às primeiras 24 h houve observações de frações em diferentes momentos: 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. Após 24 h, foi coletado o sangue dos animais para avaliação bioquímica e acompanhado o comportamento até o 14º dia.

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. Para as comparações múltiplas entre os grupos experimentais, análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, os resultados com níveis de significância de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O programa estatístico utilizado foi o Prism (versão 7.0).

3.7 Medição da Absorção de Amostras e Controle.

Alíquotas de 0,3 mL de soluções metanólicas foram retiradas das concentrações de: 250; 125; 62,5 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e adicionadas a 2,7 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mmol.L^{-1} . Após 30 minutos a absorbância foi medida em um aparelho espectrofotômetro UV-Vis com 516 nm de comprimento de onda (três vezes). Uma solução metanólica de ácido ascórbico foi utilizada como controle positivo nas condições avaliadas e como controle negativo 0,3 mL de cada concentração da amostra e ácido ascórbico em 2,7 mL de metanol.

A partir da curva de calibração e dos valores de absorbância em 30 minutos para cada concentração testada, as porcentagens de DPPH restantes foram (%DPPHrem) de acordo com a seguinte equação:

$$\%DPPH_{rem} = \frac{[DPPH]_{t=30min}}{[DPPH]_{t=0min}} \times 100\%$$

[DPPH]_t = 30 min corresponde à concentração de DPPH após a reação com a amostra no tempo de 30 minutos, [DPPH]_t = 0 min corresponde à concentração inicial do DPPH (40 µg.mL⁻¹). A quantidade necessária da amostra para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (CE50%) foi determinada por meio de regressão linear no programa SPSS, relacionando-se em abscissa com a concentração da amostra ou ácido ascórbico e a ordenada % DPPHrem.

3.8 Avaliação cinética da degradação do DPPH contra amostra e ácido ascórbico.

Alíquotas de 0,3 mL da solução metanólica de cada amostra na concentração de 250 µg.mL⁻¹ foram adicionadas em 2,7 mL de DPPH 0,1 mmol.L⁻¹ e a absorbância foi determinada em 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos após o início da reação. Para cada concentração foi utilizado um branco com 0,3 mL da amostra em 2,7 mL de metanol e ácido ascórbico como controle positivo na concentração de 250 µg.mL⁻¹ nas mesmas condições.

3.9 Análises

3.9.1 Análise de CG-EM

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em um aparelho de marca Shimadzu/CG 2010 acoplado a um auto-injetor Shimadzu/AOC-5000 (Figura 3) e um detector de impacto de feixe de elétrons (Shimadzu MS2010 Plus) (70 eV), equipado com coluna DB-5MS de sílica fundida (Agilent J & W Avançado 30 mx 0,25 mm x 0,25 mm) (65 kPa). Os parâmetros foram: razão de separação 1:15, Hélio como gás de arraste, volume de injeção de 1,0 mL, temperatura do injetor: 250 °C, temperatura do detector a 270 °C, temperatura inicial da coluna: 100 °C, permanecendo por 2 min, Taxa de aquecimento a partir de 6 °C/min a 280 °C, permanecendo por 5 min. O tempo total de análise foi de 37 min.

A identificação dos ésteres de ácidos graxos foi identificada pela comparação do espectro de fragmentação com aqueles contidos na biblioteca do CG-EM (banco de dados EM, NIST 5.0).²⁸



Figura 3. Cromatógrafo acoplado ao Espectrômetro de Massas SHIMADZU – CG-EM.

3.9.2 Análise de RMN de C^{13}

As análises de RMN de C^{13} foi pelo espectrômetro Agilent 400 MHz (Figura 4) com $CDCl_3$ como solventes, e TMS como padrão interno. Os desvios químicos são dados em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.



Figura 4. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – 400 MHz, Agilent.

4.1 Síntese das amidas graxas (AG).

Para otimizar a produção de AG, foram realizados experimentos iniciais com o uso de Amano Lipase da *Pseudomonas fluorescens* (10%) e os resultados estão resumidos na **Tabela 1**. A reação inicial foi realizada com 10% de lipase usando 3 equiv. de etanolamina como doador de amina, a aminólise direta usando a lipase de LPF forneceu a AG desejada em 68% de conversão em 24 h (**Tabela 1, Reação 1**). Quando as reações foram concluídas às 96 h, a conversão da reação aumentou para 86% (**Tabela 1, Reação 2**). A reação de amidação do triglicerídeo do óleo de *Bertholletia Excelsa* foi realizada na ausência do LPF em 96 h com agitação magnética (300 rpm; 40 ° C), o produto amida foi formado em 17%, após purificação por coluna cromatográfica com sílica em gel (**Tabela 1, Reação 3**).

A escolha do solvente pode influenciar na atividade enzimática, em alguns casos melhorando a seletividade, a quimio-seletividade e o rendimento da reação, em outros, atuando como inibidor da atividade enzimática.^{29, 30} Neste sentido, a reação de amidação direta de OCB catalisada por LPF foi realizada na presença de hexano (1,0 mL) (**Tabela 1, Reação 5**), com o objetivo de comparar os valores de rendimento das amidas graxas obtidas em condições sem solventes. A reação com hexano como solvente originou um rendimento de 95% às 96 h (**Tabela 1, entrada 5**).

No entanto, resultados semelhantes foram obtidos em condições sem solventes (rendimento de 91%), utilizando 15% de lipase (**Tabela 1, Reação 4**). O objetivo do hexano foi solubilizar os componentes da reação (óleo e amina), permitindo que o meio reacional fosse mais homogêneo, facilitando o contato com o catalisador (lipase), consequentemente aumentando a taxa de reação. Os solventes apolares, como o hexano, também podem atuar na preservação da atividade enzimática, pois os solventes hidrofóbicos com maiores valores de log P não têm a tendência de remover as moléculas de água da superfície da enzima que é essencial para as lipases.^{31, 32} Em geral, o Amano Lipase de *Pseudomonas fluorescens* apresentou uma boa atividade catalítica na reação de amidação sem solventes.

Tabela 1. Otimização da amidação dos triglicerídeos de *Bertholletia excelsa* (óleo de castanha do Brasil).³³

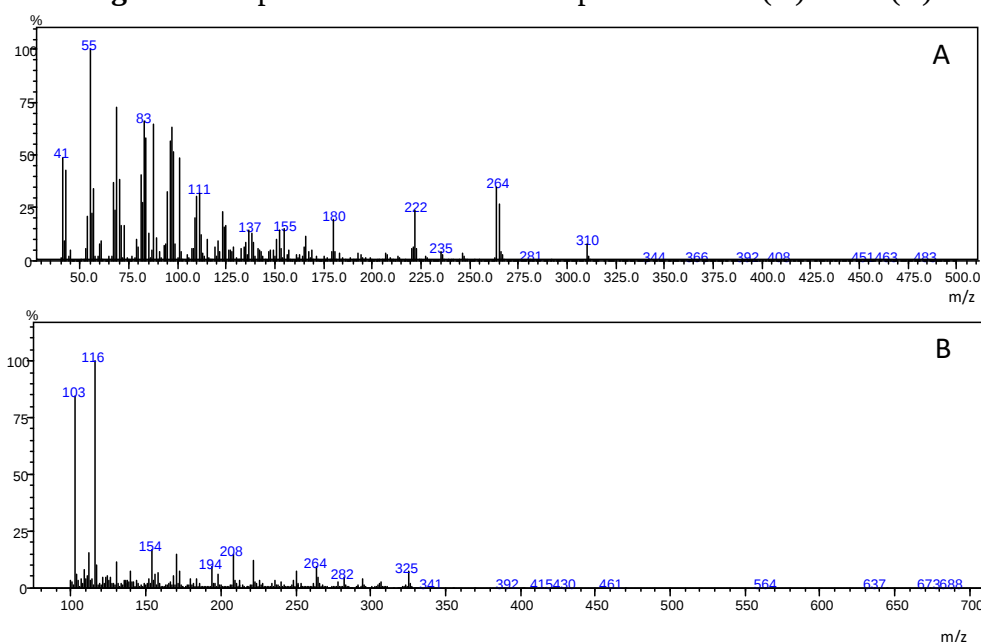
REAÇÃO	TEMPO	LIPASE(%)	RENDIMENTO %
1 ^a	24	10	68
2 ^a	96	10	86
3 ^a	96	-	17
4 ^a	96	15	91
5 ^b	96	10	95 ^b

^a Aminólise direta sem solventes. ^b Aminólise direta com hexano.

4.2 Análise de CG-EM e composição química do OCB.

Por análises de CG-EM (**Tabela 2** e **Figura 5**), a composição lipídica dos ácidos graxos presentes no OCB, coletados na cidade de Mazagão - Amapá, foi predominantemente composta por ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico monoinsaturado (C18:1, ω -9) com 32% de abundância relativa, seguido pelo ácido linoleico poli-insaturado (C18:2, ω -6) (29%) e em menor expressão aparece o ácido vacênico (C18:1, ω -7) com 2%. Os outros ácidos graxos identificados na amostra de OCB foram o ácido palmítico (C16:0) com 16% de abundância relativa, seguido pelo ácido esteárico com 17%. O perfil dos ácidos graxos identificados no OCB está de acordo com o descrito na literatura.^{22,25, 34}

Figura 5 - Espectro de massa dos compostos EEAG (A) e AG (B).



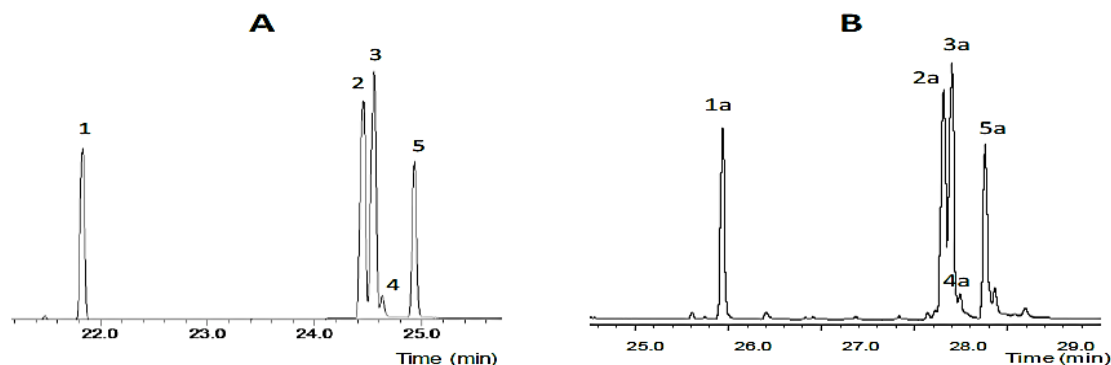
Todos os ácidos graxos foram utilizados para obtenção de seus respectivos compostos amidados pela amidação do OCB catalisada por LPF. As estruturas das AG foram caracterizadas por seus íons característicos de fragmentação em 101 m/z (pico base) e 114 m/z, resultantes do rearranjo de McLaffery e γ -clivagem¹, respectivamente, como pode ser observado na **Figura 5**. Para o composto de amida (**3a**). Diferentemente do que foi observado para os espectros de massa das estruturas dos ésteres etílicos, que apresentam como pico base o íon fragmentado em 55 m/z e menos abundante que o íon relacionado à perda da porção etóxido (264 m/z).

Tabela 2 - Composição de éster etílico de amostras derivadas do OCB determinados por análise CG-EM^a.

Ácido Graxo ^b	Pico (min.)	Fórmula Molecular ^a	Concentração Relativa ^b (%)
Palmítico	1	C16:0	19
Linoleico	2	C 18:2 ω -6	29
Oleico	3	C 18:1 ω -9	32
Vacênico	4	C 18:1 ω -7	2
Esteárico	5	C 18:0	17
Σ Saturado	—	—	36
Σ Insaturado	—	—	34
Σ Polinsaturado	—	—	29

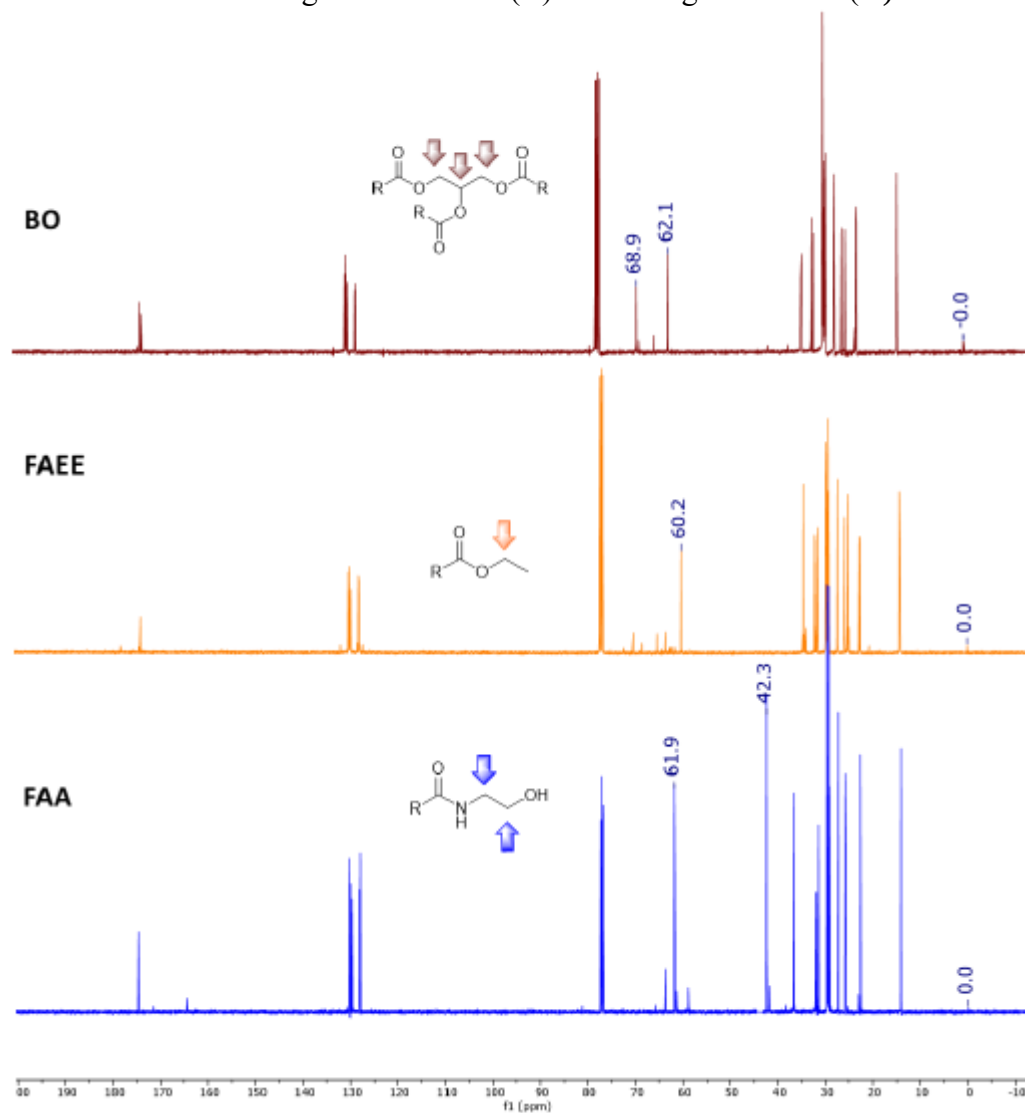
^aBanco de dados do EM (NIST 5.0); ^b% do ácido graxo correspondente ao EEAG.

Figura 6 – Cromatogramas gasosos (CG) de éster etílico derivado de *Bertholletia excelsa* por catálise de CAL-B.



Todas as substâncias deste estudo (OCB, EEAG e AG) mostraram sinais de RMN de C^{13} muito semelhantes, devido a não alteração da cadeia alquílica presente no material de partida (OCB) e permanência nos produtos obtidos. A principal diferença no espectro de RMN de C^{13} do OCB (**Figura 7**) entre os demais (EEAG e AG) é a presença de dois sinais na região de 62,1 e 68,9 ppm característicos de carbonos de glicerol, enquanto que no espectro de RMN de C^{13} do EEAG o sinal característico do carbono alquílico $-CH_2$ da mistura de éster, após a reação de transesterificação do BNO, aparece em 60,2 ppm. No espectro de RMN de C^{13} da mistura de AG foi possível observar duas características de $-N-CH_2$ e $-CH_2-OH$ em 42,3 e 61,9 ppm, respectivamente. A ausência dos sinais de glicerol também corrobora com a formação da nova substância a partir do óleo de Castanha do Brasil por catálise enzimática (**Figura 7**).³⁵

Figura 7 – Espectro de RMN de C^{13} (100 MHz, $CDCl_3$) do óleo de castanha do Brasil ‘OCB’ (A), ésteres etílicos de ácidos graxos ‘EEAG’ (B) e amidas graxas ‘AG’ (C).

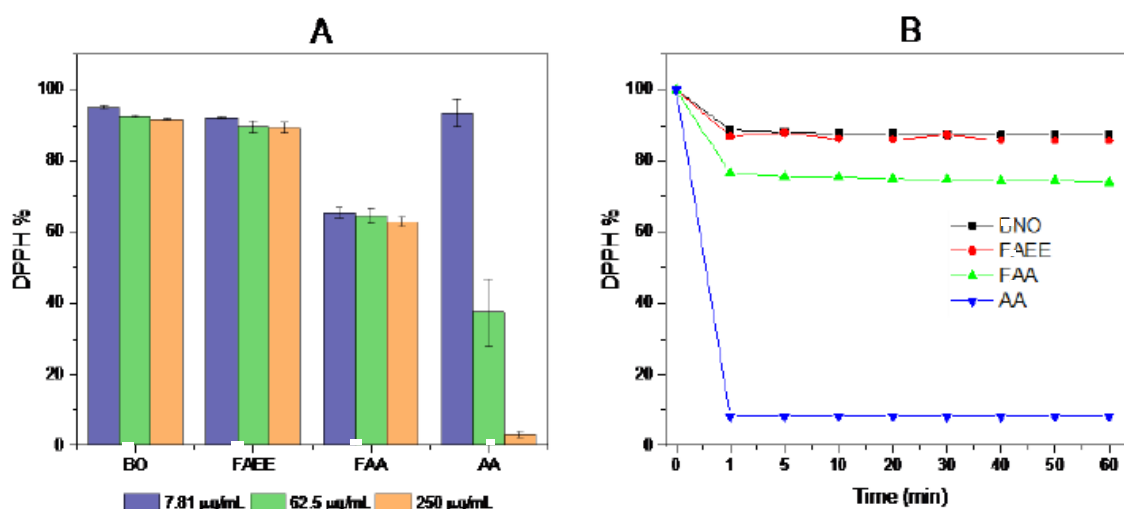


4.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do produto secundário da amida foi determinada pelo método de eliminação do radical α,α -difeníl-*p*-picril-hidrazila (DPPH) seguindo o protocolo de Borges et. al. (2018).³⁶ Todas as experiências foram feitas em triplicata. As amidas graxas do OCB também foram testada na atividade antioxidante *in vitro* contra radicais DPPH. A inibição do radical DPPH não mostrou ser dependente da concentração testada e a percentagem de inibição não aumentou linearmente com o aumento da concentração, no entanto, em comparação com o padrão de ascorbato, o valor foi bastante significativo (**Figura 8**). As isobutilhidroxiamidas graxas contendo um grupo etóxi também foram testadas quanto à

atividade de inibição do DPPH, mas foram inativas nos efeitos inibitórios sobre o radical DPPH em concentrações de 50 μM .³⁷ Um estudo de Tanvir et. al. 2016¹⁰ relatou atividade antioxidante moderada para derivados de amidas de cadeia longa, como 7-Octadecanamida e 9,12-Octadecandienamida como metabólitos de duas cepas identificadas como *Nocardia Caishijiensis* (SORS 64b) e *Pseudonocardia carboxydivorans* (AGLS 2) isoladas como endófitas de *Sonchus oleraceus* e *Ageratum conyzoides*, respectivamente; entretanto, os achados de nosso estudo permanecem únicos, uma vez que nenhum estudo prévio de AG do OCB relatou atividade antioxidante contra radicais DPPH. Como o teste com DPPH mostra a atividade de redução, isso não exclui a possibilidade de apresentarem atividade antioxidante. Em contraste, o óleo de castanha do Brasil e os compostos de EEAG não tiveram efeitos de inibição do radical DPPH (**Figura 8**). Isto demonstra a influência do grupo amina (etanolamina derivada) na atividade de inibição do DPPH.

Figura 8 – (A) Atividade antioxidante *in vitro* de OCB, EEAG, AG e ácido ascórbico (AA) na inibição do DPPH (%). (B) Cinética de degradação antioxidante em DPPH (%).



4.4 Atividade anti-inflamatória.

O efeito anti-inflamatório do OCB e das AG (**Figura 9**) foi avaliado pelo método de edema de pata induzido por carragenina.³⁸ O aumento de volume das patas dos animais foi realizado em intervalos de 1h, 2h, 3h e 4h de acordo com a agressão causada pelo agente filogístico (carragenina 1%) nos animais produzindo edema na pata.³⁹ Durante a primeira hora foi possível observar efeito anti-inflamatório significativo ($p < 0,05$) dos grupos de tratamento, principalmente os com a Indometacina (10mg/kg) e com AG (40 mg/kg), durante o tempo de análise da formação do edema, observou-se que todos os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente a evolução do edema ($p < 0,001$ A análise final (4 h) que não

apresentou diferença significativa entre os grupos OCB e AG, entretanto, os grupos AG demonstraram maior potência anti-inflamatória, visto que foram usadas dosagens menores que no grupo OCB.

O óleo de castanha do Brasil demonstrou ter ácidos graxos poli-insaturados na constituição química, principalmente a presença de ácido linoleico que apresenta propriedades anti-inflamatórias para diferentes modelos experimentais de inflamação,^{39, 40} esse fato pode ser observado neste estudo pelo tratamento com grupos OCB. Os mecanismos que podem explicar a razão da inibição da produção de citocinas pelo ácido graxo são desconhecidos, mas podem estar relacionados à inibição da cascata inflamatória ao nível da ciclooxigenase (COX) e da lipoxigenase (LOX).⁴¹

A composição do ácido graxo poli-insaturado tem sido associada à melhora dos parâmetros bioquímicos, principalmente lipídico, glicídico e perfil inflamatório,^{28, 42} neste estudo não foi observada diferença significativa entre os parâmetros bioquímicos (**Tabela 3**) que mostram os efeitos tóxicos no fígado e ovelhas, considerando os valores normais para transaminases (AST e GOT), bem como creatinina e uréia.⁴³ Entretanto, foi observada uma redução significativa dos níveis de triglicerídeos ($p < 0,05$) para os grupos de tratamento com AG (20 e 40 mg/kg).

Os resultados demonstram que AG do óleo de *Bert. Excelsa* podem ser produzidas em excelentes rendimentos por lipase de *P. fluorescens* sob condições brandas, resultando em uma amida graxa atrativa com atividade anti-inflamatória.

Figura 9 – Ação anti-inflamatória do óleo de castanha do Brasil (OCB 100mg/kg), Amidas graxas (AG 20 e 40 mg/kg) e Indometacina (Indo 10 mg/kg) para edema de pata em ratos *Wistar*. Os objetos de valor representam a média±desvio padrão (n = 5/grupo). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,0, e descrevem os resultados estatisticamente significativos na comparação com o grupo de veículos.

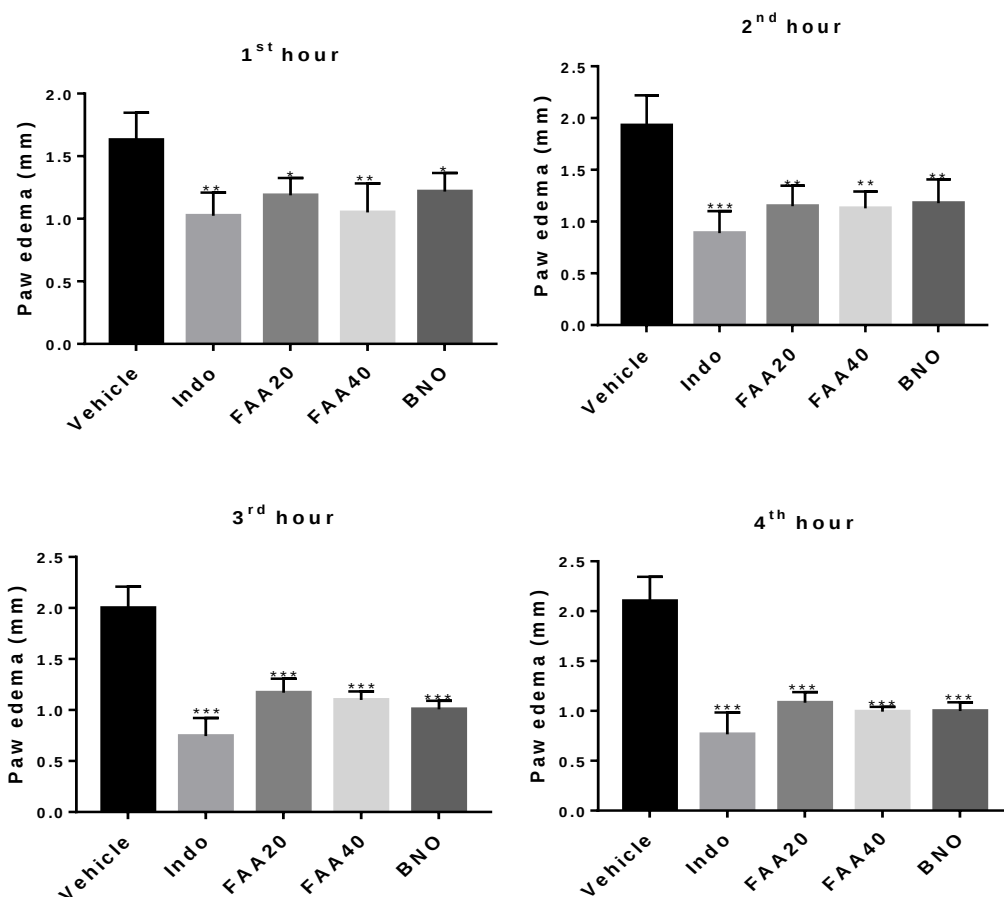


Tabela 3 – Efeito do tratamento com óleo de castanha do Brasil (OCB 100mg/kg) e amidas graxas (AG 20 e 40 mg/kg) em parâmetros bioquímicos de ratos *Wistar*.

PARÂMETROS	VEÍCULO	AAG20	AAG40	OCB
Glicose (mg/dl)	134,4±12,69	129,7±9,28	124,6±11,30	126,1±9,79
Ureia (mg/dl)	38,57±2,41	44,57±7,65	37,87±6,11	41,21±6,91
Creatinina (mg/dl)	0,25±0,05	0,22±0,04	0,22±0,01	0,21±0,02
AST (U/dl)	117,4±2,66	112,2±7,81	117,3±23,09	109,1±15,12
ALT (U/dl)	39,0±7,6	48,3±10,9	35,2±3,80	43,7±9,2
Triglicerídeos (mg/dl)	131,3±22,03	74,1±14,57*	87,1±25,74*	122,1±11,8
Colesterol Total (mg/dl)	71,1±7,70	73,63±9,75	66,69±18,87	69,21±12,1

Os objetos de valor representam a média ± desvio padrão (n = 5/grupo). #p<0,05 descreve os resultados estatisticamente significativos em comparação com o grupo de veículos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.

Diante da pesquisa realizada foi possível notar que as amidas graxas (AG) podem ser obtidas via aminólise direta utilizando lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) originando rendimentos acima de 90%. Além disso, as reações foram obtidas de forma sustentável, eficientes e seguras, estando dentro dos limites da química verde e contribuindo com menos subprodutos agressivos à natureza.

As atividades antioxidantes das amidas graxas oriundas do óleo de castanha do Brasil contra DPPH, assim como sua atividade antiinflamatória, forneceram dados ainda não explorados pela comunidade científica, o que trouxe mais uma contribuição para a exploração dos derivados do óleo de uma planta do norte do Brasil (*Bertholletia excelsa*).

Portanto, há a necessidade de continuar com os estudos das amidas provenientes do óleo da castanha uma vez que esse material já é citado como responsável por muitas funções biológicas e seus derivados podem fornecer atividades ainda mais promissoras.

1. LOPES, C. R. *et al.* Síntese de novas amidas graxas a partir da aminólise de ésteres metílicos. **Química Nova**, Rio Grande do Sul, v. 33, n. 6, p. 1335-1341, 21 maio 2010. Disponível em: http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No6_1335_21-AR09804.pdf.
2. EZZILI, C.; OTRUBOVA, K.; BOGER, D. Fatty acid amide signaling molecules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Califórnia, v. 20, p. 5959-5968, jun./out. 2010. BMCL Digest. DOI: doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.048. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X10011716?via%3Dihub.
3. KIMBALL, F. *et al.* Optimization of α -ketooxazole inhibitors of fatty acid amide hydrolase. **Journal Medicinal Chemistry**, Califórnia, v. 51, n. 4, p. 937-947, 5 fev. 2008. DOI: doi.org/10.1021/jm701210y. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm701210y>.
4. D'OCA, C. D. R. M. *et al.* Synthesis and antituberculosis activity of new fatty acid amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Rio Grande do Sul, v. 20, p. 5255-5257, 1 set. 2010. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.06.149. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X10009364?via%3Dihub.
5. DOS SANTOS, D. S. *et al.* Antiproliferative activity of synthetic fatty acid amides from renewable resources. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Rio Grande do Sul, v. 23, p. 340-347, 15 jan. 2015. DOI: doi.org/10.1016/j.bmc.2014.11.019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X14008062?via%3Dihub>.
6. MATA-SANTOS, T. *et al.* Toxocara canis: larvicidal activity of fatty acid amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Rio Grande do Sul, v. 26, p. 739-741 1 fev. 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X16300026?via%3Dihub>.
7. BURSTEIN, S.; ZURIER, R. Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, Massachusetts, v. 11, n. 1, p. 109-119, 06 fev. 2009. DOI: doi.org/10.1208/s12248-009-9084-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-009-9084-5>.
8. DE PETROCELLIS, L.; MELCK, D.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Endocannabinoids and fatty acid amides in cancer, inflammation and related disorders. **Chemistry and Physics of Lipids**, Napoli, v. 108, n. 1-2, p. 191-209, 12 jun. 2000. DOI: doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00196-1. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308400001961?via%3Dihub>.
9. WITKAMP, R. Fatty acids, endocannabinoids and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, Wageningen, v. 785, p. 96-107, 15 agos. 2016. DOI:

doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.051. Disponível em:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001429991530220X?via%3Dihub.

10. TANVIR, R. *et al.*. Rare actinomycetes *Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydvorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation. **Microbiological Research**, Punjab, v. 185, p. 22-35, abr. 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.micres.2016.01.003. Disponível em:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501316300039?via%3Dihub.

11. KHARE, S.; KUMAR, A.; KUO, T. Lipase-catalyzed production of a bioactive fatty amide derivative of 7,10-dihydroxy-8(*E*)-octadecenoic acid. **Bioresource Technology**, Nova Delhi, v. 100, p. 1482-1485, fev.2009. DOI: doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.011. Disponível em:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408006834?via%3Dihub#!.

12. TAMADDON, F.; ABOEE, F.; NASIRI, A. ZnO nanofluid as a structure base catalyst for chemoselective amidation of aliphatic carboxylic acids. **Catalysis Communications**. Yazd, v. 16, p. 194-197, 30 nov.2011. DOI: doi.org/10.1016/j.catcom.2011.09.023. Disponível em:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1566736711003645?via%3Dihub#!.

13. LIMA, R. N.; PORTO, A. L. M. Biocatalytic aminolysis of ethyl (S)-mandelate by lipase from *Candida antarctica*. **Catalysis Communications**, São Paulo, v. 100, p. 157-163, set. 2017. DOI: doi.org/10.1016/j.catcom.2017.06.020. Disponível em:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1566736717302510?via%3Dihub.

14. LIMA, R. *et al.* Fast synthesis of amides from ethyl salicylate under microwave radiation in a solvent-free system. **Royal Society Chemistry Advances**, São Paulo, v. 7, p. 56566-56574, 15 dez. 2017. DOI: 10.1039/C7RA11434F. Disponível em:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/RA/C7RA11434F#!divAbstract>.

15. DE ZOETE, M. C. *et al.* Lipase-catalysed ammoniolysis of lipids. A facile synthesis of fatty acid amides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Delft, v. 1, p. 109-113, jun. 1996. DOI: doi.org/10.1016/1381-1177(95)00012-7. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1381117795000127>.

16. KUMAR, P.; KUMAR, A.; SONG, Z.-H. Structure-activity relationships of fatty acid amide ligands in activating and desensitizing G protein-coupled receptor 119. **European Journal of Pharmacology**, Kentucky, v. 723, p. 465-472, 15 jan. 2014. DOI: doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.044. Disponível em:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299913008054?via%3Dihub.

17. KUMAR, D.; ALI, A. Direct synthesis of fatty acid alkanolamides and fatty acid alkyl esters from high free fatty acid containing triglycerides as lubricity improvers using heterogeneous catalyst. **Fuel**, v. 159, p. 845-853, 1 nov. 2015. DOI: doi.org/10.1016/j.fuel.2015.07.046. Disponível em:
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236115007371?via%3Dihub.

18. KUMAR, D.; ABIDA, K. M.; ALI, A. Aminolysis of triglycerides using nanocrystalline nickel doped CaO as an efficient solid catalyst. **Royal Society Chemistry Advances**, Patiala,

v. 6, ed. 71, p. 66822-66832, 30 jun. 2016. DOI: 10.1039/C6RA12114D. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/RA/C6RA12114D#!divAbstract>.

LOPES, C. R. et al. Síntese de novas amidas graxas a partir da aminólise de ésteres metílicos. **Química Nova**, Rio Grande do Sul, v. 33, n. 6, p. 1335-1341, 21 maio 2010. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No6_1335_21-AR09804.pdf.

19. Araujo, P. H. F. de et al. Direct and solvent-free aminolysis of triglyceride from *Oenocarpusbataua* (patawa) oil catalyzed by Al₂O₃. **Catalysis Letters**, Amapá, v. 148, ed. 3, p. 843-851, 2 fev. 2018. DOI: doi.org/10.1007/s10562-018-2306-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10562-018-2306-7>.

Araujo, P. H. F. de et al. Direct and solvent-free aminolysis of triglyceride from *Oenocarpusbataua* (patawa) oil catalyzed by Al₂O₃. **Catalysis Letters**, Amapá, v. 148, ed. 3, p. 843-851, 2 fev. 2018. DOI: doi.org/10.1007/s10562-018-2306-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10562-018-2306-7>.

20. MOUAD, A. et al. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: a solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, São Paulo, v. 126, p. 64-68, abr. 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.01.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117716300029?via%3Dihub>.

21. JOHN, J.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, Terra Nova, v. 2, ed. 3, p. 196-209, jul. 2010. DOI: 10.1016/j.jff.2010.04.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464610000381?via%3Dihub>.

22. MUNIZ, M. et al. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. **Pharmacognosy Magazine**, Pará, v. 11, ed. 41, p. 147-151, 21 jan. 2015. DOI: 10.4103/0973-1296.149730. Disponível em: <http://www.phcog.com/article.asp?issn=0973-1296;year=2015;volume=11;issue=41;spage=147;epage=151;aulast=Pena>.

23. DONG, A.; PRESTRELSKI, S. J.; CARPENTER, J. F. Infrared spectroscopic studies of lyophilization and temperature-induced protein aggregation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Colorado, v. 84, n. 4, p. 415-424, abr. 1995. DOI: doi.org/10.1002/jps.2600840407. Disponível em: [https://jpharmsci.org/article/S0022-3549\(15\)49764-3/pdf](https://jpharmsci.org/article/S0022-3549(15)49764-3/pdf).

24. STOCKLER-PINTO, M. et al. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. **Biological Trace Element Research**, Rio de Janeiro, v. 158, ed. 1, p. 105-112, 2014. DOI: doi.org/10.1007/s12011-014-9904-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-014-9904-z>.

25. FUNASAKI, M. et al. Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. **Revista Química Nova**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 194-206, 22 jan. 2016. DOI: dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160008. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/v39n2a12.pdf>.

26. SHAHIDI, F. AND JOHN, J.A. Oxidation and protection of nuts and nut oils. In: Decker, E. A.; Elias, R. J.; McClements, D. J. **Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications**. Woodhead Publishing, Cambridge, v. 2, p. 274-305, 2010. ISBN 978-0-85709-033-1.
27. FERREIRA, I. M. *et al.* Ethylic biodiesel production using lipase immobilized in silk fibroin-alginate spheres by encapsulation **Catalysis Letters**, São Paulo, v. 147, n. 1, p. 269-280, 2017. DOI: 10.1007/s10562-016-1917-0. Disponível em: <https://bdpi.usp.br/item/002789413>.
- OECD. Acute oral toxicity: acute toxic class method, Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD Publishing**, Paris, n. 423, seção 4, p. 1-14, 2002. DOI:doi.org/10.1787/9789264071001-en. ISBN: 9789264071001 (PDF). Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en.
28. FARIA E SOUZA, B. S. *et al.* Effect of the treatment with Euterpe oleracea Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amapá, v. 90, p. 542-547, jun. 2017. DOI: doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S075333221632902X#!>.
29. FERREIRA, I. M. *et al.* Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin-alginate spheres. **Tetrahedron letters**, São Paulo, v. 55, n. 36, p. 5062-5065, 2014. DOI: doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.07.032. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004040391401185X#!>.
30. FERREIRA, I. M. *et al.* Ethylic Biodiesel Production Using Lipase Immobilized in Silk Fibroin-Alginate Spheres by Encapsulation. **Catalysis Letters**, São Paulo, v. 147, ed. 1, p. 269-280, 2016. DOI: doi.org/10.1007/s10562-016-1917-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10562-016-1917-0#citeas>.
31. ROBLES-MEDINA, A. *et al.* Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology advances**, Almeria, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009. DOI: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000445?via%3Dihub>.
32. GAGNON, M. D.; VASUDEVAN, P. T. Effects of solvent and enzyme source on transesterification activity. **Energy & Fuels**, Nova Hampshire, v. 25, n. 10, p. 4669-4674, 2011. DOI: doi.org/10.1021/ef2008776. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef2008776>.
33. CARVALHO, H. L. *et al.* A simple and efficient protocol for the knoevenagel reaction of benzylidenemalononitriles and the evaluation of the larvicidal activity on aedes aegypti. **Revista Virtual de Química**, Amapá, v. 10, p. 362-374, 2018. DOI: 10.21577/1984-6835.20180028. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v10n2a12.pdf>.
34. SERRA, J. L. *et al.* Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocols, total carotenoids and chemical composition. **Food Research International**, Maranhão, v. 116, p. 12-19, 2019. DOI:

doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.028. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918309724#!>.

35. nota In nota.

36. BORGES, R. S. *et al.* Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, Amapá, v. 26, n. 1, p. 183-195, 2018. DOI: doi.org/10.1007/s10787-017-0374-8. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10787-017-0374-8>.

37. TIAN, Jun-Mian *et al.* Characterization of isobutylhydroxyamides with NGF-potentiating activity from *Zanthoxylum bungeanum*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, Yangling, v. 26, n. 2, p. 338-342, 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X15303280#!>.

38. JIMENEZ, D. E. Q. *et al.* Silk fibroin functionalized with CuSO₄ on Knoevenagel condensation under microwave radiation. **Current Microwave Chemistry**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 131-138, 2017. DOI: 10.2174/2213335603666160809121421. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/node/144634/article>.

39. COLPO, E. *et al.* Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 459-465, 2014. DOI: doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.005. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0899900713004504>.

40. SARAIVA, R. A. *et al.* Topical anti-inflammatory effect of caryocar coriaceum Wittm (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of ethnopharmacology**, Ceará, v. 136, n. 3, p. 504-510, 2011. DOI: doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.002. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110004630>.

41. FIORUCCI, S. *et al.* Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?. **Biochemical pharmacology**, Perúcia v. 62, n. 11, p. 1433-1438, 2001. DOI: doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00747-X. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000629520100747X#!>.

42. FARIA E SOUZA, B. S. *et al.* Effect of Euterpe oleracea Mart.(Açaí) Oil on dyslipidemia caused by *Cocos nucifera* L. Saturated Fat in Wistar Rats. **Journal of medicinal food**, Amapá, v. 20, n. 9, p. 830-837, 2017. DOI: doi.org/10.1089/jmf.2017.0027. Disponível em:
<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2017.0027>.

41. CARVALHO, H. de O. *et al.* Hypoglycemic effect of formulation containing hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense* in diabetic rats induced by streptozotocin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Amapá, v. 26, n. 5, p. 634-639, 2016. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.04.004. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2016000500634&script=sci_arttext.

