



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



BIOPROSPECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DAS SEMENTES DE *Myrciaria dubia* (H.B.K.)
McVaugh DA AMAZÔNIA SETENTRIONAL

RITA DE CÁSSIA POMPEU DE SOUSA

Boa Vista -RR
JUNHO/2016

RITA DE CÁSSIA POMPEU DE SOUSA

**BIOPROSPECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DAS SEMENTES DE *Myrciaria dubia* (H.B.K.)
McVaugh DA AMAZÔNIA SETENTRIONAL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas

Coorientadores: Prof. Dr. Antonio Alves M. Filho

Pesq. Dr. Daniel Augusto Schurt

Boa Vista-RR

JUNHO/2016

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

S725d Sousa, Rita de Cássia Pompeu de.
Bioprospecção e desenvolvimento de produtos com potencial biotecnológico a partir das sementes de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh da Amazônia Setentrional / Rita de Cássia Pompeu de Sousa – Boa Vista, 2016.
135 f.: il.

Orientador: Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas.

Coorientadores: Prof. Dr. Antonio Alves M. Filho, Pesq. Dr. Daniel Augusto Schurt.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal.

1 – Biotecnologia verde. 2 – Caçari. 3 – Extratos. 4 – SAS-diagnósticos por imagem. I – Título. II – Chagas, Edvan Alves (orientador). III - Antonio Alves M. Filho (coorientador). IV – Schurt, Daniel Augusto (coorientador).

CDU – 631.52(811)

RITA DE CÁSSIA POMPEU DE SOUSA

BIOPROSPECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DAS SEMENTES DE *Myrciaria dubia* (H.B.K.)

McVaugh DA AMAZÔNIA SETENTRIONAL

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas

Coorientadores: Prof. Dr. Antonio Alves Melo Filho

Pesq. Dr. Daniel Augusto Schurt

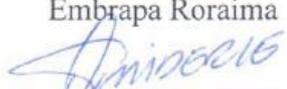
Banca examinadora



Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas
Embrapa Roraima



Pesq. Dr. Daniel Augusto Schurt
Embrapa Roraima



Pesq. Dr. Oscar José Smiderle
Embrapa Roraima



Pesq. Dr. Otoniel Ribeiro Duarte
Embrapa Roraima



Profª. Drª. Pollyana Cardoso Chagas
UFRR

Boa Vista - RR

JUNHO/2016

A Deus, minha fonte de proteção, esperança, amor e fé
que me inspira e me dá forças para levantar a cada dia.

À minha querida mãe, Francisca Batista Pompeu de
Sousa (*in memoriam*), especialmente pelos exemplos e
orientações sobre os verdadeiros caminhos e valores da
vida e aos meus filhos, Maximiliano Sousa Alves e
Nicole Sousa Bessa, meus maiores amores,
responsáveis por não desistir nunca de lutar por tudo
que é reto.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS minha fonte de luz e sabedoria.

Ao meu orientador e coorientadores pela oportunidade e confiança.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio em todas as horas.

As instituições e empresas parceiras e fomentadoras, profissionais, professores, pesquisadores, alunos e ex-alunos de todos os níveis que apoiaram e contribuíram de modo relevante.

A todos que torceram e colaboraram direto ou indiretamente para finalização dessa tese de doutorado,

Meu muito obrigado.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

SOUSA, Rita de Cássia Pompeu de. **Bioprospecção e desenvolvimento de produtos com potencial biotecnológico a partir de sementes de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh da Amazônia Setentrional**. 2016. 135f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2016.

RESUMO

A *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae, frutífera nativa da Amazônia apresenta potencial nutricional comprovado nacionalmente e internacionalmente de acordo com pesquisadores da área, sendo sua polpa o produto de maior interesse para diversos consumos. Entretanto, na extração desse produto é gerado um quantitativo efetivo de diferentes resíduos, sólidos e líquidos. Dentre estes destaca-se as sementes, possivelmente tão rica em nutrientes quanto as polpas, as quais são descartadas ainda pelas pequenas agroindústrias da região. Nesse caso, acredita-se que não são exploradas economicamente, em decorrência de nenhum ou pouco estudo de bioprospecção realizados até o momento, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza. Há escassez de informações mais detalhadas que propiciem sua identificação, caracterização, preservação, condições de transporte e armazenamento, principalmente da amostra antes da análise. Portanto, na presente tese objetivou-se realizar estudos de bioprospecção tecnológica para descrição, caracterização e verificação do potencial agroalimentar dessas sementes, com vistas a confirmação da viabilidade de produção industrial ou comercial como produto ou processo, a partir de pelo menos um atributo funcional desse componente. Os resultados obtidos são satisfatórios. Estão apresentados em seis capítulos, formatados em artigos de acordo com os objetivos estabelecidos. São os seguintes: 1– Description and automated seed morphostructural characterization of *M. dubia* (Kunth) McVaugh: diagnosis by image; 2– Bioprospecting technology applied in caçari seeds how to benefit bioproducts agrifood development; 3– Sais minerais em extrato aquoso de coprodutos da *M. dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae; 4– Phytotoxicity of extracts of *M. dubia* (Kunth) McVaugh bioprocessed in vegetable crop sensitive to allelochemicals; 5– Potencial biotecnológico de extrato desenvolvido a base de sementes dos frutos de caçari: atividade acaricida in vitro e 6 – Effect of some myrtaceae plants extracts on *Callosobruchus maculatus* in grass legume. As técnicas, métodos e aplicações laboratoriais utilizadas possibilitaram a verificação do potencial agroalimentar das sementes e identificação de fontes de compostos com potencial para biotecnologia verde, sendo possível sua replicação para estudos de outras espécies.

Palavras-chave: Biotecnologia verde, caçari, extratos, SAS-diagnósticos por imagem.

SOUSA, Rita de Cássia Pompeu de. **Bioprospecting and product development with biotechnological potential from *Myrciaria dubia* seeds (H.B.K.) McVaugh the Northern Amazon.** 2016. 135f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Roraima, Boa Vista, 2016.

ABSTRACT

The *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae, Amazonian native fruit has proven nutritional potential nationally and internationally according to researchers in the field, and the pulp product of most interest to many consumption. However, the extraction of this product is generated an effective quantity of different waste, solid and liquid. Among these stands out the seed, possibly as much nutrient-rich pulps, which are still discarded by small agro region. In this case, it is believed that they are not exploited economically, due to no or little bioprospecting study performed to date, with a view to its industrial application or otherwise. There is a shortage of more detailed information that facilitate their identification, characterization, preservation, transport and storage conditions, especially the sample before analysis. Therefore, in this thesis aimed to conduct studies of technological bioprospecting for description, characterization and verification of the agri-food potential of these seeds, in order to confirm the viability of an industrial or commercial production as a product or process, from at least one functional attribute of this component. The results obtained are satisfactory. They are presented in six chapters, formatted articles according to the established objectives. They are as follows: 1– Description and automated seed morphostructural characterization of *M. dubia* (Kunth) McVaugh: diagnosis by image; 2– Bioprospecting technology applied in caçari seeds how to benefit bioproducts agrifood development; minerals in aqueous extract of the coproducts *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae; 4– Phytotoxicity of extracts of *M. dubia* (Kunth) McVaugh bioprocessed in vegetable crop sensitive to allelochemicals; 5– Acaricides activity extract a seed base of fruit caçari and 6 – Effect of some myrtaceae plants extracts on *Callosobruchus maculatus* in grass legume. The techniques and methods used laboratory applications allowed the verification of seeds and agro-food potential of compounds with potential sources of identification green biotechnology, it being possible for replication studies in other species.

Keywords: Green Biotechnology, caçari, extracts, SAS-diagnostic imaging.

LISTA DE FIGURAS

<p>CAPÍTULO I – DESCRIPTION AND AUTOMATED SEED MORPHOSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh: DIAGNOSIS BY IMAGE.....</p>	50
<p>Figure 1. Seeds of <i>M. dubia</i> (A) samples selected for morphoanatomical characterization and (B) enlarged seed, showing their dimensions to be measured.....</p>	53
<p>Figure 2. Tray made on transparent film (19 cm x 26.5 cm x 1 cm) containing samples of seeds of <i>M. dubia</i> in the measuring modules for analysis in SAS.....</p>	54
<p>Figure 3. Samples of <i>M. dubia</i> seeds distributed on the detail screen of the SAS.....</p>	54
<p>Figure 4. View of external and internal surface of <i>M. dubia</i> seed in longitudinal section.....</p>	56
<p>Figure 5. Analysis form: geometry, topology LBP and LBP histogram seeds of <i>M. dubia</i> in natura obtained by image selection shown left in the SAS screen.....</p>	56
<p>Figure 6. Analysis hilum color obtained in <i>M. dubia</i> seed-samples (in nature) in the SAS screen.....</p>	57
<p>Figure 7. Texture analysis of variance obtained from seeds of wet <i>M. dubia</i> (in nature) in the SAS screen.....</p>	58
<p>CAPÍTULO II – BIOPROSPECTING TECHNOLOGY APPLIED IN CAÇARI SEEDS (<i>Myrciaria dubia</i>) HOW TO BENEFIT BIOPRODUCTS AGRIFOOD DEVELOPMENT.....</p>	63
<p>Figure 1. Geometry, topology and histogram LBP extracted in the selection of images of wet ripe caçari seeds (A); pre-dried ripe (B); and pre-dried ripe peeled from the protective film (grains) (C).....</p>	69
<p>Figure 2. Geometry, topology and LBP histogram extracted by the image selection wet seeds of semi-mature caçari (A) and peeled semi-mature seeds (grains) (B).....</p>	70
<p>Figure 3. Comparative analysis of the treatments applied caçari seeds related to geometrical dimensions in centimeters (cm) of seven variables selected in the SAS (A) and benchmarking between automated method (SAS) and caliper / manual method (B).....</p>	71
<p>Figure 4. Mineral composition (A) in SBCP and SBSP and pigment content in seeds in</p>	

nature and leaves correlated to the levels found in the fruits of caçari at different stages (B).....	73
Figure 5. Spectrums of the powder (A) and oil (B) extracted from the seeds caçari spectroscopy in the infrared region (IR).....	73
CAPÍTULO IV – PHYTOTOXICITY OF EXTRACTS OF <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh BIOPROCESSED IN VEGETABLE CROP SENSITIVE TO ALLELOCHEMICALS.....	94
Figure 1. Germination Index (GI) of <i>L. lycopersicum</i> (tomato) obtained at 5 days after sowing (DAS) with <i>Myrciaria dubia</i> extracts of different treatments, T1D1, T1D2, T2D1 and T2D2 of BR.....	101
Figure 2. Demonstration related to pH trends, interrelated to electrical conductivity (EC) and total dissolved salts contents (TDS) of the four types extracts (T1D1, T1D2, T2D1 and T2D2) of bioprocessed remaining of <i>Myrciaria dubia</i> evaluated.....	102
CAPÍTULO V – ATIVIDADE ACARICIDA DE EXTRATO A BASE DE SEMENTES DOS FRUTOS DE CAÇARI.....	107
Figura 1. Mortalidade total (%) de fêmeas de <i>R. indica</i> em folíolos de <i>Adonidia merrillii</i> em 24 h, 48 h e 72 h após aplicação com água (T0), extratos Hag com e sem sementes de <i>M. dubia</i> bioprocessada, 1, 2, 4, 8% e C8%.....	113
Figura 2. Linha de regressão mortalidade vs concentração nos tempos de 24 e 48 h (A) e relação dose-resposta em 48 h com transformação Probit e logarítmica (B) entre diferentes doses do bioproduto para espécie <i>R. indica</i>	115
CAPÍTULO VI – EFFECT OF SOME MYRTACEAE PLANTS EXTRACTS ON <i>Callosobruchus maculatus</i> IN GRASS LEGUME	120
Figure 1. Effectiveness values obtained from the tenth to the fiftieth day between treatments (a) and number of hatched and reduced individuals at fifty days in Cd1 and Bpd1, compared to T and related weight loss (b).....	124

Figura 2. Comparison of efficiency percentage values obtained in the reduction of hatching (intact grains) and in the development of pest insects (holed grains) in the Witness treatment, Cd1 and Bpd1..... 125

Figura 3. Percentage values obtained in the germination test with cowpea seeds in treatments established for verification and evidence of bioactivity of the extracts..... 126

LISTA DE TABELAS

<p>CAPÍTULO I – DESCRIPTION AND AUTOMATED SEED MORPHOSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh: DIAGNOSIS BY IMAGE.....</p>	50
<p>Table 1. Results of variables selected for <i>M. dubia</i> seeds in SAS regarding dimensions (geometry) in centimeters (cm), predominant color, texture, and color variation in numerical codes.....</p>	57
<p>CAPÍTULO II – BIOPROSPECTING TECHNOLOGY APPLIED IN CAÇARI SEEDS (<i>Myrciaria dubia</i>) HOW TO BENEFIT BIOPRODUCTS AGRIFOOD DEVELOPMENT.....</p>	63
<p>Table 1. Mass (g) of fruit, peel, pulp, ripe juice and mature seeds collected in the fruiting period caçari the occurrence areas in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.....</p>	68
<p>Table 2. Mass variation (%) in the peel, pulp, juice and mature seeds (M) and semi-mature (SM) in three caçari the occurrence of areas in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.....</p>	68
<p>Table 3. Income obtained in filmless caçari seeds of bioprocessing, kept for a year at an average temperature of 25 ° C in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.....</p>	71
<p>Table 4. Average values related to physical, physical-chemical and metabolic intermediates, bioelements, trace elements and bioactive compounds in bioproducts (SBCP and SBSP) seeds of caçari in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.....</p>	72
<p>CAPÍTULO III – SAIS MINERAIS EM EXTRATO AQUOSO DE COPRODUTOS DA <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae.....</p>	85
<p>Tabela 1. Valor de condutividade elétrica, corrigida a 25° C e teor de sais minerais dissolvidos obtidos no estudo realizado com três amostras de co-produtos, CF, CS e SSC, oriundas do processamento agroindustrial experimental em frutos de camu-camu.....</p>	89

Tabela 2. Dados de condutividade elétrica contido em rótulos de marcas de água mineral vendidas no mercado.....	90
CAPÍTULO IV – PHYTOTOXICITY OF EXTRACTS OF <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh BIOPROCESSED IN VEGETABLE CROP SENSITIVE TO ALLELOCHEMICALS.....	94
Tabela 1. Results obtained on visual inspection absence (-) or presence (+) of microorganisms in different dosages of BR sand (S), sandy soil (SS) and clay soil (CS).....	97
Tabela 2. Schematic model for simplified identification of the experiment and extracts made from bioprocessed remaining (BR).....	97
Tabela 3. Methodological model proposed to quantify the degree or phytotoxicity level of the product from the tests with <i>Lycopersicon lycopersicum</i>	99
Tabela 4. Mean results obtained in the simplified physicochemical characterization, visual inspection of absence (-) or presence (+) of microorganisms, germination index and degree of phytotoxicity in the treatment with different dosages of RBST and RBCT concentrated (10%) and diluted (1%).....	99
Tabela 5. Average number (%) of germinated seeds (NSG) and average roots length (mm) (RL) of <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (tomato), to five days after sowing (DAS) in different treatments (WC, T1D1, T1D2 , T2D1 and T2D2).....	100
CAPÍTULO V – ATIVIDADE ACARICIDA DE EXTRATO A BASE DE SEMENTES DOS FRUTOS DE CAÇARI.....	107
Tabela 1. Mortalidade (%) (média \pm erro padrão) de R. indica nas diferentes concentrações do extrato hidroálcoolglicólico de sementes de <i>M. dubia</i> bioprocessada e testemunha, 24, 48 e 72 horas após a instalação do bioensaio <i>in vitro</i>	107
Tabela 2. No de indivíduos vivos e valores médios obtidos no teste de eficiência agrônômica realizado pela fórmula de Abbott nas diferentes concentrações de bioproduto composto de <i>Myrciaria dubia</i> bioprocessada, nos intervalos de 24 a 72 h.....	114
Tabela 3. Valores médios percentuais e índices de eficácia obtidos pela fórmula de	

Abbott nas diferentes concentrações e intervalos de aplicação de bioproduto composto de sementes <i>Myrciaria dubia</i> bioprocessada na mortalidade de <i>R. indica</i>	114
CAPÍTULO VI – EFFECT OF SOME MYRTACEAE PLANTS EXTRACTS ON <i>Callosobruchus maculatus</i> IN GRASS LEGUME	
Table 1. Average number of insects obtained in the Witness (W) and the three doses of Hag extract at 8% (Bp) and control (C) in six periods of monitoring of <i>in vitro</i> bioassay.....	123
Table 2. Average mass values of 100 seeds and percentage of perforated grains after applying doses of Hag extracts, Cd1, Cd2, Cd3, Bpd1, Bpd2 and Bpd3 compared to the Witness (W) at 50 days of monitoring of <i>C. maculatus</i>	125

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Definições, uso e aplicação da bioprospecção, ênfase na biotecnologia verde.....	22
2.2 Tecnologias de bioprocessamento - avanços e tendências atuais da biotecnologia.....	23
2.3 <i>Spin-off</i> - instrumento alternativo para consolidação de conhecimentos técnico-científicos propulsores de produtos biotecnológicos da bioprospecção na Amazônia.....	27
2.4 Visão holística sobre a <i>Myrciaria dubia</i> (H.B.K.) McVaugh, ênfase na Amazônia setentrional.....	33
2.5 Princípios, métodos e aplicações biotecnológicas utilizadas em laboratório para caracterização e desenvolvimento de produtos das sementes de <i>M. dubia</i>	40
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
4. OBJETIVOS.....	49
4.1 Objetivo geral.....	49
4.2 Objetivos específicos.....	49
CAPÍTULO I – DESCRIPTION AND AUTOMATED SEED MORPHOSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh: DIAGNOSIS BY IMAGE.....	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
INTRODUCTION.....	51
MATERIAL AND METHODS.....	53
RESULTS.....	55
DISCUSSION.....	59
REFERENCES.....	60
CAPÍTULO II – BIOPROSPECTING TECHNOLOGY APPLIED IN CAÇARI SEEDS (<i>Myrciaria dubia</i>) HOW TO BENEFIT BIOPRODUCTS AGRIFOOD DEVELOPMENT.....	63
ABSTRACT.....	63
INTRODUCTION.....	64

MATERIAL AND METHODS	65
RESULTS	67
DISCUSSION	74
ACKNOWLEDGMENTS	79
REFERENCES	79
CAPÍTULO III - SAIS MINERAIS EM EXTRATO AQUOSO DE COPRODUTOS DA <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae	85
ABSTRACT	85
RESUMO	85
INTRODUÇÃO	86
MATERIAIS E MÉTODOS	88
RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
CONCLUSÃO	91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
CAPÍTULO IV - PHYTOTOXICITY OF EXTRACTS OF <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh BIOPROCESSED IN VEGETABLE CROP SENSITIVE TO ALLELOCHEMICALS	94
ABSTRACT	94
INTRODUCTION	94
MATERIAL AND METHODS	96
RESULTS AND DISCUSSION	99
CONCLUSIONS	103
REFERENCES	103
CAPÍTULO V - ATIVIDADE ACARICIDA DE EXTRATO A BASE DE SEMENTES DOS FRUTOS DE CAÇARI	107
RESUMO	107
ABSTRACT	107
INTRODUÇÃO	108
MATERIAIS E MÉTODOS	110
RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS	116
CAPÍTULO VI - EFFECT OF SOME MYRTACEAE PLANTS EXTRACTS ON <i>Callosobruchus maculatus</i> IN GRASS LEGUME	120
ABSTRACT	120

INTRODUCTION.....	120
MATERIALS AND METHODS.....	122
RESULTS AND DISCUSSION.....	123
CONCLUSIONS.....	127
REFERENCES.....	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133
ANEXOS.....	134

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso da bioprospecção como forma e processo de conhecimento explorativo apresenta-se atualmente como uma ferramenta importante. É caracterizada por expertises como um dos eventos sócio-científico-econômico mais desenvolvido e essencial dos últimos séculos, permitindo automaticamente avanços e beneficiando setores, indivíduos e processos na área biotecnológica e afins, principalmente em estudos específicos relativos a componentes vegetais da biodiversidade.

A biodiversidade do Brasil abriga hoje entre 15% e 20% das 1,5 milhão de espécies descritas na Terra (MMA, 2002). Porém, não garante ainda crescimento econômico satisfatório, tampouco o desenvolvimento sustentável na Amazônia. Nesse caso, postula-se que o uso intensivo do conhecimento e Utilização Prática da Biotecnologia (UPB) inter-relacionada às ciências afins é um dos caminhos a serem trilhados para evolução e transformação dessa situação.

Uma fonte de desenvolvimento e reconhecimento é a geração de produtos com alto valor agregado, metabólitos de interesse industrial, bioprodutos com potencial para aplicação biotecnológica, farmacológica, na agricultura e na agroindústria e conseqüentemente a indicação geográfica (IG). Para tanto, processos de apoio e estratégias específicas para consolidação destes são necessários, bem como abordagens holísticas são fundamentais para estruturação primeiramente de protótipos de bioprodutos provenientes de espécies vegetais, devidamente bioprospectadas, principalmente as da Amazônia.

A Amazônia detém uma série de espécies vegetais que apresenta ou tem potencial de trazer um valor agregado muito alto para o País, quando devidamente processados. São produtos e subprodutos para a indústria farmacêutica e, aditivos para indústria de alimentos e/ou substratos, entre outros, para serem transformados via biotecnologia. Nesse caso, o empreendedorismo de base tecnológica pode ser um dos pontos de partida, para Utilização Prática da Biotecnologia (UPB).

Estudos teórico-prático sobre a UPB no desenvolvimento de negócios tecnológicos na Amazônia apontam para uma nova alternativa, num ambiente propício a construção de redes de cooperação envolvendo a transferência tecnológica para o setor privado por meio dos *Spin-off*, ou seja, explorar um novo produto ou serviço de alta tecnologia (Lemos, 2013), tendo como base o uso sustentável dos recursos genéticos da biodiversidade regional.

A *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae, frutífera nativa da Amazônia apresenta potencial sócio-econômico e nutricional comprovado nacionalmente e

internacionalmente de acordo com pesquisadores da área. Seus frutos são considerados como uma das maiores fontes de vitamina C do mundo. E ainda como importantes fontes de diferentes compostos bioativos e boa fonte de minerais, tais como sódio, potássio, cálcio, zinco, magnésio, manganês e cobre. Sendo a polpa o produto de maior interesse para diversos consumos.

Entretanto, na extração da polpa dos frutos de *M.dubia* é gerado um quantitativo efetivo de diferentes resíduos, sólidos e líquidos. Dentre estes cascas e sementes, somam em torno de 40 % de resíduos sólidos, descartados ainda, nas pequenas agroindústrias da região, pois não há um mercado definido para sua comercialização, principalmente as sementes.

Nesse caso, acredita-se que as referidas sementes não são exploradas economicamente, em decorrência de nenhum ou pouco estudo de bioprospecção realizados até o momento, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza. Há escassez de informações mais detalhadas que propiciem sua identificação, caracterização, preservação, condições de transporte e armazenamento, principalmente da amostra antes da análise, sendo todas elas condizentes com as Boas Práticas de Laboratório (BPL).

Considerando ainda que a produção de metabólitos de interesse industrial, obtidos a partir do reaproveitamento de resíduos e/ou subprodutos da agroindústria, remanescentes bioprocessados, principalmente, cascas e sementes oriundas da agroindústria de frutos tem sido alvos de estudos das várias áreas das ciências em busca de aproveitamento potencial total, principalmente na forma de bioprodutos.

Nesse sentido, conjectura-se que as sementes, remanescente bioprocessado proveniente de extração da polpa dos frutos de *M. dubia*, pode perfeitamente, por meio de estudos tecnológicos, servir como base/matéria-prima para fabricação de novos produtos com alto valor agregado. Bem como, por meio de bioprocessos específicos, previamente qualificado, quantificado; testado e validado, será possível à agregação e valorização em futura produção agroindustrial e biotecnológica desta matéria vegetal.

Logo, a caracterização e avaliação do potencial das sementes de *M. dubia* da Amazônia setentrional em busca de novas fontes de compostos e/ou metabólitos desconhecidos ainda, para fins biotecnológicos diversos, podem ser gerados a partir da bioprospecção tecnológica, ou seja, realização de estudos técnico-científicos em escala laboratorial, proposto na presente tese. Nesta, os resultados obtidos estão apresentados em seis capítulos, formatados em artigos de acordo com as temáticas estabelecidas na revisão bibliográfica e objetivos específicos. Bem como, as normas e diretrizes dos periódicos selecionados para publicação. São os seguintes:

1º Artigo – Description and automated seed morphostructural characterization of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh: diagnosis by image;

2º Artigo – Bioprospecting technology applied in caçari seeds (*Myrciaria dubia*) how to benefit bioproducts agrifood development;

3º Artigo – Sais minerais em extrato aquoso de coprodutos da *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, *Myrtaceae*;

4º Artigo – Phytotoxicity of extracts of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh bioprocessed in vegetable crop sensitive to allelochemicals;

5º Artigo – Atividade acaricida de extrato a base de sementes dos frutos de caçari;

6º Artigo – Effect of some myrtaceae plants extracts on *Callosobruchus maculatus* in grass legume.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na presente seção apresenta-se de forma contextualizada a revisão bibliográfica utilizada para embasamento, complementação e implementação de seis capítulos da presente tese, na forma de artigos técnico-científicos.

2.1 Definições, uso e aplicação da bioprospecção, ênfase na biotecnologia verde

A bioprospecção é definida por diversos autores, há mais de uma década, como a busca sistemática, classificação e investigação de novas fontes de compostos químicos, genes, proteínas e outros produtos que possam ter potencial e/ou valor econômico e levar ao desenvolvimento de um produto onde se encontram os componentes da biodiversidade (FEINSILVER, 1996; ARTUSO, 2002; LAIRD & WYNBERG, 2002; CASTREE, 2003; SACCARO JÚNIOR, 2011, MARQUES et al., 2013).

É definida, também, como método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado lugar (SANTOS, 2012).

A "bioprospecção" segundo Reed (2005) é uma biotecnologia muito antiga que envolve algumas novas técnicas. De acordo com o referido autor, os bioprospectores têm encontrado aplicações industriais enormes, especialmente, sob a forma de produtos químicos. Vários fungos, bactérias e outros microorganismos são muitas vezes utilizados para criar produtos químicos industriais.

O aumento nos custos de produção das lavouras, devido ao uso de produtos químicos sintéticos e a preocupação com o meio ambiente têm vindo a intensificar o interesse pela busca de moléculas ativas (TALAMINI & STADNIK, 2004; ABREU, TALAMINI & STADNIK, 2008). Possivelmente, com vistas a identificação de novos compostos inseticidas. No Brasil, cita-se como exemplo, trabalho técnico-científico, relativo a bioprospecção de compostos inseticidas de plantas nativas do Mato Grosso do Sul, desenvolvido por Souza et al. (2008). Uma avaliação da atividade inseticida de extratos preparados a partir de folhas de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), *Attalea phalerata* (Mart. ex Spreng) Burret (Arecaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), e *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) e do caule de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae).

Portanto, a bioprospecção como forma e processo de conhecimento e exploração da vida é importante e caracteriza-se como um dos eventos sócio-científico-econômico mais desenvolvido e essencial dos últimos séculos. "As aplicações de produtos de bioprospecção

são quase ilimitadas, os produtos e processos que resultam de bioprospecção já são abundantes em áreas de agricultura, indústria farmacêutica, ambiental e biotecnologia industrial” (REED, 2005).

Aliada ao uso da biotecnologia inclui a possibilidade de oferecer produtos que podem tratar a fome e a desnutrição, melhorar a saúde humana e reduzir o impacto ambiental das atividades industriais. Se bem empregada, pode prover ferramentas melhores para o crescimento sustentável, permitindo uma performance superior da indústria na esfera econômica e ambiental não obtida com as tecnologias convencionais (Pereira & Duque-Estrada, 2011).

Logo, pode trazer inúmeras vantagens como, por exemplo: propiciar o conhecimento da biodiversidade e seu potencial; fornecer substâncias importantes para o homem; favorecer o crescimento econômico; para se tornar um fator gerador de empregos; fornecer fundo para a conservação; gerar imposto; melhorar o nível científico do país e também o padrão de vida no planeta com o uso correto dos recursos naturais (SANTOS, 2012).

Segundo Vasconcelos (2012) considera-se identificado o “potencial de uso comercial” de determinado componente do patrimônio genético no momento em que a atividade exploratória confirme a viabilidade de produção industrial, ou comercial, de um produto ou processo a partir de um atributo funcional desse componente.

Portanto, a realização de estudos preliminares em escala laboratorial para caracterização do potencial de remanescente bioprocessados provenientes da polpa de frutos da *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae (camu-camu), presente em toda Amazônia Legal e em alguns locais de sua borda pode ser caracterizadas como um tipo de bioprospecção.

2.2 Tecnologias de bioprocessamento - avanços e tendências atuais da biotecnologia

O crescente uso da biotecnologia em muitos setores da economia vem desempenhando um papel importante, com potencial para oferecer produtos que podem resolver a fome e a desnutrição, melhorar a saúde humana e ainda reduzir o impacto ambiental das atividades industriais (PEREIRA & DUQUE ESTRADA, 2011).

Os processos biotecnológicos têm conquistado lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos, convencionalmente, utilizados. O uso desses processos possibilita a produção de grande número de metabólitos de interesse

industrial, compostos, os quais podem ser obtidos segundo Maciel (2006), a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos e/ou subprodutos da agroindústria, disponíveis abundantemente no Brasil.

Nesse caso, o fornecimento de compostos bem definidos e naturalmente estruturados pode contribuir para a obtenção do entendimento necessário e melhoria dos benefícios fisiológicos de substâncias naturais complexas (MEYER, 2010). Para tanto, faz-se necessário conhecer os fatores tecnológicos que afetam sua produtividade.

De acordo com Holker e Lens (2005), a aplicação biotecnológica intensiva de determinados processos pode trazer vantagens econômicas diretas. Nesse sentido, o uso de resíduos agroindustriais como substrato em processos biotecnológicos parece ser uma alternativa valiosa para superar os altos custos de manufatura envolvidos nas fermentações industriais, mostrando que esta é uma tendência crescente na biotecnologia (BICAS et al., 2010).

Vários bioprocessos já foram desenvolvidos utilizando resíduos agroindustriais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos, uma vez que o uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALEXANDRINO, 2007).

Portanto, de acordo com Pereira Jr. et al. (2008) para que os bioprocessos, possam despertar o interesse tecnológico e comercial, seja na criação de um processo novo ou na otimização de um já existente, é essencial entender os fatores tecnológicos que afetam significativamente sua competitividade. No processo para produção de alimentos funcionais, por exemplo, seu desempenho é avaliado por meio das seguintes variáveis, que ditarão sua viabilidade:

- Coeficientes de conversão em relação ao substrato consumido e à matéria-prima;
- Taxas cinéticas de consumo de substrato e de formação de produto;
- Estabilidade do biocatalisador ou da cultura;
- Produtividade;
- Concentração de produto do meio reacional.

De maneira geral, o programa de desenvolvimento de um bioprocessos envolve as seguintes etapas: seleção e melhoramento de linhagens produtoras, otimização de meio de cultura em frascos agitados, experimentos em biorreatores de laboratório, avaliação em escala piloto e, posteriormente, estudos de ampliação de escala (PEREIRA Jr. et al., 2008).

De acordo com o referido autor (Pereira Jr. et al., 2008), os bioprocessos devem ser, periodicamente, reavaliados e incorporados de inovações tecnológicas, a fim de aumentar seu desempenho e lucratividade. A absorção de inovações tecnológicas, somente conseguidas através de pesquisa, desenvolvimento e inovação, produz grande impacto em diversos setores da indústria alimentar quando há frequência na otimização dos mesmos.

Para as indústrias alimentares, a chave do sucesso no mercado dos alimentos funcionais reside na inovação, o que constitui poderosa barreira à entrada de novas empresas. Para atender às demandas específicas da sociedade em termo de saúde, as indústrias devem cada vez mais se especializar e segmentar seus produtos, o que lhes obriga a realizar investimentos elevados na área da pesquisa, desenvolvimento e mídia (RAUD, 2008).

O papel desempenhado por alimentos dietéticos sobre o estado de saúde das pessoas há tempos vem sendo reconhecido, porém apenas recentemente, estudos epidemiológicos e clínicos têm proporcionado uma visão mais clara sobre os mecanismos químicos e fisiológicos dos efeitos de alimentos funcionais na saúde humana (SHAHIDI, 2009).

Em consequência da aceitação e necessidade dos alimentos funcionais, a indústria alimentícia passa por transformações. No entanto, a influência do processamento e da estocagem na concentração das substâncias bioativas, ainda, precisa ser mais detalhada e melhor estudada. Diversos cultivares e várias condições de crescimento, além das diferenças na execução dos processos dificultam as interpretações e comparações entre os estudos. A dificuldade para quantificar essas substâncias está associada a vários problemas técnicos que ainda não foram resolvidos, tais como: (i) disponibilidade de métodos analíticos validados para a quantificação e (ii) entendimento limitado dos efeitos da estocagem e processamentos na estabilidade das substâncias (PEREIRA Jr., 2009).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, tem conseguido nos últimos anos melhorar significativamente a sua produção. No entanto, em resposta a esse avanço no setor agroindustrial, a geração de resíduos agroindustriais ou subprodutos também aumentou, e a sua eliminação inadequada pode ter um forte impacto ambiental, causando perdas de matérias-primas e energia (SOUSA & CORREIA, 2010).

O uso da biotecnologia se bem empregada, pode prover ferramentas melhores para o crescimento sustentável, permitindo uma performance superior da indústria na esfera econômica e ambiental não obtidas com as tecnologias convencionais (PEREIRA & DUQUE-ESTRADA, 2011).

Nesse sentido, os processos biotecnológicos são cruciais para o desenvolvimento de qualquer economia que se esforça para garantir uma posição relevante em mercados

futuros. As enzimas são exemplos de produtos gerados por meio desse processo. Outro exemplo, é o cultivo de microrganismos em bioreatores, com monitorização em tempo real, essencial, para o controle eficiente desse bioprocessos (LOURENÇO et al., 2012).

Entretanto, a produção de ingredientes funcionais, incluindo enzimas, para a indústria alimentícia envolvendo processos biotecnológicos e aqueles envolvendo pesquisa genética, designada como biotecnologia molecular é discutida no meio científico, as relevantes deficiências para aplicações em novos alimentos funcionais (FREITAS et al., 2012).

Por conta disso, o emprego de tecnologias para a obtenção de produtos alimentícios, com alto valor agregado, tem sido alvo de pesquisas nos últimos anos, como por exemplo, a tecnologia de bioprocessos para produção de alimentos funcionais.

Os bioprocessos, processos de natureza biológica, surgiram como tecnologia emergente e promissora, revelando-se como processos eco-compatíveis (PEREIRA Jr., 2009). Já a tecnologia de bioprocessos para produção de alimentos funcionais, por exemplo, devido as diferentes etapas que a compõem encontra-se como um dos desafios da biotecnologia. Portanto, ferramentas biotecnológicas como modelagem e simulação, bem como o controle e a instrumentação são “peças-chaves” na otimização de bioprocessos (PEREIRA Jr., 2008).

Bioaromas e oligossacarídeos, por exemplo, são duas classes de substâncias que podem ser produzidas biotecnologicamente por meio de bioprocessos microbiológicos. Estes compostos têm atraído interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos não só devido às suas propriedades tecnológicas, adoçantes/fibras ou aromatizantes, respectivamente, mas também como consequência de outras propriedades funcionais como, por exemplo, benefícios na promoção da saúde (BICAS et al., 2010).

Assim, investimentos em pesquisa e desenvolvimento, com o objetivo de criar novos produtos de maior valor adicionado, podem garantir o sucesso de empresas que se mobilizam para acompanhar a onda de consumo de alimentos saudáveis e de preparo rápido. Porém, até recentemente, dez anos atrás, segundo Gouveia (2006), algumas empresas, sequer possuíam ainda um departamento de pesquisa e desenvolvimento.

De acordo com Pereira Jr. et al. (2008) para compor o meio industrial do bioprocessos, alguns nutrientes deverão ser selecionados de acordo com suas características não só nutricionais, mas também econômicas, não podendo ser esquecidas as particularidades inerentes ao agente da transformação, quanto ao que será aproveitado para suas reações metabólicas ou a algum efeito de inibição sobre essas reações ou mesmo sobre a síntese do produto final.

Portanto, estudos teóricos e práticos relativos à tecnologia de bioprocessos, área em expansão, são relevantes e úteis para compor, por exemplo, a documentação exigida no registro de um produto caracterizado como alimento funcional. Pois, não possuindo histórico de consumo, são enquadrados na categoria de novos alimentos. E para que o produto possa ser comercializado no Brasil, é necessário conforme ANVISA (2002) que as empresas interessadas apresentem documentação científica comprovando sua segurança de uso e, ainda, que solicitem seu registro na Anvisa.

2.3 *Spin-off* - instrumento alternativo para consolidação de conhecimentos técnico-científicos propulsores de produtos biotecnológicos da bioprospecção na Amazônia

A Gestão da Amazônia e o empreendedorismo de base tecnológica, atualmente, convergem para a possibilidade de criação de novos negócios, a partir de empresas constituídas, universidades e centros de pesquisa, denominados como *spin-off*.

O *spin-off* trata-se de um modo de gestão, que refletindo e ajudando o empresariado, permite às empresas adaptar-se, com poucos gastos, às mudanças rápidas e incessantes do meio. É uma maneira de manter e de cultivar o espírito da empresa (Filion, 2002).

Spin-off é um tema ainda novo e pouco estudado. Tanto que, a partir da publicação do livro organizado por Cozzi et al. (2008), abriu-se o caminho para o reconhecimento e a explicitação das peculiaridades desse mecanismo de empreendedorismo, observando as práticas em contextos diversos do Brasil e do Canadá.

Atualmente, encontra-se na literatura científica, diferentes significados para o termo *spin-off*, de acordo com área ou setores de aplicação (Spin-Off, 2013).

Spin-off, também chamado de derivagem, é um termo utilizado para designar aquilo que foi derivado de algo já desenvolvido ou pesquisado anteriormente. É utilizado em diversas áreas, como em negócios, em tecnologia, entre outras.

Em negócios, o termo *spin-off* é utilizado para designar o processo de cisão entre empresas e o surgimento de uma nova empresa a partir de um grupo que já existe. Neste caso, acontece *spin-off* quando as organizações exploram um novo produto ou serviço a partir de um já existente.

Em tecnologia, ocorre *spin-off* quando uma tecnologia resulta no desdobramento de outras já existentes. Por exemplo, quando criada uma tecnologia e outros cientistas partem deste princípio para criarem outras a partir daquela já criada.

O *spin-off* tecnológico é utilizado como estratégia para a conservação do patrimônio científico e seus resultados. Portanto, a criação de empresas tecnológicas através de *spin-off* aparece como um caminho real para diminuir a expatriação das tecnologias e tudo o que disso deriva: perda de direitos, mas sobretudo, perda do círculo de informação sobre as aplicações da pesquisa que permitem ir sempre mais longe no tema abordado (COZZI et al., 2008).

No livro organizado por Gimenez et al. (2010), encontraram-se o conceito de *spin off* universitário onde o mesmo apresenta uma descrição tridimensional do processo de geração desse fenômeno. Na conclusão, o autor argumenta pela necessidade de ampliação desse conceito, em função da diversidade de tipos de *spin-offs* que podem ser encontrados.

Existem diferentes tipos de *spin-offs* universitários/*spin-off* acadêmico. As diferenças entre eles decorrem, entre outros, das variações existentes em três componentes principais do processo de geração de um *spin-off* universitário: os empreendedores, a universidade e a tecnologia utilizada no produto desenvolvido pela empresa nascente (BORGES, 2010).

Em síntese o referido autor (BORGES, 2010), ressalta as principais variações existentes entre esses componentes e o papel de cada um deles no processo de geração dos *spin-offs*. Mostra a importância dos *spin-offs* universitários para as instituições de ciência e tecnologia (ICT) e para a sociedade e, analisa os principais componentes do processo de geração de *spin-offs* desses componentes e suas implicações para a pesquisa.

Os *spin-offs* transformam os conhecimentos científicos e tecnológicos da universidade em produtos que são utilizados pelo mercado. Em segundo lugar, *spin-offs* favorece a interação entre a universidade e as empresas, pois têm ligação com os dois mundos (acadêmico e empresarial) (BORGES, 2010), quando alguns pesquisadores do campo buscam identificar maneiras de reduzir os riscos que são inerentes a qualquer processo de criação, principalmente, a biotecnologia.

A busca de alternativas produtivas sustentáveis que permitam melhor aproveitar a vocação florestal da região Amazônica foi uma constante nas últimas três décadas. Os esforços realizados incluíram várias frentes, dentro das quais se destacam: (a) a promoção do manejo sustentável comunitário e empresarial de espécies florestais madeireiras; (b) a promoção do manejo sustentável comunitário de espécies florestais não madeireiras com foco em essências, borracha, castanha, óleos e na agregação de valor de alguns produtos e (c) a promoção de serviços tais como o ecoturismo (ARAGON, 2010).

Marcovitch (2011) define um quadro socioeconômico e cultural da região. Para ele, o grande futuro do Brasil pode estar de fato na Amazônia. Segundo o mesmo, não há

outro lugar, em nosso País, tão propício quanto esse para experiências avançadas em biotecnologia ou procedimentos de integração e reencontro do homem com a natureza.

Há, na Amazônia, por exemplo, um imenso potencial econômico e científico nas dez mil espécies vegetais de uso medicinal ou cosmético, entre as quais, mais de 300 de frutas silvestres, até aqui catalogadas (LARUCCIA, 2012).

Entretanto, para Marcovitch (2011), em sua análise crítica, ressalta que apesar de todas as possibilidades que a Amazônia nos proporciona, o Brasil não conseguirá transformá-las em negócios lucrativo para a região, se não se organizar para o novo capitalismo, que está fundamentado na ciência.

Então, pelo exposto, é necessária a instalação de novas empresas para incrementar e gerar negócios na própria Amazônia. A palavra “biotecnologia” é formada pela fusão de três termos de origem grega: bio, que quer dizer vida; logos = conhecimento e technos, que designa a utilização prática da ciência. Essa nova definição abrange em seu sentido mais amplo a biotecnologia, compreendida pela manipulação de microorganismos, plantas e animais, com objetivo de obter processos e produtos de interesse humano (PEREIRA, 2011).

É possível que apenas 5% dos nossos cientistas trabalhem na Amazônia, embora ela ocupe, geograficamente, mais da metade do território brasileiro. Cerca de 70% dos estudos internacionais a respeito do Grande Bioma não incluem pesquisadores em atividade no Brasil. E ainda, não mais que 10% das espécies existentes em sua biodiversidade foram catalogadas até agora (LARUCCIA, 2012).

As formas de organização da pesquisa e da inovação modificaram-se de maneira bastante significativa nos últimos 20 anos, necessitando de uma nova abordagem que dê conta das transformações ocorridas, fortemente baseadas no conhecimento (ASSAD, 2013 a e b). A biotecnologia é um dos principais exemplos dos novos arranjos organizacionais. Necessitando, portanto, de uma política nacional para apoiar empresas *startups* e *spin-offs* de base tecnológica.

Spin-off é utilizado para descrever uma nova empresa que nasceu a partir de um grupo de pesquisa de uma empresa, universidade ou centro de pesquisa público ou privado, normalmente com o objetivo de explorar um novo produto ou serviço de alta tecnologia. É comum que estas se estabeleçam em incubadoras de empresas ou áreas de concentração de empresas de alta tecnologia (LEMOS, 2013).

O Centro de Biotecnologia da Amazônia é o espaço institucional de destaque na implementação da política nacional de biotecnologia e se constitui num dos principais eixos para avançar na exploração de novas oportunidades de desenvolvimento a partir da biotecnologia. Tem como missão promover a inovação tecnológica de processos e produtos,

incentivando e criando as condições básicas para apoiar o desenvolvimento das atividades industriais baseadas na exploração sustentável da biodiversidade amazônica. Portanto, ideal e com potencial para aplicação do *spin-off*.

A biotecnologia tem alto potencial de aplicação, incluindo a realização de avanços e mudanças significativas no tratamento de doenças, no uso de novos medicamentos para aplicação humana e animal, na multiplicação e reprodução de espécies vegetais e animais, no desenvolvimento e melhoria de alimentos, na utilização sustentável da biodiversidade, na recuperação e tratamento de resíduos, dentre outros, com um potencial cada vez maior de inovação e de geração de novos produtos (ARAGON, 2010).

Atualmente, na Amazônia, existe um ambiente propício para a construção de redes de cooperação de negócios. Há um cenário de diferentes modelos, métodos e ferramentas que podem ser aplicados como o caso do *spin-off*, ou seja, Utilização Prática da Biotecnologia (UPB), uma alternativa necessária para o desenvolvimento regional da Amazônia.

Filion (2002) já acreditava que todas as redes dos organismos de ajuda à criação de empresas poderiam contribuir bastante para apoiar os criadores de negócios, os quais emergiriam em grande número, depois da implementação de programas formais de *spin-off* nas empresas. Nessa época, o referido autor constatou que na maioria dos países, os *spin-off* de empresas eram, essencialmente, dirigidos por um empresário, não existindo programa formal e variando as formas e práticas dos *spin-off*, consideravelmente, de uma empresa para outra.

Nessa época foi disponibilizado um texto, concebido para uso como um guia não se aplicando como uma política de empresa. Esse texto seria uma referência para melhor se compreender o assunto, com a finalidade de abordar a prática de *spin-off* nas empresas. Segundo Filion (2002), este texto, se utilizado com discernimento, as aplicações decorrentes, teriam a vantagem de serem bem adaptadas a cada um dos contextos concernentes.

O *spin-off* não era uma nova moda no que se referia à gestão, mas um modo de gestão promissor para as sociedades empreendedoras do futuro. No quadro 1, estão relacionados os impactos e as vantagens do *spin-off*, levantados para quatro categorias apresentadas: 1. Empresa mãe; 2. Empresa derivada; 3. Mais, particularmente, para o criador; 4. Sociedade, mostrando que o *spin-off* gera quase todo o tempo, situações ganhador-ganhador para as empresas e pessoas concernentes. Decorre daí uma cultura e práticas empresariais que contribuem, geralmente, para o desenvolvimento dos meios que as praticam (FILION, 2002).

Nas categorias relacionadas no quadro 1, abaixo, a empresa-mãe apoia um empregado com um conjunto de atividades, variáveis de um contexto a outro, comportam,

mais frequentemente, uma ajuda técnica, conselhos de negócios, direção e gestão, às vezes, apoios financeiros. Já a empresa derivada (ou *spin-off* em Inglês) é a empresa que se beneficia de um apoio da parte de sua empresa de origem. O criador/empreendedor inicia o projeto de criação de empresa e que se tornará o futuro empresário da nova empresa assim criada.

Quadro 1: Os impactos e as vantagens do *spin-off* para quatro categorias.

1. Empresa-mãe	2. Empresa derivada	3. Criador	4. Sociedade
i. Melhor posição para reagir às turbulências do meio ii. Concentração dos recursos sobre as atividades de valor agregado (core business) iii. Exploração de produtos, tecnologias e outros ativos estagnados iv. Expansão da gama de produtos e serviços oferecidos v. Exploração de novos mercados vi. Partilha dos riscos vii. Crescimento do poder de negociação face aos fornecedores viii. Ganhos de produtividade, de flexibilidade organizacional ix. Economias de escala x. Baixa dos custos de componentes xi. Contribuição à criação de empregos xii. Empregos preservados xiii. Valorização de sua imagem (papel social) xiv. Emergência de uma cultura empreendedora xv. Rotatividade do pessoal xvi. Possibilidade de atrair os melhores talentos em um mercado competitivo.	i. Partilha de riscos ii. Parceria exclusiva como fornecedor (contrato firme) iii. Empréstimos da empresa-mãe e facilidades de pagamento iv. Apoios logísticos v. Conselhos em gestão vi. Acesso aos recursos necessários para seu desenvolvimento vii. Acesso à informação estratégica e de concorrência viii. Aprendizagem rápida em matéria de métodos e procedimentos ix. Efeitos de halo da empresa-mãe e em alguns casos, de sua reputação x. Limiar de rentabilidade atingido mais rapidamente	i. Integração nas redes de negócios ii. Aprendizagem rápida em gestão, em direção de empresa e no que concerne à prática dos negócios iii. Confiança aumentada iv. Realização de si mesmo v. Maneira de evitar o isolamento, próprio aos criadores e dirigentes de pequenas empresas vi. Maneira de permanecer ativo depois de uma aposentadoria obrigatória prematura (número cada vez mais elevado de situações)	i. Criações de empresas, de empregos e de riquezas ii. Nova dinâmica econômica local e regional iii. Possibilidade de diminuição das taxas (ou evitar aumentá-las) iv. Desenvolvimento de dinâmicas empresariais v. Criações de modelos inspiradores para os jovens e para a educação vi. Consolidação de reservatórios de empregos nas regiões mais frágeis

Fonte: Adaptado de Filion (2002) pela autora.

A empresa-mãe contribui para o desenvolvimento de competências empresariais em sua própria empresa, visando o crescimento econômico, ou ainda, preservando e desenvolvendo empregos em sua região. Desta forma o *spin-off* pode ser uma poderosa alavanca de dinamização dos recursos humanos no interior da empresa-mãe e de desenvolvimento econômico no exterior (FILION, 2002).

Borges (2010) demonstra que os *spin-offs* universitários (Quadro 2), além de constituírem a origem dos empreendedores e da tecnologia, a organização-mãe apóia o processo de criação da nova empresa. Tendo como um dos principais instrumentos de suporte os incubadores de empresas. Portanto, criar uma empresa em equipe é uma das formas que os empreendedores utilizam para reunir os recursos e competências necessárias para o projeto.

Quadro 2: Identificação e papel dos principais componentes dos *spin-offs* universitários

Componente	Tipos	Papel
Organização-mãe (universidade)	Variação nos serviços e na estrutura de serviços ofertados aos empreendedores.	A organização-mãe é a origem dos empreendedores ou da tecnologia. Apoia o processo de criação da nova empresa.
Empreendedor	<ul style="list-style-type: none"> • Professor • Estudante • Pesquisador • Externo (<i>surrogate</i>) 	Criador da empresa, só ou em equipe.
Tecnologia	<ul style="list-style-type: none"> • Tácita (mais associada aos indivíduos), • Codificada • Originária da universidade, ou de uma outra universidade ou indivíduo 	A tecnologia é a base dos produtos e serviços desenvolvidos pelo <i>spin-off</i> .

Fonte: Adaptada de Borges (2010) pela autora.

Para Cozzi et al. (2008), geralmente colocar em funcionamento uma nova empresa do setor da biotecnologia necessita, em primeiro lugar, uma descoberta científica única e promissora, mas também recursos consideráveis em tempo, em pessoas e em conhecimento. A idéia pode ser concretizada mais rapidamente se a nova empresa surgir de um *spin-off*, como ocorreu no Canadá com a Ecopia BioSciences, derivada da Theratechnologies.

Dentro desse contexto, o *spin-off* pode muito bem ser aplicado pela biotecnologia para geração de negócios na Amazônia. Fillion (2002) apresenta a necessidade da implantação de uma rede de especialistas, a criação de associações de empresas-mãe e empresas-derivadas e ainda a organização de eventos. O governo e, mais particularmente, as sociedades de estado têm a responsabilidade de exercer, na Amazônia, um papel de precursor no estabelecimento de políticas de *spin-off*.

Em contrapartida, todas as redes dos organismos de ajuda à criação de empresas podem contribuir bastante para apoiar os criadores que emergiriam em grande número, depois da implementação de programas formais de *spin-off* nas empresas (FILION, 2002).

O estabelecimento de uma política voltada a prioridades na área de CT&I na Amazônia deve ser consenso, uma vez que avança a necessidade de interlocução entre gestores federais e estaduais para melhor aplicabilidade dos recursos existentes, tanto no plano dos estados quanto da federação. Serão consideradas, ainda, as necessidades de desenvolvimento regional sem perda da qualidade científica, tanto quanto são necessárias políticas locais de C&T estruturantes e prioridades tanto regionais quanto nacionais de sua implantação (FREITAS, 2008).

Segundo o autor, mais do que uma política de inclusão social, as prioridades de CT&I na Amazônia são essenciais para a política e geração de riqueza, no Brasil e na Região Norte, e para a soberania do Estado brasileiro sobre os biomas e ecossistemas amazônicos.

A biotecnologia, pelo seu caráter, configura-se como uma oportunidade, extremamente, promissora para alavancar o desenvolvimento regional baseado no conhecimento e na inovação, com perspectivas importantes em relação à geração de empregos, aumento de exportações de produtos com maior valor agregado, redução de importações e à produção limpa e com menor impacto ambiental (ARAGON, 2010).

Zylberberg e Oner (2012) demonstraram que, recentemente, tornando-se a sexta maior economia do mundo, o Brasil tem contado, em grande parte, nas suas vantagens comparativas da extração de recursos e da agricultura. Portanto, atividades que visem o desenvolvimento de novas biotecnologias para fins industriais e também para a conservação dos ecossistemas amazônicos, devem ser priorizadas, com o intuito de desenvolver pólos de bioindústrias na Amazônia e desta forma contribuir para a conservação do bioma amazônico e o bem está de suas populações.

A biotecnologia é uma tecnologia que surgiu como um setor de importância estratégica para promover o crescimento e a consolidação da indústria. Portanto, de acordo com Pereira e Duque-Estrada (2011) pode prover ferramentas melhores para o crescimento sustentável, permitindo uma performance superior da indústria na esfera econômica e ambiental não obtidas com as tecnologias convencionais.

Nesse sentido, a criação de novos negócios, a partir de empresas constituídas, universidades e centros de pesquisa, denominados como *spin-off*, pode ser um dos pontos de partida para consolidação de conhecimentos técnico-científicos propulsores de produtos biotecnológicos provenientes da bioprospecção na Amazônia.

2.4 Visão holística sobre a *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, ênfase na Amazônia setentrional

A *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, cujos frutos são denominados popularmente de acordo com o país ou região de abrangência como camu camu ou caçari, é reconhecida internacionalmente, principalmente pelo seu potencial nutricional. No entanto, no Brasil esse conhecimento ainda é escasso, muitas vezes até no local de origem. Entretanto, numa visão global, percebe-se que ocorre exatamente ao contrário, conforme verificado em trabalho de pesquisa classificado como relatório de atualização sobre composições nutricionais e fitoquímicos de frutos da *M. dubia* para promoção da saúde, revelando que podem ser usadas como alimento funcional ou para fins nutracêuticos.

O estudo foi realizado no ano de 2010 por Mst. Sorifa Akter, Sejong Oh, Jong-Bang Eu e Maruf Ahmed, respectivamente dos: Department of Food Science and Technology

and Functional Food Research Center, Chonnam National University, Gwangju, South Korea, Department of Animal Science and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju, South Korea e Department of Food Processing and Preservation, Hajee Mohammad Danesh Science and Technology University, Dinajpur, Bangladesh (Akter et al, 2011).

Segundo Akter et al. (2011) os frutos da *M. dubia* são fontes promissoras de diversos compostos bioativos, como a vitamina C, compostos fenólicos e carotenoides. Boas fontes de potássio, ferro, cálcio, e vários tipos de fósforo de aminoácidos, tais como serina, valina e leucina. E, portanto, devido a presença de diferentes compostos bioativos, estes frutos podem ser utilizados para retardar ou prevenir várias doenças, tais como cardiovasculares e câncer.

Já Fracassetti et al. (2013), oriundos de instituições como a Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Murcia, Spain e Agrícola San Juan de la Amazonia Europa (ASJAEU), Valencia, Spain, realizaram uma avaliação de polifenóis, conteúdo de vitamina C e capacidade antioxidante de pó de polpa desidratada e seca, e de farinha obtida a partir da casca e das sementes, resíduo remanescente após o preparo da polpa dos frutos da *M. dubia*. Obtiveram, cinquenta e três diferentes compostos fenólicos, os quais foram caracterizados por meio de alta cromatografia líquida de separação, juntamente, com díodos detecção, Ionização electrospray Espectrômetro de Massa (HPLC-DAD-ESI-MS-MS) e cromatografia líquida de ultra-performance / espectrometria de massa com time-of-flight (UPLC-RH-QTOF-MS-MS). Sendo que o teor de compostos fenólicos da farinha foi maior do que a do pó da polpa ($4007,95 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ versus $48,54 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) dos frutos da *M. dubia*.

Em ambos os produtos, os autores detectaram miricetina flavonóis e conjugados, ácido elágico e conjugados e elagitaninos. Cyanidin 3-glicosídeo e quercetina e seus glicosídeos só foram encontrados no pó de polpa, enquanto as proantocianidinas estavam apenas presentes na farinha ($3,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, grau de polimerização). O teor de vitamina C foi inferior em pó de celulose (3,5%) do que a farinha (9,1%). A capacidade de eliminação de radicais dos pós e farinha, foi determinada pelos ensaios de DPPH (Radical 2,2 Difenil-1-picril-hidrazil), ABTS (Radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) e ORAC (Capacidade de Obtenção de Radicais de Oxigênio), métodos utilizados na avaliação da capacidade antioxidante, sendo maior para a farinha como poderia ser esperado por serem superiores em fenólicos e vitamina C.

Os mesmos autores (FRACASSETTI et al., 2013), realizaram análises comparativas com bagas, frutos frescos de *M. dubia* indicando que algumas transformações ocorrem durante o processamento. As análises destes frutos mostraram que os derivados de

ácido elágico e elagitaninos estavam presentes principalmente nas sementes, enquanto proantocianidinas estavam presentes tanto nas sementes e cascas.

Os dois pós de frutas da *M. dubia* foram fornecidos segundo os autores (FRACASSETTI et al., 2013), pela Agrícola San Juan de la Amazonia Europa (ASJAEU) (Valencia, Espanha). Ambos pós foram obtidos de frutos em estado de maturação, observados pela cor, colhidos durante o verão de 2010, em Pucallpa Ucayali (Peru).

O pó foi produzido a partir da polpa (celulose em pó), secou-se num secador de pulverização a uma temperatura de entrada de 185° C e uma temperatura de saída de 95 ° C com a adição de 10% de maltodextrina para diminuir a viscosidade do pó resultante.

O segundo pó (farinha) foi produzido a partir das cascas restantes e as sementes com celulose aderida após extração da polpa, e foi seca em um secador de leito fluidizado a uma temperatura de 45-55 ° C. Sendo, que dois diferentes processos de secagem foram aplicados para obter estes pós e isto foi devido ao diferente teor de água das matérias-primas que é, geralmente, de cerca de 90% para a fração de pasta de papel e cerca 60% para fração de sementes e cascas restante (FRACASSETTI et al., 2013).

Na visão de pesquisadores internacionais como Fracassetti et al. (2013), o fruto da *M. dubia* é considerado como uma boa fonte de compostos bioativos potencialmente benéficos para a saúde humana. Entretanto, o consumo é limitado pela sua acidez e sabor amargo, e, portanto, o processo de desidratação é uma boa alternativa para a sua utilização em pó, como um ingrediente alimentar.

Segundo Fracassetti et al. (2013), os resultados obtidos revelaram que os dois produtos em pó estudados, provenientes do beneficiamento dos frutos da *M. dubia*, são excelentes fontes de bioativos, substâncias, incluindo a vitamina C e compostos fenólicos o que resultou em elevados valores da capacidade antioxidante.

Os resultados mostram que a farinha é uma rica fonte de compostos bioativos com propriedades promotoras de saúde potenciais como antioxidante, atividades anti-inflamatórias, e hipocolesterolêmicos que têm sido relacionadas com vitamina C e compostos fenólicos, como os flavonóides e elagitaninos. No entanto, estudos *in vivo* e de intervenção são necessários para avaliar o potencial nutricional e funcional deste produto (FRACASSETTI et al., 2013).

A *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) é conhecida na Amazônia como camu-camu e também como caçari, araçá-d'água ou azedinho, entre outros. É um arbusto de pequeno porte pertencente à família Myrtaceae, disperso desde a região central do Estado do Pará até a Amazônia peruana, sendo normalmente encontrado, em seu estado natural, à beira dos igarapés e rios ou em regiões permanentemente alagadas (ZANATTA, 2004).

As espécies da família Myrtaceae estão distribuídas em todos os biomas, Amazônia, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica, Caatinga, Campos Sulinos e Costeiro. Apresenta grande potencial econômico, muitas de suas espécies são utilizadas na alimentação como, as *Psidium guajava* L. (goiaba) e *Eugenia uniflora* L. (pitanga), consumidas em forma de suco, doces, geléias e sorvetes (LORENZI et al., 2006; MORAIS et al., 2014).

E como medicinais destacam-se as espécies (*Eucalyptus globulus* L.), o “eucalipto”, empregado no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite; e (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh), o “camu-camu” que apresenta alto teor de vitamina C, segundo informações etnofarmacológicas (LORENZI & MATOS, 2002; MORAIS et al., 2014).

Os frutos da *M. dubia* além de serem conhecidos como uma das maiores fontes em quantidade de vitamina C do mundo, são considerados também como importantes fontes de diferentes compostos bioativos. Este, segundo Buffarini (2012) é um termo coletivo para uma variedade de componentes que frequentemente realizam funções tais como fornecimento de cor, sabor, ou proteção de estruturas celulares. Eles incluem salicilatos, flavonóides, glicosinolatos, terpenos, ligninas e isoflavonas. Alguns deles agem como antioxidantes, outros têm propriedades adicionais ainda não compreendidas.

De acordo com o relato de diferentes autores (YUYAMA et al., 2003; ALVES et al., 2002; JUST et al., 2000; ZAPATA & DUFOUR, 1993), apresenta boa fonte de minerais, tais como sódio, potássio, cálcio, zinco, magnésio, manganês e cobre. Contém uma pequena quantidade de pectina e amido. E ainda diferentes tipos de aminoácidos, tais como serina, valina, leucina, glutamato 4-aminobutanoato, prolina, fenilalanina, treonina, alanina. Ácidos orgânicos diferentes, tais como ácido cítrico, ácido isocítrico e ácido málico. Bem como diversos compostos voláteis já foram encontrados em estudos realizados com esses frutos.

Entretanto, segundo, Chagas et al. (2012) até a presente data não havia informações catalogadas e registradas na literatura a respeito da situação atual sobre a distribuição das espécies de camu-camu no estado de Roraima. Por conta disso, realizaram um estudo de prospecção da população de camu-camuzeiro no estado de Roraima. A partir dessas informações, traçariam as estratégias de coleta e estudo da diversidade da espécie, principalmente, no que diz respeito à qualidade de fruto e teor de vitamina C, visando selecionar acessos promissores para iniciar o melhoramento genético da espécie e avançar no processo de domesticação da mesma.

No estudo foi verificado por Chagas et al. (2012) que as populações de camu-camu encontram-se distribuídas em, praticamente, todas as regiões e condições fitofisionômicas do estado. Foram encontradas populações nos grupos de abrangência de florestas, savanas e, também, em áreas de transição. Na Figura 1, de acordo com os autores

(CHAGAS et al., 2012) podem ser visualizados os principais locais onde foram confirmadas a presença de populações nativas de *Myrciaria dubia*. Ao total foram encontradas plantas em Amajari, Normandia, Bonfim, Boa Vista, Cantá, Caracá, Caroebe e Rorainópolis, totalizando oito municípios do estado.

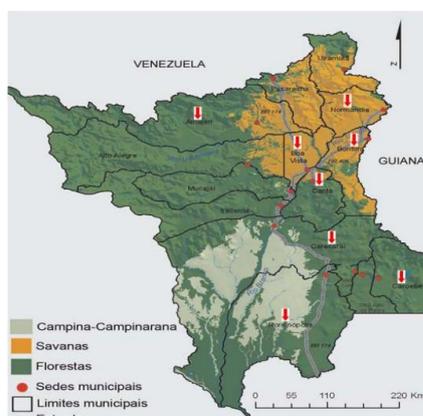


Figura 1: Mapa ilustrando a ocorrência de camu-camu (*Myrciaria dubia*) em diversos municípios do estado de Roraima. As setas indicam os locais de ocorrência. UFRR, Boa Vista-RR, 2012. Fonte: Chagas et al. (2012)

A maioria dos programas de melhoramento de espécies nativas, apresenta grande limitação pela pouca atenção que recebem e escassas experiências de pesquisas, a prospecção, coleção e conservação da espécie através dos Bancos de Germoplasma (BAG) são uma garantia para realizar trabalhos de seleção entre e dentro das progênies, baseado nas características de ideótipos para a utilização comercial dessa fruteira (BARDALES, 2013). De acordo com o autor (BARDALES, 2013) seu potencial econômico está nos mercados de fármacos, cosmético e nutricional, principalmente, no Peru e Brasil.

A planta de camu-camu tem hábito de arbustivo a arbóreo, atingindo de 3 a 8 metros de altura, distribuindo-se de forma agregada nas áreas naturais (SMIRDELE & SOUSA, 2008; YUYAMA, 2011; CHAGAS et al., 2012). Tem sua distribuição entre as regiões oriental do Peru até o Pará e em margens de rios e lagos de água escura como claras na Amazônia (FERREIRA & GENTIL, 2003; DELGADO & YUYAMA, 2010).

Frutos maduros e imaturos, coletados nas margens de lagos naturais no estado de Roraima em maio de 2000, foram avaliados por Smiderle e Sousa (2008), quanto aos parâmetros físicos: peso médio de frutos maduros e imaturos (de vez) em 200 frutos, número médio de sementes por fruto em 500 frutos e o rendimento de polpa em três quilogramas. Bem como a vitamina C, analisada em amostras de polpa de cada estágio de maturação dos frutos de camu-camu.

Os resultados obtidos pelos autores (SMIDERLE & SOUSA, 2008) quanto ao peso médio de fruto maduro foi de 11,8 g e dos frutos imaturos de 9,0 g, apresentando variações desde 3,7 até 17,6 g. Os frutos maduros segundo os autores apresentavam a coloração roxa a vermelho-púrpura enquanto os imaturos tons verdes para vermelho, indicando diferenças de pigmentação ou da menor presença de antocianinas nos frutos imaturos.

Já, quanto ao número médio de sementes, por fruto maduro e imaturo, obteve-se 1,5 sementes. O número de sementes por fruto, que são reniformes com 8 a 16 mm de largura, aplainadas e cobertas por pelos de cor marrom, variou de uma a duas por fruto, que é uma baga esférica apresentando de 10 a 30 mm de diâmetro.

Segundo os autores, os frutos avaliados são um pouco menores do que os 2 a 4 cm de diâmetro encontrados por Villachica (1996), assim como, foi obtido menor número de sementes por fruto do que as verificadas pelo autor (uma a quatro sementes).

No rendimento da polpa, que é ácida, de frutos maduros obtiveram 273,4 g kg⁻¹ de frutos e dos frutos imaturos 190,0 g kg⁻¹, obtendo-se diferença e mostrando que em frutos maduros se obtém maior rendimento.

O teor de vitamina C e características físicas do fruto de camu-camu em dois estádios de maturação quanto ao rendimento nas populações naturais é estimado em 24,57 t ha⁻¹, de frutos (VILLACHICA, 1996), o que resultaria em 6,7 toneladas de polpa de frutos maduros em um hectare ou 5,69 t ha⁻¹ de frutos maduros e imaturos, em média.

Os teores médios de vitamina C obtidos nas análises de amostras de frutos maduros e imaturos foram 2,59 e 2,52 g por 100 g, respectivamente. Os teores foram muito próximos, indicando que mesmo em frutos imaturos o teor de vitamina C (ácido ascórbico) é bastante superior a maioria das plantas cultivadas e que não é diferente em relação aos frutos maduros, nas amostras analisada (SMIDERLE & SOUSA, 2008)

O interesse na exploração de espécies nativas da Amazônia como o cultivo de *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae, planta cuja variabilidade genética é pouco conhecida, vem aumentando acentuadamente nos tempos atuais. Tanto que, estudos para desenvolver a cultura de forma sustentável fora do seu ambiente natural vêm sendo realizados na Amazônia setentrional, estado de Roraima.

Especificamente, na Amazônia setentrional, há ocorrência comprovada de camu-camuzeiros (Figura 2-A) em pelo menos 53 % dos municípios do estado de Roraima. Os frutos têm a forma de uma baga esférica, 10 a 30 mm de diâmetro, cor roxa a vermelho-Púrpura (Figura 2-B), de sabor ácido, massa média de 11,8 g e rendimento médio de polpa em torno de 273,4 g kg⁻¹, segundo Smiderle e Sousa (2008).



Figura 2: Caçarizeiro (A) e frutos (B) coletados em Boa Vista - Roraima, Brasil.

Os frutos (Figura 2-B) vêm sendo prospectados por Chagas et al. (2010) via projeto denominado estudo de biodiversidade e de técnicas convencionais e biotecnológicas visando a domesticação, melhoramento e valorização de fruteiras nativas da Amazônia. Nesse contexto, a gestão da qualidade de produtos e resíduos (remanescentes) é uma necessidade e ao mesmo tempo obrigatória nos dias atuais.

A polpa é um produto de exportação, demandado por alguns países como Estados Unidos, França e Japão (CHAGAS et al., 2012) por conta do potencial nutricional já comprovado, destacando-se o alto teor de ácido ascórbico (vitamina C). Entretanto, é requerido grande quantidade de matéria-prima, frutos (Figura 2-B), para sua industrialização, gerando, muitos resíduos (coprodutos), sementes e cascas (Figura 2), possíveis subprodutos se estudados e valorizados seu potencial.

De algumas frutas como manga, abacaxi e acerola entre outros, cascas e sementes já são definidas como subprodutos gerados durante o processamento do suco, porque possuem componentes orgânicos que se incorporados ao suco alteram o sabor e aparência do produto final (PEREIRA et al., 2009).

De acordo com Pereira et al. (2009), o que distingue resíduo de subproduto é a existência ou não de um mercado definido para sua comercialização. Conforme os autores, os produtos secundários de um processo agroindustrial que são demandados pelo mercado e que apresentam um valor de comercialização definido são chamados de subprodutos e aqueles que não têm potencial mercadológico ou cujo potencial não é efetivamente explorado são chamados de resíduos.

A comunidade científica nacional e internacional vem empregando o termo coproduto, já que é uma palavra que não passa a idéia de algo repugnante ou inútil. A casca e a semente de algumas frutas como manga, abacaxi e acerola entre outros são definidas como

coprodutos gerados durante o processamento do suco, porque estes possuem componentes orgânicos que se incorporados ao suco alteram o sabor e aparência do produto final (PEREIRA et al., 2009).

Neste sentido, para coprodutos provenientes de caçari (*M. dubia*), especificamente as sementes, cognominou-se neste estudo como remanescente bioprocessado com potencial para bioprospecção.

2.5 Princípios, métodos e aplicações biotecnológicas utilizadas em laboratório para caracterização e desenvolvimento de produtos das sementes de *M. dubia*

Tanto para a inovação radical, que envolve descobertas originais, como para a inovação incremental, que pode envolver apenas melhorias em processos já existentes, de acordo com Ferro, (2010) é ideal que os resultados gerados pela biotecnologia sejam eventualmente convertidos em produtos comerciais, fazendo que essa ciência tenha uma forte correlação com o conceito de inovação.

Para tanto, são necessários métodos e aplicações laboratoriais alternativas/indicadoras que foquem a multidisciplinaridade e idealizam a biotecnologia como ciência profundamente orientada pelo método científico. Assim, nesta seção apresenta-se de forma simplificada princípios básicos (Quadro 3), algumas técnicas e métodos já testados em laboratórios, utilizados para avaliação e desenvolvimento de produtos, proveniente, de materiais vegetais.

Quadro 3 - Princípios básicos para execução das atividades necessárias ao atendimento dos objetivos propostos nesta tese.

Áreas	Princípios metodológicos
Biotecnologia	Qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos ou organismos vivos, parte deles ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica (FUNBIO, p2, 2012).
Bioprospecção	Exploração, identificação, coleta e utilização de componente do patrimônio genético, existente no território nacional ou do qual o Brasil é país de origem, em condições ex situ ou in situ, com fins de pesquisa, conservação, aplicação industrial ou aproveitamento comercial, entre outros (FUNBIO, p2, 2012).
Bioprocesso	Conjunto de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima/resíduo, o preparo dos meios, a esterilização e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produto(s) (PEREIRA JR., 2008)

Com relação as técnicas e métodos selecionou-se de acordo com Carvalho (2010), técnicas de processamento de imagens digitais, as quais propiciam uma sensibilidade maior de análise, inerentes a processamento computacional, permitindo a aquisição de características que seriam humanamente impossíveis de serem observadas. Nesse estudo, especificamente, o Sistema para Análise de Sementes (SAS) foi identificado como ferramenta útil para o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e não destrutivos para avaliação da qualidade das sementes.

A análise de imagem tem se revelada uma técnica promissora, principalmente pelo seu estágio de evolução tecnológica, que se reflete em avanços na capacidade de captura, tratamento e interpretação de imagens. Essa rapidez na detecção de imagens digitais e no processamento de dados informatizados, a crescente diminuição dos custos tem tornado sistemas de análise de imagem mais apropriados na avaliação automática da qualidade e classificação de produtos agrícolas (CARVALHO, 2010).

O SAS foi desenvolvido recentemente no Brasil, utiliza a combinação de um módulo de captação de imagens, aliado a um software que utiliza a inteligência artificial para processar as informações coletadas (Tbit-SAS, 2014). Tem capacidade para extrair inúmeras informações como: cor, forma, textura, morfologia e uniformidade de materiais vegetais, como plântulas, folhas, sementes, entre outras, baseado na tecnologia de diagnose por imagens.

Priorizou-se também, a técnica eletroanalítica como Galli et al. (2006), pela rapidez, o baixo custo das análises e a facilidade no manuseio da instrumentação. Isto posto, porque algumas técnicas, como a cromatográfica, embora muito importante de acordo com Galli et al. (2006), em função de sua facilidade em efetuar as separações, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra, dependem de um longo tempo nas etapas iniciais para preparação das amostras, utilizam maior quantidade de reagentes e a instrumentação geralmente é mais dispendiosa financeiramente.

Dentre as principais técnicas de detecção eletroquímica utilizadas, voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial, voltametria de pulso normal, amperometria (GARRIDO et al., 2004; GALLI et al., 2006) selecionou-se as técnicas de potenciometria e a condutimetria, respectivamente, para análise do potencial hidrogeniônico (pH) e Condutividade Elétrica (CE) dos bioprodutos, extratos elaborados para identificação de extratos aquosos e aferição de bioensaios estabelecidos nessa tese. É possível também via método eletroanalítico de condutimetria direta a verificação, de forma rápida, da quantidade de sais minerais dissolvidos, contidos em extratos obtidos a partir das sementes bioprocessadas.

Extratos nesse estudo foram definidos conforme Isaac et al. (2008) como preparados concentrados, de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtidos a partir de material vegetal (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001), usando como solvente etanol, água ou mistura entre eles ou, ainda, outro líquido extrator que seja apropriado ao uso (SCHULZ et al., 2002; ISAAC et al., 2008). Para obtenção do extrato glicólico, o mais usualmente empregado em preparações cosméticas, o material deve ser suspenso em propilenoglicol, veículo que apresenta grande compatibilidade com as formulações farmacêuticas usadas como veículos e excipientes cosméticos (ISAAC et al., 2008).

Nesse sentido, o conhecimento da distribuição granulométrica é, relativamente, útil na indicação da tamisação como o procedimento prévio aos processos, onde a homogeneidade do tamanho de partículas pode interferir. Embora a distribuição seja bimodal, as diferentes partes do material vegetal apresentarão um perfil muito semelhante de distribuição granulométrica, o que faz com que a distribuição da mistura das diferentes partes seja muito previsível (BARNI et al., 2009).

A partir dessas informações, a determinação do rendimento de cada uma das partes e o total, pode ser obtida com base na relação percentual entre a quantidade de produto que saiu do processo e a quantidade de matéria-prima que entrou no processo. Portanto, a avaliação da granulometria (Anexo 1) das sementes bioprocessadas, foi relacionada como técnica metodológica fundamental, importante para elaboração, conservação e estabilidade dos bioprodutos obtidos e bioensaios estabelecidos nesse estudo. Estes, por conta da constatação e indicativos na literatura científica de substâncias ativas e propriedades inseticidas nas folhas e frutos de espécies da família Myrtaceae (IMATOMI et al., 2013, MORAIS et al., 2014).

Priorizou-se, ainda, o infravermelho, método espectroscópico de análise que fornece informações quanto aos grupos funcionais que podem estar presentes na estrutura das substâncias (RIBEIRO & SOUZA, 2007), nesse caso o pó e o óleo extraído das sementes de *M. dubia*. Para tanto, utiliza-se o esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas (Anexo 2), proposto por Ribeiro e Souza (2007).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, G.F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Bioprospecting of marine seaweeds and aquatic plants for controlling the bean anthracnose. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.78-82, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde**. Resolução RDC No. 2, 7 de janeiro de 2002.

AKTER, M.S.; OH, S.; EUN, J.B.; AHMED, M. (2011). Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. *Food Res. Int.* 44:1728-1732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.045>.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p. 364-368, 2007.

ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; MOURA, C.F.H.; ARAÚJO, N.C.C.; ALMEIDA, A.S. Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) Mc Vaugh): A Rich Natural Source of Vitamin C. **Proceedings of Interamerican Society for tropical Horticulture**. v.46, p.11-13, 2002.

ARAGON, C.E. **Desenvolvimento Sustentável da Amazônia**. 2010. http://www.cebri.org/midia/documentos/estudo_amazonia.pdf#page=18. Acesso em junho 2013.

ARTUSO, A. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. **World Development** Vol. 30, No. 8, pp. 1355–1368, 2002.

ASSAD, A.L.D. **Ações e Políticas em Biotecnologia no Brasil** (Material didático). 2013a. Disponível em <http://www.bionorte.org.br/destaques/disciplina-bionegocios-e-marcos-regulatorios-em-biotecnologia.htm>. Acesso em junho 2013.

ASSAD, A.L.D. **Bionegócios e Marcos Regulatórios em Biotecnologia** (Material didático). 2013b. Disponível em <http://www.bionorte.org.br/destaques/disciplina-bionegocios-e-marcos-regulatorios-em-biotecnologia.htm>. Acesso em junho 2013.

BARDALES, R.M.L. **Caracterização intraespecífica da variabilidade biométrica de frutos em populações nativas de camu-camu**. 2013. 42 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR. 2013.

BARNI, S.T.; CECHINEL FILHO, V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista brasileira de farmacognósia**. João Pessoa, v. 19, n. 4, Dec. 2009. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000600012&lng=en&nrm=iso>. access on 10 Mar. 2015.

BERTÉ, K.A.S.; IZIDORO, D.R.; DUTRA, F.L.G; RIBANI, R.H. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Revista Ciência Rural**, v.41, n.2, fev, 2011.

BICAS, J.L.; SILVA, J.C.; DIONISIO, A.P.; PASTORE, G.M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, 2010.

BORGES, C. **Os Spin-Offs Universitários e Seus Componentes Principais. In: Empreendedorismo e estratégia de empresas de pequeno porte.** 3Es2Ps /-. 261 p. (Coleção Empreendedorismo e estratégia; 1). Curitiba:Champagnat, 2010.

BUFFARINI, R. **Trajatória de consumo de frutas, legumes e verduras em adolescentes. Estudo de coorte de nascimento de 1993,** (Dissertação de mestrado) Pelotas-RS / Romina Buffarini. – Pelotas, 67 f. 2012.

CARVALHO, M.L.M. DE. Utilização da Análise de Imagem - Conceitos, Metodologias e Usos. **Informativo ABRATES**, p 45-46. vol. 20, nº.3, 2010.

CASTREE, N. **“Bioprospecting: from theory to practice (and back again)”**. Transactions of the Institute of British Geographers, vol. 28, no 1, pp. 35-55, 2003.

Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). Avaliação de políticas de ciência, tecnologia e inovação, diálogo entre experiências internacionais e brasileiras. Brasília:, 2008. 249 p.; Il.; 24 cm. <http://www.merit.unu.edu/publications/uploads/1308314895.pdf>.

CHAGAS, E.A. Estudo de biodiversidade e de técnicas convencionais e biotecnológicas visando a domesticação, melhoramento e valoração de fruteiras nativas da Amazônia. Projeto - **Macroprograma 2.** Embrapa, 13 p., 2010.

CHAGAS, E.A.; CARVALHO, A.S.; BACELAR-LIMA, G.; DUARTE, O.R.; NEVES, L.C.; ALBUQUERQUE, T.C.S.; Distribuição geográfica de populações nativas de camu-camu no estado de Roraima. In XII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Bento Gonçalves-RS. 2012. **Anais ...** p.3861- 3864, 2012.

COZZI, A.; JUDICE, V.; DOLABELA, F.; FILION, L.J. **Empreendedorismo de base tecnológica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

DELGADO, J. P. M.; YUYAMA, K. Comprimento de estaca de camu-camu com ácido indolbutírico para a formação de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 522-526, 2010.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu; pt.2. p.146, 2001..

FEINSILVER, J.M. Prospección de la biodiversidad: potencialidades para los países en desarrollo. **Revista de la CEPAL**, n.60, p. 111-128, 1996.

FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n.3, p. 440-442, 2003.

FERRO, E.S. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estud. av.**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 109-121, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300008>.

FILION, L.J. Chaire d'entrepreneurship Maclean Hunter: **Guia de - Spin-off de empresas - Em direção a novas formas de práticas empresariais.** Montréal: Transcontinental. 2002.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; BARBERÁN, F.A.T.; Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v.139, p. 578–588, 2013.

FREITAS, A. C.; RODRIGUES D.; ROCHA-SANTOS, T. A.; GOMES, A. M.; DUARTE, A. C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnology Advances**, v.30, n.6, p.1506-1515, 2012.

FREITAS, M.C.S. **Experiência do Estado do Amazonas em política de C&TI.IN: Avaliação de políticas de ciência, tecnologia e inovação: diálogo entre experiências internacionais e brasileiras**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2008. 249 p.; Il.; 24 cm. ISBN 978-85-60755-10-3.

FUNDO BRASILEIRO PARA A BIODIVERSIDADE - FUNBIO. <http://www.funbio.org.br/wp-content/uploads/2012/05/codigo-de-conduta-sobre-prospeccao-biologica.pdf>. Acesso em maio, 2014.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L. H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S. A.S. **Utilização de técnicas eletrônicas na determinação de pesticidas em alimentos**. *Quim. Nova*, Vol.29, No. 1, 105-112, 2006.

GARRIDO, E.M.; DELERUE-MATOS, C.; LIMA, J.L.F.C.; BRETT, A.M.O. Electrochemical methods in pesticides control, **Anal. Letters** 37, 1755-1791. 2004.

GIMENEZ, F.; FERREIRA, J.M.; RAMOS, S.C. **Empreendedorismo e estratégia de empresas de pequeno porte – 3Es2Ps**. 261 p.; 21 cm. (Coleção Empreendedorismo e estratégia; 1). Curitiba, Champagnat, 2010. Disponível em <https://www.editorachampagnat.pucpr.br/ebook/9788572922043.pdf#page=11>. Acesso em julho 2013.

GOUVEIA, F. Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. **Inovação Uniemp**, v.2, n.5, 2006.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. **Elsevier**, v.8, n.3, p.301–306, 2005.

<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2011/janeiro/4a-semana/embrapa-vai-liderar-rede-internacional-de-pesquisa-em-ingredientes-funcionais-de-frutas/acesso> jan. 2012 Acesso em 05.08.2014.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S.C. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta Bot. Bras.**, v.27, n.1, p.54-61, 2013.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008 ISSN 1808-4532.

JUST, K.C.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.50, n.4, p.405-408, 2000.

KROEZE, J.H.A. The perception of complex taste stimuli. In: MCBRIDE, R. L.; MACFIE, H. J. H. Psychological basis of sensory evaluation. **Elsevier Applied Science**, p. 41-68, 1990.

LAIRD, S.A.; WYNBERG, R. **Institutional policies for biodiversity research**, in Sarah A. Laird (ed.): Biodiversity and Traditional Knowledge, Equitable Partnerships in Practice, Londres, Earthscan Publications Ltd, p. 39-76. 2002.

LARUCCIA, M. M. A Gestão da Amazônia: Ações Empresariais, Políticas Públicas, Estudos e Propostas. **R. Inter. Interdisc. INTERthesis**, Florianópolis, v.9, n.1, p.380-383, 2012. Disponível em: < <http://journal.ufsc.br/index.php/interthesis/article/viewFile/1807-1384.2012v9n1p380/22520>> acesso em julho, 2013.

LEMO, L.M. Desenvolvimento de Spin-offs Acadêmicos: estudo a partir do caso da UNICAMP. Reeditado em 11/02/2013. <http://fabianooliveira.wordpress.com/2011/07/20/spin-off-ou-derivagem/> Acesso em junho, 2013.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2002.

LOURENÇO, N.D.; LOPES, J.P.M.A.; ALMEIDA, C.F.; SARRAGUÇA, M.C.; PINHEIRO, H.M. Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: a review. **Analytical and Bioanalytical**, v.404, n.4, p.1211-1237, 2012.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. 129 p.

MARCOVITCH, J. **A Gestão da Amazônia: Ações Empresariais, Políticas Públicas, Estudos e Propostas**. São Paulo: EDUSP, 2011. 312p.

MARQUES, L.G.; SANTOS, M.R.; RAFFO, J.; PESSOA, C. Redes de Bioprospecção no Brasil: Cooperação para o desenvolvimento tecnológico. **RDE – Revista de Desenvolvimento Econômico**. ISSN eletrônico 2178-8022 (números publicados a partir de 2010) ISSN impresso 1516-1684, v. 15, n. 28, 2013. Disponível em <http://www.revistas.unifacs.br/index.php/rde/article/view/2800>. Acesso em abril, 2014.

MEYER, A.S. Enzyme technology for precision functional food ingredient processes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p.126–132, 2010. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05255.x

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros.** Brasília: MMA/SBF, 2002. 404 p.

MORAIS, L.M.; CONCEIÇÃO, G.M.; NASCIMENTO, J.M. Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v 1, n. 01; p.317. 2014.

Spin Off. O que é: Spin Off. <http://www.significados.com.br/spin-off/20jul> (2013).

PEREIRA Jr., N. **Biodegradação de Hidrocarbonetos**, Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ; FAPERJ; CNPq; PETROBRA. Séries em Biotecnologia, v.3, 75 p, 2009.

PEREIRA Jr., N. (editor-autor). **Tecnologia de bioprocessos** / Nei Pereira Jr., Elba Pinto da Silva Bon, Maria Antonieta Ferrara. – Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, Séries em Biotecnologia, v.1, 62 p, 2008.

PEREIRA, L. G. R; AZEVEDO, J. A. G; PINA, D.S; BRANDÃO, L.G.N; ARAÚJO, G.G.L; VOLTOLINI, T.V. **Aproveitamento dos coprodutos da agroindústria processadora de suco e polpa de frutas na alimentação de ruminantes.** Embrapa Semi-árido. 30 p.; Documentos, 220. ISSN 1808-9992, Petrolina, 2009.

PEREIRA, S.L.; DUQUE-ESTRADA, E.O. Biotechnology, biopharmaceuticals for human use and environmental auditing: an important association for Brazil. **Revista Business School São Paulo - BSP**, São Paulo, 2011.

RAUD. C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar: Análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista de Sociologia e Política**, v.16, n.31, p.85-100, 2008.

REED, P. A. Bioprospecting. **The technology teacher**, December/January. 2005, pp. 14-18.

RIBEIRO, C.M.; SOUZA, N.Â. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, 30(4), 1026-1031. 2007.

SACCARO JÚNIOR, N.L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. XIV, n. 1, p.229-244, 2011.

SANTOS, A.S.R. dos. **Biodiversidade, Bioprospeção, Conhecimento Tradicional e o Futuro da Vida.** Disponível em <http://www.ccuac.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html> acesso 28.03.2012.

SANTOS, R.B.; BARBOSA, L. P. J. L.; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: Microorganismos funcionais. **Revista Ciência Equatorial**, v.1, n.2, 2011.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. **Trends Food Science Technology**. v.20, p.376–387, 2009.

SMIDERLE, O.J.; SOUSA, R.C.P. Teor de vitamina C e características físicas do camu-camu em dois estádios de maturação. (Comunicação rápida) **Revista Agro@mbiente**, v. 2, n. 2, p. 61-63, jul-dez, 2008.

SOUSA, B.A.A.; CORREIA, R.T.P. Biotechnological reuse of fruit residues as a rational strategy for agro-industrial resources. **J Tech Manage Innov**, 5: 104-112, 2010.

SOUZA, A. P.; MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; CAPUTO, B. A.; CANHETE, G. M.; LEITE, C. B.; LIMA, D. P. de. Bioprospecting insecticidal compounds from plants native to Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 22, n. 4, Dec. 2008 .Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062008000400024&lng=en&nrm=iso. acesso em 14 Julho 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062008000400024>.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. **Fitoterapia racional: Um guia para as ciências da saúde**. Barueri: Manole, 386 p. 2002.

TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. **Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas**. In: Stadnik, M.J.; Talamini, V. Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. cap. 3, p.45-62.

Tbit -SAS- Sistema de Análise de Sementes www.tbit.com.br/produtos/sas. Acesso em abril de 2014.

VASCONCELOS, R. M. de. **Marco regulatório sobre acesso à amostra de patrimônio genético nativo e acesso ao conhecimento tradicional associado/Rosa Míriam de Vasconcelos**. — Brasília, DF: Embrapa, 2012. 58 p.: il.; ISBN 978-85-7035-098-5.

VILLACHICA, H. **El cultivo del camu-camu en la Amazonia Peruana**. Lima: Secretaria Pro Tempore del Tratado de Cooperación Amazônica, 1996.

World Development, vol. 30, n. 8, p. 1355–1368, 2002.

YUYAMA, K. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 335-690, 2011.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, K.; LOPES, T.M.; FÁVARO, D.I.T.; BERGL, P. C. P.; VASCONCELLOS, M. B. A. et al. Teores de elementos minerais em algumas populações de Camu-Camu. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 33, n. 4, p. 549-554, Dec. 2003 <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672003000400002>.

ZANATTA, C. Determinação **da composição de carotenóides e antocianinas de camu-camu (*Myrciaria dúbia*)**. [s.n.].Dissertação (Mestrado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 2004.

ZAPATA, S.M., DUFOUR, J.P. Camu-camu *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh: Chemical composition of fruit. **J. Sci Food Agric.**, v.61, p.349-351, 1993.

ZYLBERBERG, E.; ZYLBERBERG, C.; ONER, A.C. Biotechnology in Brazil: an industry overview. **Journal of Commercial Biotechnology**, v.18, n.4, p.9-10. 2012.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudos de bioprospecção tecnológica, atividade exploratória em escala laboratorial para descrição, caracterização e verificação do potencial agroalimentar de sementes dos frutos da *Myrciaria dubia* (caçari) da Amazônia Setentrional com vistas a confirmação da viabilidade de produção industrial ou comercial como produto ou processo, a partir de pelo menos um atributo funcional desse componente.

3.2 Objetivos específicos

Estudar a possibilidade de uso da tecnologia de diagnose por imagem como ferramenta auxiliar para descrição e caracterização morfoestrutural automatizada de sementes do caçari;

Utilizar técnicas, métodos e aplicações laboratoriais alternativas/indicadoras que foquem a multidisciplinaridade para caracterização de sementes bioprocessadas e identificação de fontes de compostos com potencial para biotecnologia verde (agroalimentar);

Aprimorar/criar processos de apoio e estratégias específicas que facilitem e consolidem o desenvolvimento de protótipos de bioprodutos/bioprocessos provenientes de sementes bioprocessadas do caçari;

Promover a Utilização Prática da Biotecnologia (UPB) por meio de parcerias tipo *spin-off* como ferramenta de apoio para transformação dos conhecimentos científicos e tecnológicos obtidos em produtos a serem utilizados pelo mercado/industria local.

CAPÍTULO I – DESCRIPTION AND AUTOMATED SEED MORPHOSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh: DIAGNOSIS BY IMAGE

RESUMO: (Descrição e caracterização morfo-estrutural automatizada de sementes de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh: diagnóstico por imagem). O uso da tecnologia de diagnóstico por imagem vem se apresentando como importante ferramenta para uma análise rápida e precisa referente a morfologia e uniformidade de materiais vegetais tais como sementes, frutos e mudas. Assim, neste trabalho objetivou-se descrever e caracterizar as sementes, remanescente bioprocessado, proveniente da extração da polpa dos frutos de *Myrciaria dubia*, utilizados em pesquisas com prospecção tecnológica e processamento experimental em agroindústrias de pequeno porte, como subsidio a produção de mudas de qualidade e uso como matéria-prima para fabricação de novos produtos biotecnológicos na Amazônia setentrional. O estudo foi realizado em dois laboratórios da EMBRAPA Roraima, resíduos e sementes, a partir de dezembro de 2013. Nestes, amostras representativas das sementes de *M. dubia* foram selecionadas e posteriormente, aplicando princípios da técnica de diagnose por imagem foram caracterizadas e avaliadas no Sistema para Análise de Sementes (SAS). As sementes apresentaram 1,72 cm de diâmetro, com um intervalo de 1,50-1,99 cm e 0,49 cm de comprimento. O diâmetro mínimo médio foi de 1,18 cm, com intervalos de 1,01-1,34 cm. Para as cores predominantes, os canais de valores azuis, verdes e vermelhos tiveram os valores de 31,19, 49,69, 87,94, respectivamente, perceptíveis com observações visuais, demonstrando a fase de maturação do fruto. A técnica de diagnose por imagens permitiu a caracterização e classificação morfoestrutural da semente de *M. dubia*, de forma eficiente e eficaz, quando comparada ao método convencional.

Palavras-chave: Amazônia setentrional, camu-camu, qualidade, remanescente bioprocessado, SAS.

ABSTRACT: (description and automated seed morphostructural characterization of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh: diagnosis by image). Use of diagnostic imaging technology has been presented as an important tool for rapid and accurate diagnosis regarding the morphology and uniformity of plant materials such as seeds, fruits and seedlings. Thus, this study aimed to describe and characterize the seeds, remaining bioprocessed, from the extraction of the pulp of the fruits of *Myrciaria dubia*, used in research with technological prospecting and experimental processing in small agro-industries, as a subsidy to production of quality seedlings and use as raw material for the manufacture of new biotechnology products in the northern Amazon. The study was conducted in two laboratories of EMBRAPA Roraima, waste and seeds from december 2013. In these, representative samples of *M. dubia* seeds were selected and subsequently applying principles of image for diagnostic technique were characterized and evaluated in system for Seed Analysis (SAS).The-camu camu seed, showed average diameter 1.72 cm, with amplitudes of 1.50 - 1.99 cm and 0.49 cm. Minimum average diameter was 1.18 cm, with intervals ranging from 1.01 to 1.34 cm. For the predominant colors, blue, green and red channels were the values 31.19, 49.69, 87.94, respectively, with noticeable visual observations, demonstrating the maturation phase. The image for diagnostic technique allowed the characterization and classification of morphostructural *M. dubia* seed, efficiently and effectively compared to the conventional method.

Keywords: Northern Amazon, camu-camu, quality, remaining bioprocessed, SAS.

INTRODUCTION

The use of the image diagnosis technology has been presented as an important tool for diagnosis nowadays both fast and accurate in several areas. It is based on the utilization of high resolution images and techniques of pattern recognition. Based on the use of high resolution and pattern recognition techniques images, which enable uptake , processing and interpretation by software , extracting important data such as : color, texture, shape , morphology and uniformity of seeds , fruits , seedlings and plants, and other plant materials.

In the area of seeds, imaging analysis can be extremely useful. Since the development of simple, fast and non-destructive methods for evaluation of the quality which enables, according to Carvalho (2010), an assessment of the potential of storage or of development in field. Besides the great importance to the establishment of dynamic and efficient quality control programs.

Digital images have been utilized in the ordinary analyses of the quality patterns, because of the possibility of verifying parameters such as size, color and texture, eliminating the subjectivity of the analysis and the dependence on the human visual system which in turn is influenced by the environmental conditions, being able to lead to inconsistencies (Antonelli *et al.* 2004, Du & Sun 2004, Milanez 2013). According to Carvalho (2010), digital imaging processing techniques provide a greater sensitivity of analysis, inherent to the computational processing, allowing the acquisition of characteristics which would be impossible to be observed only by human eyes.

The imaging analysis has proved to be a promising technique, mainly by its technological evolution stage, which reflects on advances in the capacity of image capture, treatment and interpretation. This fastness in the digital image detection and in the informatized data processing, besides the growing decrease of the costs have made image analysis systems more appropriate in the automatic evaluations of the quality and classification of products (Carvalho 2010).

In this sense, the system for Seed Analysis (SAS) recently developed in Brazil, which has the capacity to extract a number of information such as: color, shape, texture, morphology and uniformity, based upon image diagnosis technology.

In regard to fruit of the species *M. dubia* utilized for extraction of pulp are generated skins and seeds, at present, named as remaining bioprocessed or coproduct. These, by definition, are considered raw materials generated from the processing of the products (primary), originated generally from the food, siderurgical and metallurgical industry, among others, according to ANFALPET (2011).

The seeds of *M. dubia* are normally utilized for species propagation (Chagas *et al.* 2012), nevertheless, there is scarcity of more detailed information which provides its identification, preservation, transportation and storage conditions of the sample before analysis, all of them being consistent with the Good Laboratory Practices. In addition, there is not a lot of information of these when characterized as co-products. In this case, namely, raw material generated from the processing of the fruit of *M. dubia*.

The fruit which gives rise to the seeds is known popularly as camu-camu. It is named caçari in the state of Roraima and in other estates of the Amazon region, according to Yuyama (2002) and Bacelar-Lima (2009), it is known as araçá, araçarana, araçazinho, sarão, socoró, azedinha, among others.

So, having on mind that nowadays the choice of a product is essentially motivated by its value and by the beneficial properties related to the same one (Milanez 2013), the

obtaining of methodologies capable of evaluating the quality and authenticity of products in a simple, fast and low cost way becomes necessary.

In this work, it was aimed to describe and characterize the seeds, remaining bioprocessed, from the extraction of the pulp of the fruits of *Myrciaria dubia*, used in research with technological prospecting and experimental processing in small agro-industries, with a view production of quality seedlings and use as raw material for the manufacture of new biotechnology products in the northern Amazon.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in the residues and seed Laboratory, located in the Brazilian Corporation of Agricultural Research, situated at 02°42'30" N and 47°38'00" W, 90 m of altitude with representative samples of seeds *M. dubia* selected from the month of December 2013.

Randomly selected was 1000 g corresponding to 10% of the seed total *M. dubia* samples received at the laboratory waste. From that amount were selected subsamples for use and application of the imaging diagnosis technology: anatomic and pictorial morphological description of the seed of *M. dubia* and iconographic methods for verification of the color, presence or absence of endosperm, the type, the shape and the color of cotyledons.

In the first place, seeds samples were selected, some seeds (Figure 1: A-B) for longitudinal section and consequent visual observation and recording of its features with a digital camera.



Figure 1: Seeds of *M. dubia* (A) samples selected (Sousa, 2013) for morphoanatomical characterization and (B) enlarged seed, showing their dimensions to be measured (Silva, 2014).

Source: Prepared by Sousa and Silva (2015)

In the Seed Analysis System (SAS), the analysis of four parameters was performed, namely: color, geometry, image and texture moments. In this analysis, the combination of image measuring modules, united to an item of software which utilizes artificial intelligence to process the information collected was utilized (TBIT 2015).

In the analysis via SAS, five replications were utilized, each of them being made up of thirty seeds, consecutively distributed onto a tray made with a transparent film, type A4 – 210 x 297 mm at the dimensions of 19 cm x 26.5 cm x 1 cm (Fig. 2).

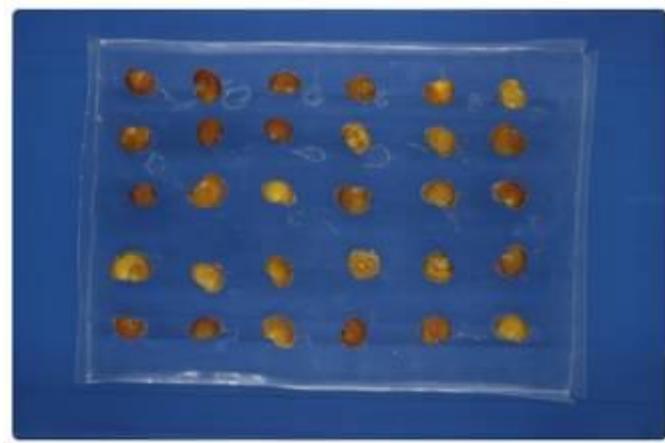


Figure 2: Tray made on transparent film (19 cm x 26.5 cm x 1 cm) containing samples of seeds of *M. dubia* in the measuring modules for analysis in SAS. Source: Prepared by Sousa and Silva (2013).

Afterwards, the process by means of the pre-analysis screen was started by pressing the button “New Analysis in the software”, to present, in real time, the samples which already lay in the measuring modules, making thus the analysis of the questions related to the positioning of the seeds and selection of the analysis setting to be used as well as the exportation of information generated in the system for easier spreadsheets (Fig. 3).



Figure 3: Samples of *M. dubia* seeds distributed on the detail screen of the SAS. Source: prepared by the authors in SAS (2013).

The SAS detail screen allows to access the tools of the system and of exportation of the data: shapes, variables, plots, statistics and colors. After the obtaining of the images (Fig.3), the same ones were decomposed into histograms containing the distributions of the levels of colors allowed to a pixel. Three modules for the color of a pixel were utilized: red-green-blue (RGB), matrix-saturation-intensity (HSI) and shades of gray. The linear discriminant analysis (LDA) was utilized for the development of classification models on the basis of a reduced variable subset.

For selection purposes of variables, two techniques were utilized: the successive projections algorithm (SPA) and the stepwise (SW). Models based upon the partial least square analysis (PLS-DA) applied to the complete histograms (without selection of variables) were also utilized with the comparison purpose.

For presentation of the results, a set of descriptive statistics based on the characteristics drawn formed by the objects (samples) was generated in the SAS. The representations of the geometric information such as perimeter, convex perimeter, maximum diameter, minimum diameter and centroid, are demonstrated in images obtained from the SAS. In these demonstrations, it is also possible to observe a representation of the geometry, LBP histogram and LBP topology of each object (seed) in the study conducted.

Still on the detail screen for obtaining of results of the analysis (Fig. 3), one can select other characteristics to be studied as the variable “color” of the structure of the “hilum” and the variable “texture”, where it is possible to obtain numerical results either singly or grouped in the form of a histogram.

RESULTS

The simplified morphoanatomical of *M. dubia* seed external and internal surface in longitudinal section, obtained via iconographic technique (Fig. 4) showed that the seed has two cotyledons apparently fused. Externally the seed has light brown color, is kidney-shaped, flattened conspicuously with the thin, permeable and absorbent integument, the rough surface covered by a network of fibrils. The hilum is medium sized opaque lateral-ventral, emitting fiber extensions that are dispersed throughout the pulp.

For effects of interpretation of the data obtained via SAS relative to the comprehension of the geometric information (Fig. 5) of the *M. dubia* seed, the perimeter of the object under study (seeds) is defined by the sum of all the sides of the object; the diameter is any straight line passing through the center of a figure and centroid is the point on the inside of a geometric shape that defines its center. However, the LBP topology of each object

of study (seed) is a code that represents the relationship between the pixels. These codes are plotted as a histogram to represent the surface texture (TBIT 2015).

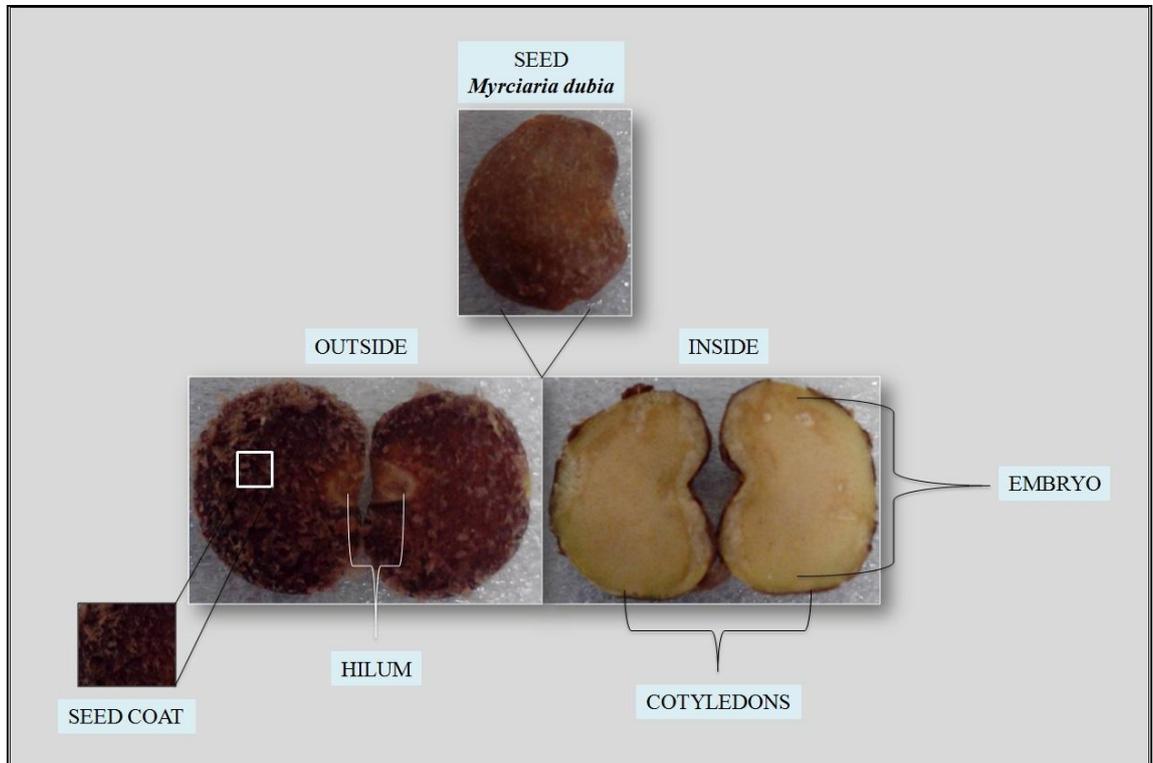


Figure 4: View of external and internal surface of *M. dubia* seed in longitudinal section. Source: Prepared by Sousa, Silva and Bacelar-Lima (2015)

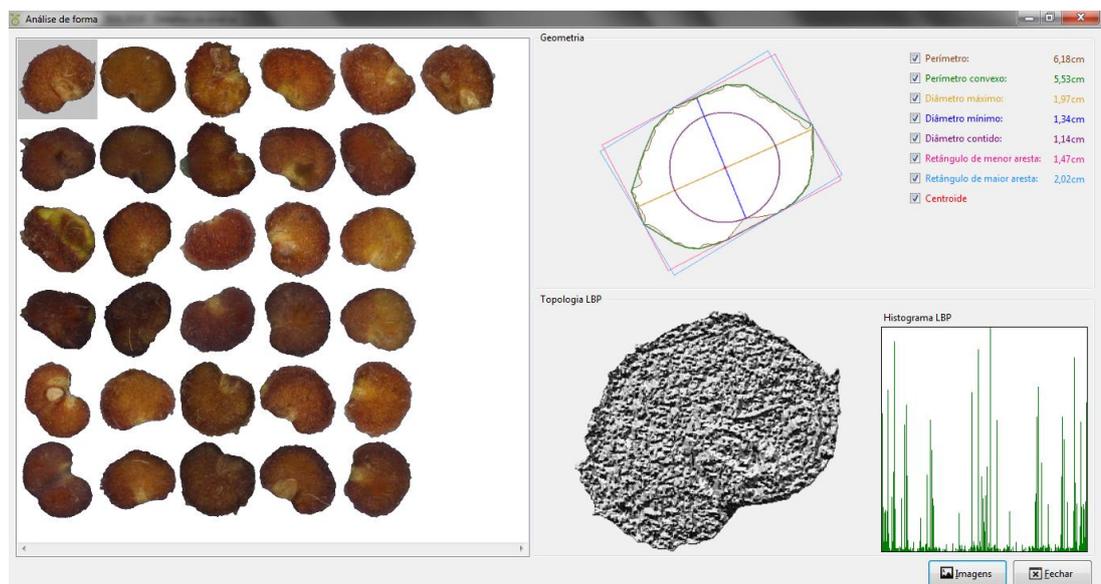


Figure 5: Analysis form: geometry, topology LBP and LBP histogram seeds of *M. dubia in natura* obtained by image selection shown left in the SAS screen. Source: prepared by the authors in SAS (2013).

Topology is one of the newest branches of mathematics and therefore assumes ever-increasing importance in the investigation of the secrets of nature (Borges 2005). It aims at the study of the properties of space free from any idea of measurement. It is popularly called the rubber sheet geometry, or further, geometry without a measurement. Under certain conditions, there is no distinction between a drawing and its copying, even if badly done, a case shown in Fig. 5 with images of *M. dubia* seeds, analyzed in the SAS. It is a case then of describing the space itself and its properties (Valente 2000), for example, a circle is topologically equivalent to an ellipse.

The information obtained for *M. dubia* seed samples (*in natura*) concerning to the size (geometry) in centimeters (cm), predominant color, texture and color variation given in numerical codes (Tab. 1) were extracted or filtered from characteristics listed in the SAS. For the "geometry" are displayed the maximal, minimal diameters and perimeter (cm); the "predominant color" shows channels going on blue, green and red, and still the color variation and the "SFM texture" that displays values for the measures of frequency space and modified frequency. In relation to color and texture, the values (codes) are based on the color chart of plant tissue (Wild & Voigt 1977).

Fig. 5 shows the geometric representation of *M. dubia* seeds: perimeter convex perimeter, maximum diameter, minimum diameter, the centroid. It also presents a histogram LBP and LBP topology of each object (seed *in natura*) study, obtained by image selection indicated left in the SAS fabric. However, camu-camu seeds presented 1.72 cm in mean diameter, with ranges of 1.50 cm - 1.99 cm and 0.49 cm long. The minimum average diameter was 1.18 cm, with the range varying from 1.01 to 1.34 cm.

Table 1: Results of variables selected for *M. dubia* seeds in SAS regarding dimensions (geometry) in centimeters (cm), predominant color, texture, and color variation in numerical codes

Character*		Mean	Desv.			Var.	Max.	Min.	Leng.	Total
			Pad.	Median	Mode					
Geometry	DMA	1.72	0.13	1.72	1.68	0.02	1.99	1.50	0.49	27.47
	DMI	1.18	0.11	1.20	1.15	0.01	1.34	1.01	0.33	18.93
	PER	5.41	0.44	5.45	5.14	0.19	6.12	4.64	1.49	86.55
Color	CAZ	31.19	5.33	30.00	30.00	28.43	43.00	22.00	21.00	499.00
	CVD	49.69	14.92	45.00	45.00	222.63	82.00	30.00	52.00	795.00
	CVM	87.94	27.96	81.50	51.00	781.53	138.00	47.00	91.00	1407.00
Texture SFM	MEF	4.54	0.85	4.30	3.73	0.72	6.23	3.68	2.55	72.70
	MEFM	2.58	0.67	2.30	2.09	0.46	4.19	1.94	2.25	41.22
Color variation		0.06	0.05	0.04	0.11	0.00	0.17	0.00	0.17	0.92

*DMA – Maximum diameter; DMI – Minimum diameter; PER – Perimeter; CAZ – Blue Channel; CVD – Green Channel; CVM – Red Channel; MEF – Frequency space means; MEFM – Modified frequency space mean. For each characteristic; the Mean, Standard Deviation, (SD), Median, Mode, Var. (Variance), Max. (maximum) and Min. (minimum), Leng. (length) and Sum were calculated.

In the analysis, it was observed that for the predominant colors, the blue, green and red channels presented the values of 31.19, 49.69 and 87.94, respectively (Tab. 1). These colors are perceptible with visual observations, showing the maturation stage of the fruit. The variables "frequency space" and "modified frequency" concerning "texture", presented 4.54 and 2.58 as mean values, respectively (Tab. 1).

In Fig. 6 and 7, it is possible to verify the numerical results obtained either singly or grouped in the form of a histogram, relative to the variable "color" of the structure of the "hilum" and the variable "texture" of the samples of seeds of *M. dubia* analyzed via SAS.

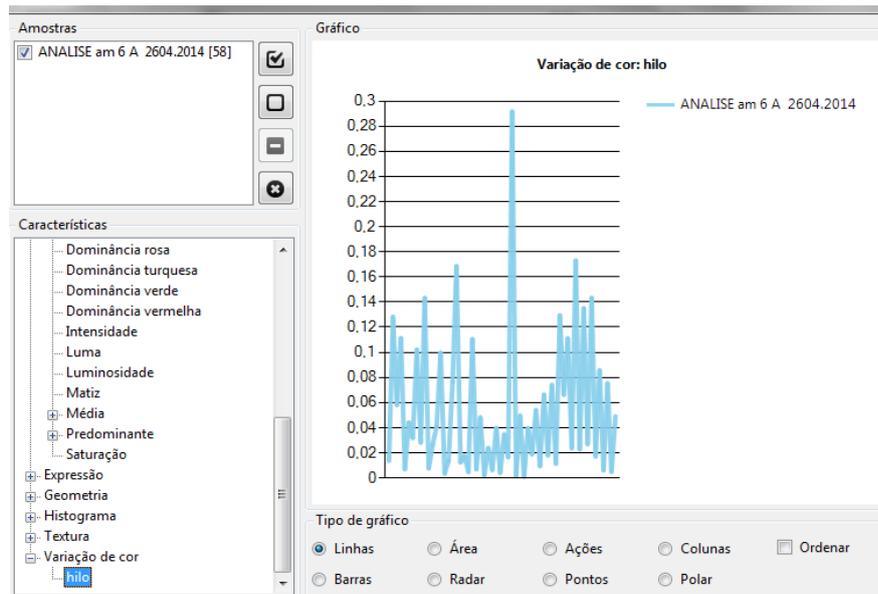


Figure 6: Analysis hilum color obtained in *M. dubia* seed-samples (*in nature*) in the SAS screen. Source: prepared by the authors in SAS (2013).

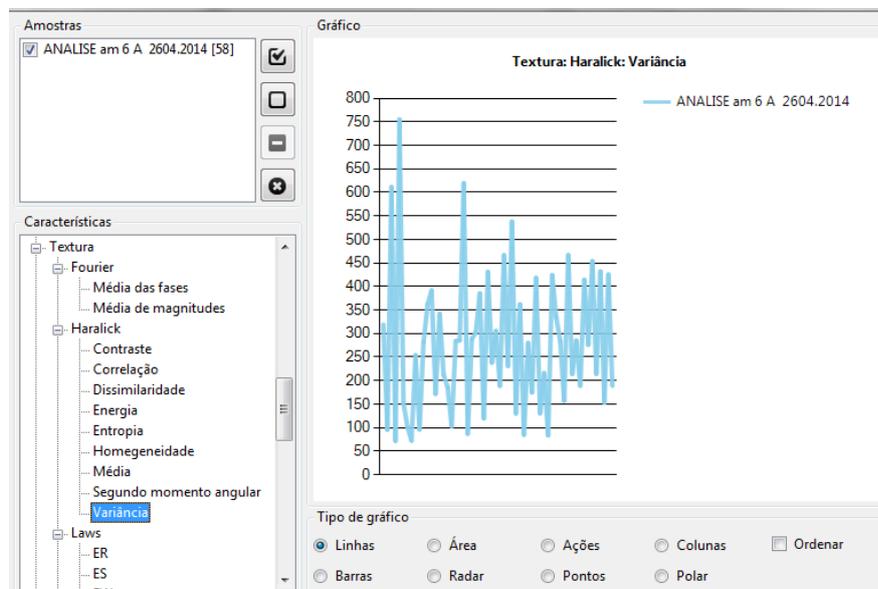


Figure 7: Texture analysis of variance obtained from seeds of wet *M. dubia* (*in nature*) in the SAS screen. Source: prepared by the authors in SAS (2013).

DISCUSSION

Few works such as Villachica *et al.* (1996) and Maciel *et al.* (2009) have covered morphological studies, eco-physiological and histochemical on the primary way of spreading *M. dubia* seed.

M. dubia seed, and in all dicot, has no endosperm developed. The embryo fills its entire volume, with axial position, invaginated, ie, straight, is composed of a green cotyledon mass, massive, thick covering or hiding the hypocotyl-root axis lying around the reserve material stored in bulky cotyledon closed that are very fused to weld, making it difficult to separate without damage (Maciel *et al.* 2009).

By analyzing the SAS it is possible obtain important information characteristics on seed *M. dubia* as "color" and "texture" of the heel, in addition to conventional morphometric analysis. The seeds of camu-camu showed variation in size, feature also observed by Maciel *et al.* (2009), but with lower values which reported to 13.72 ± 1.53 mm length and a width of 10.71 ± 1.48 mm beyond the fresh weight of 1.51 ± 0.96 g. According to Pê *et al.* (2003), the physical characteristics such as seed size and shape are of great interest to the control and equipment automation aiming to improve the product quality and add economic value and, consequently, to reduce the cost of labor and operating time in processing and post-harvest.

These aspects are relevant in the use of techniques utilized in the storage and building of silos and other storage devices of those products, helping in the solution of problems related to heat and mass transfer during the steps of their drying and aeration (Goneli *et al.* 2003).

It was found that the SAS allows numerous morphological and biometric characterization of seed and their structures reliably and in a short time, especially for the work with populations that have several samples to be compared.

Several studies have been conducted to obtain information to assist with the domestication and breeding this species, but according to Soares *et al.* (2013), Sousa *et al.* (2013), Abanto-Rodríguez *et al.* (2014) and Neves *et al.* (2015) there is still need for basic studies on the natural occurrence and distribution areas. As well as reviews of agronomic studies of natural populations of these fruits and systematization of information on this species in the state of Roraima. Therefore, it was found that the diagnosis technology provides the selection matrices for future work at improving and complementing the active species Genebank (BAG).

The images for diagnostic technique allows the characterization and classification of morphostructural *M. dubia* seed, efficiently and effectively compared to the conventional

method. Obtaining information about color, texture, shape, complete geometry, among others, impossible of visual and rapid assessment by existing methods. They are new parameters, important to be added for characterization of product quality.

REFERENCES

- ANFALPET. 2011. Uso de co-produtos na alimentação de cães e gatos. Available from: <http://anfalpet.org.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=868:us-de-co-produtos-na-alimentacao-de-caes-e-gatos&catid=16:noticias-externas&Itemid=1> extraído da Revista Pet Food - Nutrição.vet — Nutrição para cães e gatos na...>. Cited in: 25 April. 2015.
- ANTONELLI, A., COCCHI, M., FAVA, P., FOCA, G., FRANCHINI, G. C., MANZINI, D. & ULRICI, A. 2004. Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm, *Analytica Chimica Acta*, 515: 3.
- BORGES, C. C. 2005. A topologia: considerações teóricas e implicações para o ensino da matemática. *Caderno de Física da UEFS*, 03(02): 15-35.
- BACELAR-LIMA, C. G. 2009. *Estudos da biologia reprodutiva, morfologia e polinização aplicados à produção de frutos de camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh) adaptados à terra firme da Amazônia central/Brasil*. 121 f. Thesis (Botany) – INPA. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- CARVALHO, A. S. 2012. *Ocorrência, distribuição geográfica e estudo fenológico de camu-camuzeiro, Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh no estado de Roraima*. 79 f. Dissertation (Agronomy) – Posagro. Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.
- CARVALHO, M. L. M. 2010. Utilização da Análise de Imagem - Conceitos, Metodologias e Usos. *Informativo ABRATES*, 20(3): 45-46.
- CHAGAS, E. A., LIMA, C. G. B., CARVALHO, A. S., RIBEIRO, M. I. G., SAKAZAKI, R. T. & NEVES, L. C. 2012. Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). *Agro@ambiente*, 6: 67.

- DU, C. J. & SUN, D. W. 2014. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 230.
- GANDRA, A. 2009. Meio Ambiente – Fertilizantes orgânicos reduzirão dependência brasileira de nutrientes. Available from: <<http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=fertilizantes-rganicos-dependencia-brasileira-de-nutrientes&id=010125090114>> . Cited in: 16 Dez. 2014.
- GONELI, A. L. D., CORRÊA, P. C., SILVA, F. S. & MIRANDA, G. V. 2003. Efeito do teor de impurezas nas propriedades físicas de sementes de milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 32., 2003, Goiânia, GO. *Resumos...* Goiânia: SBEA. p. 77.
- MACIEL, L. G. P., GARCIA, M. P. D, RODRIGUEZ, A. A. & SILVA, I. O. 2009. *Anatomia da semente do camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) e sua caracterização morfológica do fruto*. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBPC EM TABATINGA, Tabatinga, Amazonas. Available from: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/tabatinga/resumos/585.htm>>. Cited in: 10 April. 2015.
- MILANEZ, K. D. T. M. 2013. *Classificação de óleos vegetais comestíveis usando imagens digitais e técnicas de reconhecimento de padrões*. 102 f. Dissertation (Botany) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- WILD, S.A.; G.K. VOIGT. 1977. Munsell color charts for plant tissues. Soils Department, University of Wisconsin. Munsell Book Color, 617 Little Britain Road . New Windsor, New York 12553-6148 .
- PÊ, P. R., DUARTES, M. E. M. & MATA, M. E. R. M. C. 2003. Variação das características físicas do feijão macassar em função do teor de umidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 32., 2003, Goiânia, GO. *Anais...* Goiânia: SBEA. p. 791.
- PEREIRA, J. R. N., BOM, E. P. S. & FERRARA, M. A. 2008. *Tecnologia de bioprocessos*. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, Séries em Biotecnologia. 62 p.

ABANTO-RODRÍGUEZ, A. C., CHAGAS, E. A., ALBUQUERQUE, T. C. S., SOUZA, A. G., ARAÚJO, W. F., CHAGAS, P. C., ANDRADE, J. K. C. & SOUZA, O. M. 2014. Crescimento inicial de plantas de camu-camu sob fertirrigação com Potássio em condições de terra firme. *Folia Amazônica*, 23(1): 7-16.

SOARES, J. D. R., RODRIGUES, F. A., PASQUAL, M., NAVES, V. L., CHAGAS, E. A. & ASMAR, S. A. 2012. *Análise histoquímica de sementes de camu-camu* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 32., 2012, Bento Gonçalves, RS. *Anais...* Bento Gonçalves: SBF.... Available from: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77524/1/Joyce-analise-histoquimica-camu-camu.pdf>>. Cited in: 15 May. 2015.

SOUZA, R. C. P., SANTOS, D. C., NEVES, L. T. B. C. & CHAGAS, E. A. 2013. Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. *Revista Agro@mbiente On-line*, 7(3): 366-372.

TBIT. 2015. SAS - Sistema de análise de sementes. Available from: <<https://www.tbit.com.br/>>. Cited in: 15 Jan. 2015.

VALENTE, J. P. 2000. Sobre um modo de transmissão da matemática, Rio de Janeiro. *Caderno Saúde Pública*, 16(2): 561-567.

VILLACHICA, H. 1996. *El cultivo del camu-camu en la Amazonia Peruana*. Lima: Secretaria Pro Tempore del Tratado de Cooperación Amazônica. 95 p.

YUYAMA, K. A., AGUIAR, J. P. L. & YUYAMA, L. K. O. 2002. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina c. *Acta Amazonica*, 32(1): 169-174.

CAPÍTULO II – BIOPROSPECTING TECHNOLOGY APPLIED IN CAÇARI SEEDS (*Myrciaria dubia*) HOW TO BENEFIT BIOPRODUCTS AGRIFOOD DEVELOPMENT

Abstract

The caçari seeds are fruit originated with great economic potential. However, few studies on the technological potential of this species on the shells and especially the seeds, is virtually unknown in Brazil. Therefore, with a view to production, analysis and display of specific new bioproducts for food processing area, currently known as green biotechnology, in the present study was to aim to characterize phenotypically and identify compounds present in seeds in nature and bioprocesses collected caçari (*M. dubia*) in native and experimental research areas via conventional methods and advanced technology from two interconnected stages, pre-established previously, from 2013 to 2015 where an exploratory activity was carried out in laboratory scale (technological Bioprospecting). Was obtained as a result the characterization of fruits and parts, emphasis on caçari seeds of the northern Amazon and the physical, physico-chemical, mineral compounds, bioactive, pigments and main functional groups present in bioproducts, extracts produced powders and oils from bioprocesses seeds. These compounds showed the potential to green or agrifood biotechnology. This allows us to conclude that the seed is a raw material with high potential for use as an enriching agent of food. Bioprospecting are preliminary studies that facilitated the development of new bioproducts and modeling scenarios for Use Practice of Biotechnology (UPB).

Keywords: northern Amazon; exploratory activity; Green Biotechnology, Raw materials; seeds bioprocesses.

1. Introduction

The seeds and bark of various fruits, remnants of the agro-industrial processing, has been studied in various fields of science in search of full potential exploitation, mainly in the form of bioproducts, called by various companies, such as products made from renewable resources agriculture, forestry and aquaculture, via biotechnological processes.

The bioproducts currently exhibit economic and operational characteristics that provide advantages over chemical processes conventionally used (Sousa, 2013), for example, the production of metabolites of industrial interest, obtained from the remaining reuse of waste and / or agro-industry by-products available abundantly in other regions of Brazil (Maciel, 2006), for example, in the Amazon.

The *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, internationally known as camu-camu and Northern Amazon as caçari, is present throughout the Amazon. It is a small shrub (3-8 m tall), dispersed in the central region of the state of Pará to the Peruvian Amazon. It is found in its natural state on the edge of the creeks and rivers or permanently flooded regions (Zanatta, 2004).

Specifically in the northern Amazon, prospected by Chagas et al. (2010) since 2010, there occurred proven caçarizeiros at least 53% of the municipalities of Roraima. It has great economic and nutritional potential proven, especially the high content of vitamin C, as found in fruits, to 7,355 mg of ascorbic acid per 100 g⁻¹ pulp (Chagas et al., 2015). However, in literature, it was found that there are few studies on the technological potential of *M. dubia* on the shells, and especially the seed. This has an equivalent weight ranging between 14 and 27% of the total fruit weight (Yuyama et al., 2011). Therefore, it is estimated up to 270 kg of seeds only, for each ton of processed fruits, a greater appreciation of this byproduct / waste being necessary.

Thus, the seeds of *M. dubia*, called this work as bioprocessed remaining (RB), could be used as a base / raw material for the manufacture of new products with high added, own value for industrial or commercial production.

In this case, to confirmation and feasibility of an industrial or commercial production, the generated product or process from a functional attribute of this component is first mentioned conducting technological bioprospecting, an exploratory activity in laboratory scale (Sousa et al., 2014). It is important and necessary, as it helps to use Practice of Biotechnology (UPB) in the development of bioprocesses and bioproducts, in its various aspects (Sousa et al., 2015),

to offer, for example specific products and services to the agri-food area, referred to as green biotechnology (green biotechnology, 2016).

In this sense, the present study was to aim to characterize phenotypically and identify compounds present in fruits seed *Myrciaria dubia* bioprocessadas via conventional and advanced technological methods, with a view to production, analysis and display of specific new bioproducts for food processing area, now called like green biotechnology.

2. Materials and Methods

2.1 Collection procedures the plant material and development of bioproducts

The study was conducted from 2013 to 2015 and was divided into two stages named: characterization of seeds caçari and identification of sources of compounds and bioproducts with potential for green biotechnology.

The bioproducts were developed from conducting different experiments / activities developed in this paper on the three aspects: systematic and legal operation, location and evaluation. The systematic and legal exploitation was carried out through observations of the legal measures of sustainability and environmental preservation, appropriate and necessary. Already the location of the raw material was carried out from the project called the study of biodiversity and conventional and biotechnology techniques aimed at domestication, improvement and evaluation of native Amazonian fruit (Chagas et al., 2010).

As for evaluation of seeds (raw material) of caçari were fruits collected from natural populations, as mapped by the research team, in eleven areas (63%) of occurrence (Amajari, Boa Vista, Bonfim, Cantá, Caracaraí, Caroebe, Iracema, Mucajaí, Normandia, Rorainópolis and São Luis de Anauá) (Chagas et al., 2015), and experimental areas belonging to the experimental Field of Serra da Prata Embrapa Roraima, located in Mucajaí, state of Roraima, northern Amazon.

Also samples were collected from branches of flowering plants in order to herborization, which were submitted to the authentication process in the Department of Botany, UFRR, Boa Vista-RR and deposited in the herbarium, in the form of dried specimens with six samples, obtaining the tumble number 4922-4927.

After collection, the fruits of caçari were properly packed in Styrofoam box with ice and transported to the Laboratory Center of Embrapa Roraima for carrying out activities on the identification of steps of sources of compounds and bioproducts with potential for green biotechnology.

2.2 Characterization of the seed caçari

Initially, fruit samples caçari originating from the collection of native populations in Roraima. Were subjected to biometric evaluation by quantifying the fruit mass (g), seed, bark, pulp and juice. Finally, also held biometrics seeds using a digital caliper for comparison and validation of biometric characterization of the same with the System for Seed Analysis (SAS) and also for obtaining phenotypic information relating seed samples fresh and bioprocessadas. The design was completely randomized with five replicates and 100 fruits per repetition.

For analysis of seeds in the SAS, the samples were processed in different ways, five treatments: T1 - composed of mature wet seed; T2 - pre-dried seeds circulation air oven at $65^{\circ} \text{C} \pm 5^{\circ} \text{C}$; T3 - pre-dried and peeled from its protective film, that is, only the grains; T4 - Semi-mature seeds moist and; T5 - semi-mature moist seeds and peeled from the protective film.

The seed samples, separated according to each treatment were placed into tray made of transparent film, type A4 - 210 x 297 mm in dimensions of 19 cm x 26.5 cm x 1 cm for image analysis via SAS (System Seed analysis), as Sousa et al. (2015).

2.3 Identification of sources of compounds with potential for bioproducts and green biotechnology

The preparation of samples for potential compounds with sources of identification for green biotechnology was performed using the Standard Operating Procedure (SOP) simple (Sousa et al., 2014.). Consists of five steps: a) pre-treatment; b) inspection; c) preparation; d) repair and maintenance and e) safety measures. From this procedure it was obtained bioprocessado material in powder form originating from seeds with and without film being part of this material. kept for a year at an average temperature of $\pm 25^{\circ} \text{C}$. These were analyzed in specialist laboratories to obtain bioprospecting information on the physical, physico-chemical, sources of formula (bioelements, trace elements, bioactive and pigments) and main functional groups present in these bioproducts.

Also, they were used / adapted protocols and analysis methods in biotechnology laboratories for analysis of protein, carbohydrate and vitamin C as Univates (2014); IAL (2008) and the Brazilian Pharmacopoeia (ANVISA, 2010) for bioprospecting and comparative analysis of seeds in nature and bioprocessadas the caçari.

The analysis of the metabolic intermediates, biomolecules, was carried out from samples prepared and processed in powder form, obtained via sieving, as Standard Operating

Procedure (SOP) used in specialized laboratories of the Brazilian Agricultural Research Company in Roraima. Then was obtained by triplicate, pH (acidity), water content and mineral constituents of the powders, based on dry matter, obtained via conventional methods (stove and oven) recommended by the Brazilian Pharmacopoeia (Brazil, 2010).

They were also performed phytochemical through phytochemicals tests to detect the presence of classes of secondary metabolites (bioactive), specifically phenol, by the method described by Matos (1997). These tests were based on visual observation of color change or precipitate formation after addition of specific reagents.

Furthermore was quantified pigments seeds in natura, due to the importance of this characteristic in identifying compounds with potential for green biotechnology as a function of the fruit harvest stage (mature, immature, semi-mature). Quantification of the content of photosynthetic pigments was carried out through indirect measurement of chlorophyll content in seeds in natura chlorophyll meter SPAD-502 equipment (Soil and Plant Analysis Development), Minota (1989).

It was also used infrared spectroscopy, fast and simple instrumental technique for identification of functional groups present in the molecule bioprocessed seeds and the fixed oil extracted from these. Therefore, there was a spectrophotometer FTIR Shimadzu, Prestige 21 model in the region 4000-400 cm^{-1} , KBr absorption spectra pads in the infrared region and used the summary correlation tables of frequencies existing stretch and consolidated in the literature to identify the main functional groups.

2.4 Statistical analysis

The results for the steps and set phases are shown via descriptive statistics in tables, graphs and descriptive measures. And they were submitted as necessary to analysis of variance by F test and Tukey test at 5% probability and regression using the program SISVAR (Ferreira, 2011).

3. Results

The caçari seeds had an average mass of 1.39 g (Table 1), higher (0.52 g) was found by Bardales et al. (2014) in the Peruvian Amazon. According Tango et al. (2004) generally, the physical parameters of the fruits vary among species and genetic varieties, according to degree of ripeness, as shell thickness, diameter of the fruit and their respective weights (masses), and the determination of their income on pulp.

Table 1. Mass (g) of fruit, peel, pulp, ripe juice and mature seeds collected in the fruiting period caçari the occurrence areas in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.

Variables	n = (500)					
	Minimum	Maximum	Median	Standard deviation	Sample Variance	Trust level (95,0%)
Whole fruit	8,37	11,53	10,02	1,58	2,51	3,94
Peel	2,24	2,57	2,39	0,17	0,03	0,41
Pulp	3,18	5,21	4,20	1,02	1,03	2,52
Juice	1,63	2,49	2,03	0,43	0,19	1,07
Seeds	1,26	1,60	1,39	0,18	0,03	0,45

However, it is possible that there differences in income between the fruit of the same species according to the variety and may have different size and mass of pulp, peel and seeds different (Tango et al., 2004). Indeed verified in this study, a variation in seed weight (Table 1), above 37% when compared to related and average values obtained by Bardales et al. (2014) in the Peruvian Amazon, another occurrence of locality of the species. And yet, variability around 12% in the yield of these (Table 2).

Table 2. Mass variation (%) in the peel, pulp, juice and mature seeds (M) and semi-mature (SM) in three caçari the occurrence of areas in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.

Areas	Place of occurrence	Trat	Peel	Pulp	Juice	Seeds
1	City of Cantá (Lago do Preto)	1M	26,76	37,97	15,04	20,23
		1SM	31,31	37,35	6,71	24,63
2	City of Caracarái (Corredeiras do Bem-Querer)	2M	21,34	43,24	16,63	18,79
		2SM	24,80	42,87	6,40	25,93
3	City of Boa Vista (Lago da morena)	3M	23,38	41,49	13,81	21,33
		3SM	23,17	32,70	16,71	27,42
Median		-	25,13	39,27	12,55	23,06
Standard deviation (S)		-	3,53	4,05	4,77	3,43
Variance (V)		-	12,45	16,44	22,73	11,79

With respect to other parameters, the variability is observed (Table 2) depending on the area of occurrence and degree of maturity of the fruits of caçari and parts, corroborating the study Nunes et al. (2014), specifically the seeds, and genetic variability interaction, this variability with their places of occurrence, which may hinder the standardization of these as raw material for the preparation of very uniform bioproducts. For, according to Milanez (2013), the choice of a product is mainly driven by its value and the beneficial properties related to the same, requiring methodologies able to assess the quality and authenticity of these simple, quick and inexpensive (Milanez, 2013).

In evaluating the physical characteristics (mass, length, diameter, etc.) of fruit caçari and parts, seeds, specifically, the problem is the delay in obtaining results, which is also obtained

by using equipment manual measurement as the caliper, for most of measures. Thus, in this study it was found and tested alternative methods for evaluating the above physical characteristics, among others. In Figures 1 and 2 contains the results obtained via SAS. These are listed and presented the results in the extraction of digital images on samples treated in different ways. They include, geometry and numerical values on the perimeter, the convex perimeter, maximum diameter, minimum diameter, and LBP and LBP histogram topology seed fresh and bioprocessadas the caçari.

In T1, T2 and T3, respectively, are inter-related, mature, wet seed (in natura) (A), pre-dried ripe (B) and ripe peeled predried (grains) (C) (Figure 1). And T4 and T5 treatment, the wet semi-mature seeds (A) and peeled semi-mature seeds (grains) (B), both in nature (Figure 2).

In Figures 1 and 2 could be observed in the form of images (LBP topology), the caçari seeds (*M. dubia*) have no endosperm, regardless of degree of ripeness, corroborating Maciel et al. (2009), which classifies them as exalbuminous, ie have no albumen and therefore the food reserves are concentrated in the cotyledons.

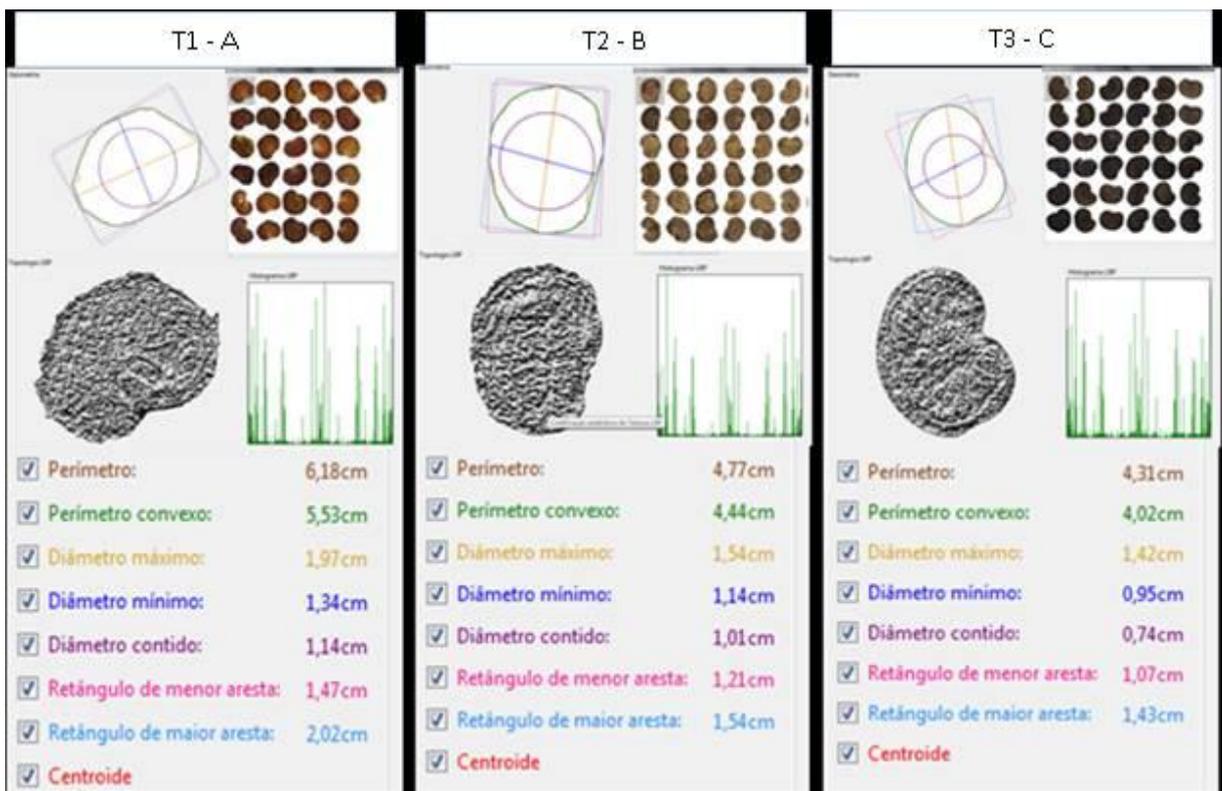


Fig. 1 - Geometry, topology and histogram LBP extracted in the selection of images of wet ripe caçari seeds (A); pre-dried ripe (B); and pre-dried ripe peeled from the protective film (grains) (C).

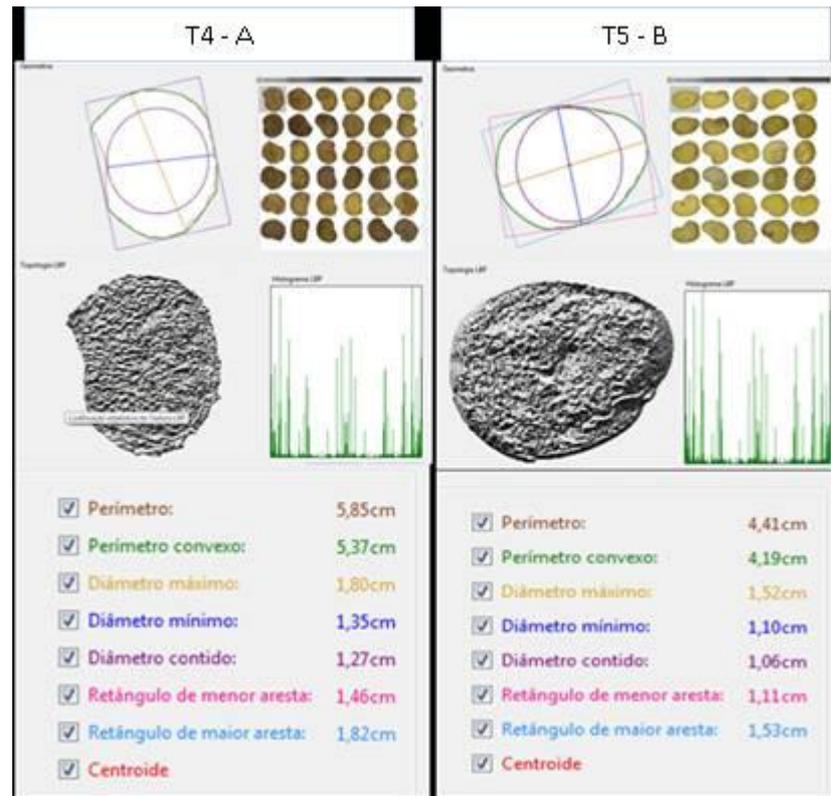


Fig. 2 - Geometry, topology and LBP histogram extracted by the image selection wet seeds of semi-mature caçari (A) and peeled semi-mature seeds (grains) (B).

It was observed in the obtained images (Figures 1 and 2) externally seeds, fresh, wet mature (Figure 1A), pre-dried ripe (Figure 1B) and wet semi-mature (Figure 2A), display color variability and form in the sample itself perfectly related values in the histogram shown in Figures 1 and 2. In some characteristics, as previously verified by Maciel et al. (2009) as brown, reniform shape and conspicuously flattened.

According to Villachica et al. (1996) and Maciel et al. (2009), the seed has roughened surface covered by a knitted white fibrils, confirming the images obtained in the topology way, except the color of the fibrils. The embryo cotyledon is comprised of a mass green and could be clearly observed in the image of Figure 2B. Its format, the image topology, even when the seed is bioprocessada (Figure 1C).

Figure 3 shows the values of the geometric dimensions measured in centimeters (cm) seven variables selected from the SAS and related in Figures 1 and 2, a comparative analysis of the five treatments established in this study and also the statistical statement obtained in a comparative analysis SAS, automated method (a) and caliper / manual method (B), specifically the first treatment is shown in Figure 3B.

In Figure 3A it was observed that both treatments differ in the geometric dimensions, expected behavior due to the pre-processing performed and the difference in the degree of maturation of seeds. The general trend is that there is loss of income, depending on the type of bioprocessing. However, the proposal established as acceptable for use in the plant material.

In the process of promising compounds sources identification for green biotechnology it has been found that the dehydration process has been suggested by some researchers (Fracassetti et al., 2013), as an alternative for obtaining açari of ingredients in the form of powder may be used to preserve the nutritional value, vitamin C and bioactive compounds, among others to be used in various food products. In this work, we obtained bioproducts in powder form originating from seeds with and without film (SBCP and SBSP) and found to yield seed dehusked (Table 3) after preservation for a year at an average temperature of 25° C.

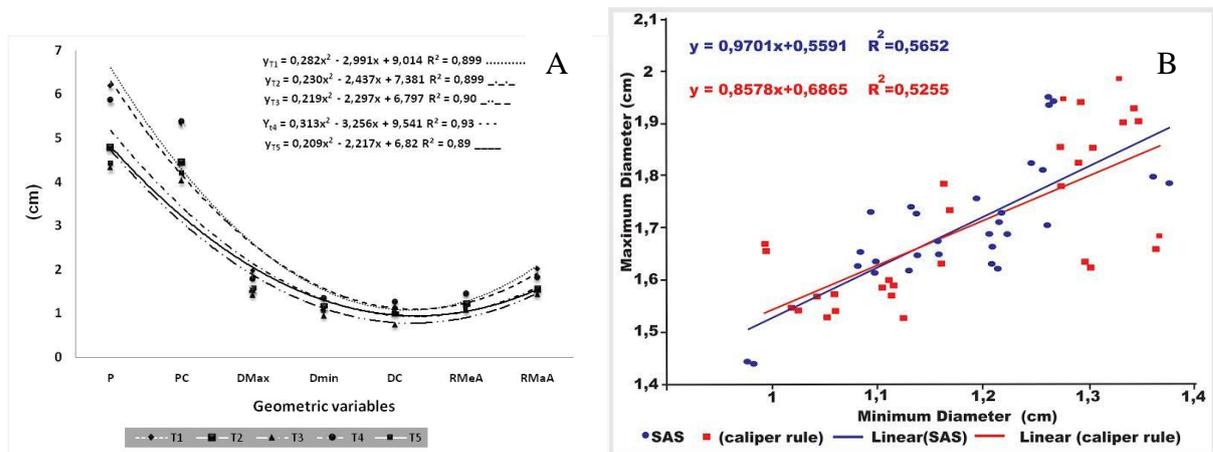


Fig. 3 - Comparative analysis of the treatments applied açari seeds related to geometrical dimensions in centimeters (cm) of seven variables selected in the SAS (A) and benchmarking between automated method (SAS) and caliper / manual method (B).

Legend: (P - Perimeter, PC - convex perimeter; DMax - Maximum diameter; DMin - Minimum diameter, DC - convex diameter; RMeA - Rectangle lower edge; RMAA - Rectangle larger edge).

Table 3. Income obtained in filmless açari seeds of bioprocessing, kept for a year at an average temperature of 25 ° C in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.

Repetitions	Am. uniform (%)	Am. retained (%)	Am. Lost (%)	Time (min:seg)
Median	97,9	1,88	0,22	43:11
Mediana	97,85	1,80	0,23	43:20
Standard deviation (S)	0,26907	1,8618	0,22405	00:30

Regarding the physical, physico-chemical and sources of compounds identified in bioprospecting analysis of seeds in nature and bioprocessadas the açari are shown in Table 4

mean values obtained from representative samples of caçari the occurrence areas in the northern Amazon.

Regarding the fixed mineral residue RMF, Table 4, the determination of this provides an indication of the wealth of mineral elements in the sample (MAPA, 2001). The SBCP and SBSP the caçari showed average values of 0.54% and 2.36%, respectively, of fixed mineral residue, with significant difference between them, and found the following minerals, listed in descending order: Ca > K > P > Mg > S > in > Mn > Fe > Zn > Cu (Figure 4A), in approximate results SBCP and higher in the SBSP obtained in the acerola seed flour (0,44g.100 g⁻¹) by Aguiar et al. (2010).

Table 4. Average values related to physical, physical-chemical and metabolic intermediates, bioelements, trace elements and bioactive compounds in bioproducts (SBCP and SBSP) seeds of caçari in the northern Amazon, Roraima State, Brazil.

Determinations	Treatments					
SBCP*.....		SBSP**.....		
	MPS***	MS****		MPS	MS	
	(60±5°C)	(60±5) a (110°C)		(60±5°C)	(60±5) a (110°C)	
	Min	Max		Min	Max	
Hydrogen potential (pH)	3,7	Nd	Nd	4,1	Nd	Nd
Density (g/cm ³)	0,78	Nd	Nd	0,86	Nd	Nd
Lost moisture a 60±5°C (%)	4,75	Nd	Nd	5,34	Nd	Nd
Moisture lost between 65 and 110°C (%)	3,85	Nd	Nd	4,24	Nd	Nd
Total moisture 110°C ±5°C (%)	8,60	Nd	Nd	9,60	Nd	Nd
Protein (%)	5,81	Nd	Nd	7,59	Nd	Nd
total lipids (etheral extract)	0,82	Nd	Nd	3,13	Nd	Nd
Total carbohydrates (sugars) (%)	83,73	Nd	Nd	76,66	Nd	Nd
Total solids (Dry matter) (%)	91,40	95,96	100,00	90,42	95,52	100,00
Total mineral residue (%)	0,54	0,57	0,59	2,36	2,49	2,61
Mineral insoluble residue (%)	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,06
Soluble mineral residue (%)	0,50	0,52	0,55	2,31	2,44	2,55
Bioelements.....					Bioactive compounds	
Primary	Carbon (C) (%)	Nitrogen (N) (%)	Phosphorus (P) (%)	Sulphur (S) (%)	Total polyphenol (PT) (mg 100 g ⁻¹)	
SBCP	53,04	1,01	0,05	0,02	5000	
SBSP	52,00	1,32	0,09	0,01	4000	
Secondary	Sodium (Na) (mg 100 g ¹)	Potassium (K) (%)	Calcium (Ca) (%)	Magnesium (Mg) (%)	Vitamin C (C ₆ H ₈ O) (mg 100 g ⁻¹)	
SBCP	7,80	0,13	0,78	0,05	16,42	
SBSP	7,90	0,87	0,71	0,08	14,08	
Trace elements (mg 100 g ¹)	Manganese (Mn)	Copper (Cu)	Iron (Fe)	Zinc (Zn)	Boron (B)	
SBCP	7,50	1,00	7,50	2,80	1,00	
SBSP	9,40	1,10	6,30	3,10	1,00	

SBCP*= Seeds bio processed bio unpeeled; SBSP**= Seed peel bio processed without; MPS***= Almost dry vegetable matter; MS****= Dry vegetable matter; Min= Minimum; Max = Maximum; Nd= not determined.

In Figure 4 it can be seen comparatively mineral elements and pigments found in bioprocessadas seeds (SBCP) and without film (SBSP), and in Table 4 it can be seen by classes the bioelements, trace elements and also one of the compounds major bioactive been found in fruits, seeds bioprocessadas also identified in the caçari, presenting a considerable amount of phenolic in comparison to others.

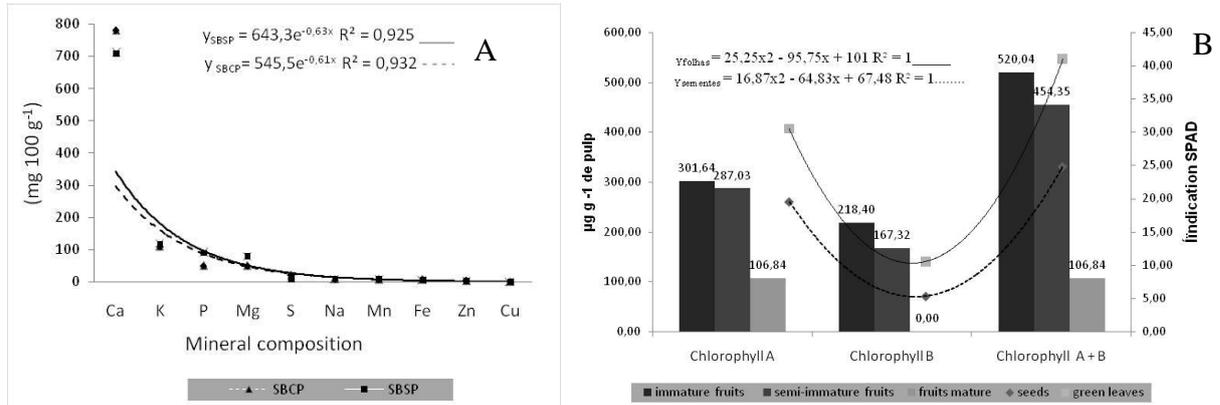


Fig. 4 - Mineral composition (A) in SBCP and SBSP and pigment content in seeds in nature and leaves correlated to the levels found in the fruits of caçari at different stages (B).

We obtained also via Infrared Spectroscopy (IR), information about the functional groups present in the structure of substances of byproducts produced from the seeds caçari, powders and oil extracted from powders. We obtained two infrared spectra, shown in Figure 5.

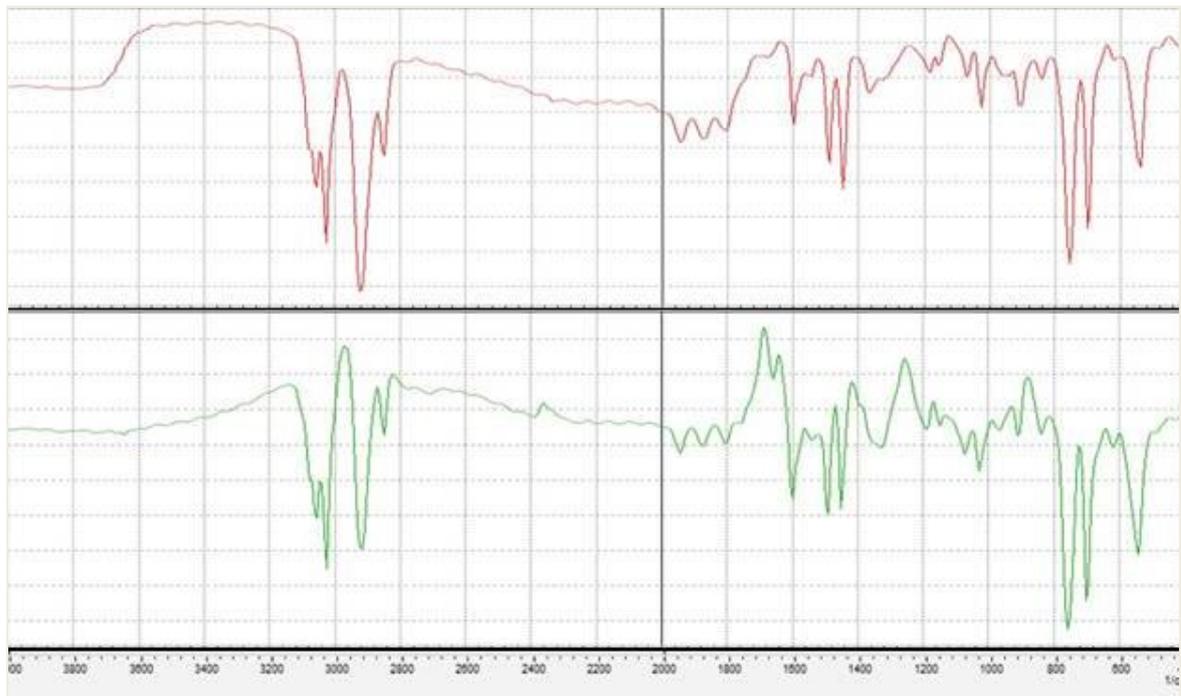


Fig. 5 - Spectrums of the powder (A) and oil (B) extracted from the seeds caçari spectroscopy in the infrared region (IR).

This could be observed qualitatively green-oil spectra (Fig. 5A) and pink powder (Fig. 5B) does not show significant differences. Expected results because the oil is extracted directly from the dust of caçari seeds. Note, therefore, that there was no environmental interference in the process of extraction of the products.

4. Discussion

Regarding LBP topology used in image extraction characteristics of caçari seeds, SAS describes the space itself and its properties as proposed by Valente (2000), where under certain conditions, there is no distinction between a drawing and copying, even if poorly made, for example, a circle is topologically equivalent to an ellipse. If observed in the form of images - LBP topology, Figures 1 and 2 seeds analyzed using SAS.

The topology is engaged in the study of the properties of space, free from any idea as and when coupled to the operator Local Binary Pattern - LBP (local binary pattern), SAS uses it as a specific technique for binarization for fast imaging. According Linares (2013), LBP is a local measurement technique multiresolution texture obtained by a binary code that describes the local texture in a circular neighborhood of radius R. In this case, according to Linares (2013), LBP histogram obtained for each image and texture feature vector of the picture and it can be compared with the feature vector of another image.

Thus, among the information obtained (Figures 1 and 2) in the treatments performed, it was found that the seeds in natura caçari showed 1.72 cm mean diameter, with amplitudes of 1.50 cm - 1.99 cm and 0.49 cm long. The minimum average diameter was 1.18 cm, with amplitudes ranging from 1.01 to 1.34 cm. This variation in size was also observed by Maciel et al. (2009), with lower values (length 13.72 ± 1.53 mm and a width of 10.71 ± 1.48 mm).

Work carried out by Embrapa Roraima since 2009, has shown that caçari seeds can present a wide phenotypic variation expressed in different forms, such as coloring, pasta, fruit and seed size, number of seeds per fruit and productivity (Chagas et al., 2012; Chagas et al., 2013).. The comparative data presented show this variation, geometric specifically (Figure 3) between the sampled seeds, a characteristic proven by different expertise. In statistical evaluation concerning the methods used, SAS and caliper, the linear regression was obtained in SAS $R = 0.752$, with estimated standard error = 0.080 and $R = 0.725$ Caliper, estimated standard error = 0.105. These results showed no significant difference between them (Figure 3B). Therefore satisfactory and possible indication of the use of SAS as an alternative tool to replace the manual method for physical characterizations of caçari seeds. Paradoxically, the displayed phenotypic variations (Figure 3A and 3B), most of the

components of the seeds do not differ qualitatively from constituents found in other plant parts, only quantitatively. The fruits of *M. dubia* (çaçari) have important sources of different bioactive compounds and good source of minerals such as sodium, potassium, calcium, zinc, magnesium, manganese and copper (SCHWERTZ, 2012).

In this sense, in their studies Ribeiro et al. (2016) identified the presence of these elements in the mix of peel and pulp of native fruits of çaçari collected in 2012, the banks of the middle Rio Branco in the northern Amazon (Roraima). Just have not yet been found, in literature, in the same place, and for specific studies on the seeds in nature and much less bioprocessadas whose purpose is checking the technological potential for the production of bio-products, which are presented in this paper.

The results (Table 3) and the yield of the raw material of bioprocessadas çaçari seeds are satisfactory, around almost 100%, demonstrating that the applied drying and conservation were effective, as recommended by Simões (2007). It has been found in studies by Maeda and Andrade (2003) and Zanatta et al. (2005), that the pH of the fruits of *M. dubia* (çaçari) was between 2.4 and 3.2. The seeds analyzed (Table 4) showed higher pH, between 3.7 and 4.1. Both results are satisfactory, present acidic state, desirable technological feature in the delimitation of the time and the type of heat treatment for industrial processing (Maeda et al., 2006) and is a limiting factor for the growth of pathogenic bacteria and spoilage.

With respect to density, the physical characteristics analyzed, it was found to bioproducts, and SBCP SBSP (Table 4) less than 10% difference between them. And, above 25% when compared to the values obtained by Akubor and Ukwuru (2003) study the functional properties of soy flour and cassava respectively 0.58 g / cm^3 and 0.63 g / cm^3 . According to Almeida et al. (2007), when used with a flour finer grain size, the same volume will be busy, but with greater weight, generating higher density, which was confirmed in this study.

The density is one of important measures related to the physical properties, being widely used, according to Caesar et al. (2004) to distinguish a pure material as a crude (or alloy of the metal) as the density of the materials are not pure (mixtures) is a function of its composition, as well as in the identification and quality control a certain industrial product and still be related to the concentration of solutions (extracts), purpose of this study. Moreover, as the amounts or masses to be behaved in a certain utensil vary depending on the density of each food or preparation, the obtained measurement values can help when purchasing equipment (Almeida et al., 2007).

In general it is necessary to also quantify and identify factors as temperature, exposure to light, humidity, time and method of collection of plants, methods of drying, packaging,

storage and transportation, for example, which may affect the material press and therefore, the quality and stability of the extracts (Brandão, 2007), as well as sprayed.

Among these, according to Costa et al. (2008), the moisture content (water) flour is one of the parameters that should be tightly controlled, since this parameter appears as one of the main chemical reactions acceleration factors causing changes in the nutritional, organoleptic and technological characteristics of the products when not observed and applied the appropriate recommendations.

The total water content obtained (Table 4) for the two bioproducts showed satisfactory results for the condition. These were lower the maximum moisture value meal (15%) allowed by current legislation (BRAZIL, 2005), corroborating Faroni et al. (2007), where mention that moisture content (water) below the maximum allowed normally ensure the preservation of the quality of flour during commercial storage. proven results in this study. And yet with the recommendations of the Brazilian Pharmacopoeia (2010) establishing an 8 track limit to 14% residual moisture to plant drugs.

Therefore, according to Vasconcelos et al. (2011) these data are significant factors, as they will influence the conservation process, which combined with proper storage, maintain the quality of plant species, stability and preservation of its therapeutic properties.

In this sense, the seeds have been studied as the chemical composition of its reserves and such interest, not only gives for its nutritional content, but to be useful in the manufacture of industrial products (Buckeridge et al., 2004; Corte et al., 2006), among many other purposes.

Moreover, the study of the chemical composition is of practical interest of seed technology, because both the force for the seed storage potential is influenced by the content of the present compounds (Carvalho and Nakagawa, 2000; Corte et al., 2006). Thus, in Table 4 can be seen, too, the results related to metabolic intermediates (biomolecules), the study of bioproducts of caçari seeds, kept for a year at an average temperature of 25° C.

Lipids are one of the important biomolecules found in vegetables and occur more frequently in seeds, fruits and leaves (AOQUI, 2012). These, along with proteins, nucleic acids and carbohydrates are essential components of biological structures, and are part of biomolecules group (Monteiro et al., 2000). Thus, there are seven categories at the same time are considered important components of the human diet: carbohydrates, proteins, lipids, water, ions (minerals), vitamins and nucleic acids (MICOCCHI, 2014). Of these, carbohydrates, proteins and lipids are the major storage substances in seeds according to (Corte et al., 2006). The results (Table 4) with SBCP and SBSP confirmed this postulate.

The caçari seeds even when bioprocessadas and preserved for a period of one (1) year showed good protein source 5.81 and 7.59%, respectively, and SBCP SBSP (Table 4), with values

higher than those obtained by Chagas et al. (2015) in the fruits at different stages of maturation, averaging 1.24% crude protein. Also the higher protein results obtained by Vieira et al. (2008) in the sleeve bran residue (3.87%) and Boari Lima et al. (2008) (1.17%) in seeds jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg). Only SBSP, it was found that the results obtained protein (7.59%) are similar to those obtained for maize flour or maize flour (7 and 8%) and those obtained by Lousada Jr. et al. (2006), about 10.54% for the acerola seed flour and yet for the byproducts of some fruits such as pineapple (8.35%) and guava (8.47%).

Regarding the levels of lipids and carbohydrates in both SBCP seeds as in SBSP, showed better results (Table 4) those obtained by Chagas et al. (2015) in fruit caçari, averaging 0.25% and 3.34%, respectively. Superior also only in SBSP (3.13%) to the lipid content observed by Borges, Bonilha and Cordeiro (2006) for the flour jackfruit seeds (1.13%) and both (SBCP and SBSP) of Boari Lima et al. (2008) with jabuticaba seed (0.58%). On the other hand, lower than the average content of lipids (3,92%) was found by Aguiar et al. (2010) in acerolas seed, but higher in carbohydrates (83,73 and 76,66%) compared with the same (57.24%), significant amount, as well as compared to recognized and consumed food, cited in RFN (2016) as oats (68%), wheat (70%), corn, rye and barley (73%) and also similar to rice value (77%) of the SBSP (76.66%).

Consequently, SBCP and SBSP the caçari also showed high total solids content (91.40 and 90.42%) similar to that obtained by Aguiar et al. (2010) in the acerola seed flour (90.60%) and Vieira et al. (2008) at Bran mango by-product (92.23%). Besides being superior, to that described by other authors (Lousada Jr. et al, 2006; Aguiar et al, 2010) evaluated seed flour of various species of fruits and observed values from 30 to 86.3%.

According to Lousada Junior et al. (2006) and Aguiar et al. (2010), the high dry matter content (total solids) found allows the product to be stored for long periods provided it is suitably packaged, since they are influenced by the drying exposure time and the storage conditions.

With respect to mineral composition SBCP and SBSP the caçari analyzing the results obtained (Figure 4A and Table 4), it was found that these did not differ significantly from each other, and that among others listed bioelements, can be considered an excellent source of calcium (Ca). This was what stood out most in both treatments applied, 780 and 710 mg 100 g⁻¹, respectively, than many types of food related in Table Food Composition (UNICAMP, 2006) as cow's milk with 130 mg 100 ml⁻¹ and mozzarella with 467 mg 100g⁻¹ and higher than that obtained in chia seed, 525 mg 100g⁻¹ (Ferreira, 2013) and linseed flour seed, 211 mg 100g⁻¹ (Moura 2008).

Samples of SBCP and SBSP the caçari also showed higher mean values ($10.5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) Iron (Fe), around 31% when compared to the average levels found by Buzzo et al. (2012) $5.4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ and $4.7 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ Fe, respectively, to wheat and corn flour. stood out also as to the contents of sodium (Na), 7.8 and $7.9 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ and manganese (Mn), 7.5 and $9.4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Table 4) as compared to the results obtained by Ferreira (2013) in chia seeds, 10.1 ; 5.1 ; $5.4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, respectively, Fe, Na, and Mn.

With respect to the pigments values obtained in the seeds in natura caçari in Figure 4B when recorded the amount of chlorophyll (Chl) A, B and the total (A + B) in the seeds in nature extracted from fruits of caçari considered stage Mature, it was noted that the highest concentration of these pigments is correlated to the average values obtained by Chagas et al. (2015) in the semi-unripe fruit. Regression analysis applied to the data of Chl A and B, the equation of the polynomial type (Figure 4B) allowed visualization of a different and meaningful behavior in caçari leaves related to chlorophyll results in immature fruit.

The caçari seeds showed Chl values A, between 200 to $300 \text{ ug } \text{g}^{-1}$ Approximate values obtained by Chagas et al. (2015) tending to the immature fruit and semi-immature. Since the Chl B was obtained values from 0 to $100 \text{ ug } \text{g}^{-1}$, half of the value for the semi-unripe fruit. Since the Chl total (A + B) gave values between 300 and $400 \text{ ug } \text{g}^{-1}$, slightly below those obtained for the semi-unripe fruit. So realize that the caçari seeds have different fruit maturation stage (Figure 4B), which may influence the composition of minerals to be obtained in the processing of these, if not observed the ideal period of maturation of both fruits and seeds.

What about the bioactive compounds related also in Table 4, the average content of total polyphenols, obtained for SBCP and SBSP the caçari was $5000 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, values above obtained by Jauregui et al. (2009) in the bark, $2293.57 \text{ mg of Ac. gallic } 100 \text{ g}^{-1}$, Sotero Solis et al. (2009) and Fracassetti et al. (2013), seeds of *M. dubia*, 2969.20 and $4007.95 \text{ mg of Ac. gallic } 100 \text{ g}^{-1}$. And even five times greater than the value obtained in the pulp ($1260.73 \text{ mg Ac. Gallic } 100 \text{ g}^{-1}$) by Barreto et al. (2013).

Since vitamin C, it was found that SBCP SBSP and do not differ (Table 4). However, both did not show a significant content of this vitamin, as is found in the pulp and peel of fruits of caçari Chagas et al. (2015), currently up to $7,355 \text{ mg of ascorbic acid per } 100 \text{ g}^{-1}$ pulp but had mean ($15.25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) larger than other seeds such as linseed, $0.50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

The obtained spectra (Figure 5) to allow the principle determining the presence and structure of the organic material without the molecular formula as Ribeiro guidelines and Souza (2007) and further information about the main functional groups present in the structure of substances of bioproducts dust and oil.

In the infrared spectrum (Figure 5) it was possible to distinguish some important regions: the first of between 3000-2800 cm^{-1} which is observed absorption band characteristics of symmetric and asymmetric vibration methyls and methylenes groups. In the region 1600-1450 cm^{-1} of the spectrum is where often there is overlap of various absorption bands can be shifted to lower wavelength values, which is characteristic of the stretching of the C = C aromatic groups.

The absorption situated between 1700 and 1600 cm^{-1} is characteristic of the stretching of the carbonyl (C = O) which with axial deformation vibration of C = O bond which appears in the region between 1300 and 1000 cm^{-1} suggests the presence of acid carboxylic acids and esters linked to aromatic groups. And in the region from 1000-700 cm^{-1} supposed to be verified the presence of olefins, and still indicative of aromatic substitution of the ring in the region 700-400 cm^{-1} .

It was also observed comparing with other spectra, the absence of strong band in the range of 1820-1650 cm^{-1} , the presence of bandwidth in the range of 3650-3200 cm^{-1} band in the range of 3100-2800 cm^{-1} , weak bands in the range of 2300-1900 cm^{-1} band, and 1560 to 1350 cm^{-1} . In this case, the existence of hydrocarbon functions is possible (HC), carboxylic acid, Amide, Ester, NO_2 , and Phenols in the molecular structure of the substance in question. The results of this analysis are consistent with those obtained in Table 4, with significant values that suggest the wealth of phenolic groups and carbonylic in bioproducts.

The seed of caçari (*Myrciaria dubia*) proved to be a raw material with high potential for use as an enriching agent of food. Bioprospective are preliminary studies that facilitated the modeling scenarios for Use Practice of Biotechnology (UPB,) the development of new bioproducts. The bioprocessed seeds present compounds with potential for green or agrifood biotechnology, should be clearly observed their purposes.

5. Acknowledgments

The authors thank BIONORTE, CNPq, CAPES, EMBRAPA, and UFRR for providing the financial and technical support for this work.

6. References

- Aguiar, T. M., Rodrigues, F. S., Santos, E. R., & Sabaa-Srur, A. U. (Agosto de 2010). Caracterização química e avaliação do valor nutritivo de sementes de acerola. *Nutrire:rev. Soc. Bras. Alim.*, 35(2), 91 - 102.

- Akubor, P., & Ukwuru, M. (2003). Functional properties and biscuit making potential of soybean and cassava flour blends. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 1-12.
- Almeida, D., Nunes, I. L., & Andrade, L. L. (s.d.). *Técnica Dietética I. Aula Prática de Mensuração de Alimentos 2007.2*. Acesso em 2 de março de 2016, disponível em http://www.dieteticai.ufba.br/Temas/PESOS%20MEDIDAS/Aula_Pr%C3%A1tica_Mensura%C3%A7ao_alimentos.pdf.
- Aoqui, M. (19 de junho de 2012). Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático e Mutagênese Em Ratos Wistar. 122f. Mato Grosso do Sul.
- Bardales, A., Pisco, E., Flores, A., Mashacuri, N., Ruiz, M., Correa, S., et al. (2014). Semillas y plántulas de *Myrciaria dubia* "camu-camu": biometría, germinación y crecimiento inicial. *Scientia Agropecuaria*, 5(2), 85-92.
- Barreto, A. G., Cabral, L. M., & Matta, V. M. (2013). Clarificação de polpa de camu-camu por microfiltração. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16(3), 207-215.
- BIOTECNOLOGIAVERDE*. (s.d.). Acesso em 5 de Abril de 2016, disponível em http://observatorio.bioemprende.eu/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=64&Itemid=87&lang=es&limitstart=5
- Boari Lima, A. J., Corrêa, A., Alves, A., Abreu, C., & Dantas Barros, A. (2008). Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(4), 416-421.
- Borges, S. L., Bonilha, C. C., & Cordeiro, M. (2006). Sementes de jaca (*artocarpus integrifolia*) e de abóbora (*curcubita moschata*) desidratadas em diferentes temperaturas e utilizadas como ingredientes em biscoitos tipo cookie. *Alim.Nutr.*, 17(3), 317-321.
- Brandão, M. G. (2007). *Produção de chás e extratos de plantas medicinais, MG. IEF/CETEC*. Dossiê Técnico, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, P. e. (3 de junho de 2005). Instrução normativa nº 8, 03 jun. 2005. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo*, 91p. 2005, Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 263, de 20 de setembro de 2005. (23 de setembro de 2005). *Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos*. Brasília: Diário Oficial da União.
- Buckeridge, M. A., & Tiné, M. (2004). *Acúmulo de Reservas. In: Germinação. Do básico ao aplicado*. (A. GuiFerreira, & F. Borgheti, Eds.) Porto Alegre: Artmed.

- Buzzo, M., Carvalho, M., P., T., Arauz, L., Arakaki, E., & R., M. (2012). Monitoramento de farinha de trigo e de milho fortificadas com ferro. *Rev Inst Adolfo Lutz.*, 71(4), 645-649.
- Carvalho, J., & Nakagawa, J. (2000). Sementes: ciência, tecnologia e produção. *Jaboticabal: Funep*, 588p.
- Castilho-Almeida, E. W., Santos, H. F., Miranda, A. M., Ado, F., Erlon, H. M., Achete, C. A., et al. (2012). Estudo teórico e experimental de espectros infravermelho de ésteres de ácido graxo presentes na composição do biodiesel de soja. *Quím. Nova*, 35(9), 1752-1757.
- César, J. P. (2004). Determinação da densidade de sólidos e líquidos. *Chemkeys*, 1-8.
- Chagas, E. (2010). Estudo de biodiversidade e de técnicas convencionais e biotecnológicas visando a domesticação, melhoramento e valoração de fruteiras nativas da Amazônia. 13p. Projeto - Macroprograma 2. Embrapa.
- Chagas, E. A., Lima, C. G., Carvalho, A. S., Ribeiro, M. I., Sakazaki, R., & Neves, L. (2012). Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mcvaugh). *Agroambiente*, 6, 67.
- Chagas, E. A., Ribeiro, M. I., Souza, O., Santos, V. A., Lozano, R. M., & Lima, C. B. (2013). Alternatives substrates for production of seedlings camu-camu. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 56, 6-12.
- Chagas, P. G. (2015). Caracterização centesimal e compostos bioativos de frutos de taperebá em diferentes estádios de maturação. *Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças, 001. Anais*.
- Corte, V. B. (2006). Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (LEGUMINOSAE-CAESALPINOIDEAE). *Sociedade de Investigações Florestais*, 30(6), 941-949.
- Costa, M. G., SOUZA, E. L., STAMFORD, T. L., & ANDRADE, S. A. (março de 2008). Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 28(1), 220-225.
- FARINHAS: de Trigo, de outros cereais e de outras origens*. (14 de Abril de 2016). Fonte: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/98.pdf
- Faroni, L. R. (2007). Qualidade da farinha obtida de grãos de trigo fumigados com dióxido de carbono e fosfina. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.*, 6(2), 115-119.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência & Agrotecnologia*, 35(5), 1039-1042.
- Ferreira, T. R. (2013). Caracterização nutricional e funcional da farinha de chia (*Salvia hispanica*) e sua aplicação no desenvolvimento de pães. *Tese de Doutorado*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

- Fracassetti, D., Costa, C., Moulay, L., & Barberán, F. (2013). Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139, 578-588.
- Imatomi, M., Novaes, P., & Gualtieri, S. C. (Março de 2013). Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. *Acta Bot. Bras.*, 27(1), 54-61.
- Jauregui, A. M., Ramos-Escudero, F., Ureta, C. A.-O., Castaneda, B. C., & Caparo, F. L. (2009). Evaluacion de compuestos con actividad biologica en cascara de camu camu (), guinda (), tomate de arbol () y carambola l. cultivadas en Peru. *Rev Soc Quím Perú.*, 75(4).
- Linhares, O. A. (2013). Segmentação de imagens de alta dimensão por meio de algoritmos de detecção de comunidades e super pixels. *Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação.*
- Lousada Júnior, J. E., Costa, J. M., Neiva, J. N., & Rodriguez, N. M. (2006). Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Rev. Ciênc. Agronômica*, 37(1), 70-76.
- Lutz, I. A. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. (N. S. Odair Zenebon, Ed.) São Paulo: Instituto Adolfo Lutz (IAL).
- Maciel, G. M. (2006). Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. *Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos*, 129p. Universidade Federal do Paraná.
- Maciel, L. P. (2009). *Anatomia da semente do camu-camu (Myrciaria dúbia (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) e sua caracterização morfológica do fruto*. Acesso em junho de 2014, disponível em <http://www.sbpcnet.org.br/livro/tabatinga/resumos/585.htm>.
- Maeda, R. N., & Andrade, J. (2003). Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amazonica*, 33(3), 489-498.
- Maeda, R. N., Pantoja, L., Yuyama, L. K., & Chaar, J. M. (2006). Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 70-74.
- MAPA/SDA/CGAL. (2001). *Laboratório de Produtos de Origem Animal. Método de Ensaio - MET. Determinação do Resíduo Mineral Fixo em Leite e Derivados*. Acesso em 28 de 04 de 2016, disponível em Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS.: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/Metodos%20IQA/POA/Leite%20e%20Produtos%20Lacteos/MET%20POA%2013%2002%20Residuo%20Mineral%20fixo.pdf.
- Matos, F. (1997). *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: UFC.

- Micocci, L. (2015). Físico-química biológica / Unidad 9. Biomoléculas: carbohidratos, proteínas, lípidos 96 y ácidos nucleicos. 21p. Universidad Nacional del Litoral.
- Milanez, K. D. (2013). Classificação de óleos vegetais comestíveis usando imagens digitais e técnicas de reconhecimento de padrões. *Dissertação de Mestrado*, 102. João Pessoa.
- Monteiro, C. A., A Benício, M., Conde, W., & Popkin, B. (2000). Shifting obesity trends 100 in Brazil. *Eur J Clin Nutr.*, 54, 342-346.
- Moura, N. (2008). Características físico-químicas, nutricionais e sensoriais de pão de forma com adição de grãos de linhaça (*Linum usitatissimum*). *Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)*, 95p. Universidade de São Paulo.
- Nunes, C. F., Pio, L. A., Pasqual, M., Santos, E. G., & Chagas, E. A. (2014). Diversidade genética de acessos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) baseado em marcadores ISSR. In: *XXIII Congresso Brasileiro de Fruticultura*.
- Revista Funcionais Nutraceuticos. Aveia: um cereal polivalente. 8p.* (05 de abril de 2016).
Fonte: http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/92.pdf
- Ribeiro, C. M., & Souza, N. Â. (2007). Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. *Quim. Nova*, 30(4), 1026-1031.
- Ribeiro, P. F., Stringheta, P. C., Oliveira, E. B., Mendonça, A. C., & Sant'Ana, H. M. (2016). Teor de vitamina C, β -caroteno e minerais em camu-camu cultivado em diferentes ambientes. *Ciência Rural*, 46(3), 567-572.
- Sanitária., A. N. (Ed.). (2010). *BRASIL. Farmacopeia Brasileira* (5 ed., Vol. 1). Brasília: Fundação Oswaldo Cruz.
- Saúde., B. M. (23 de setembro de 2005). Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. *Aprova o Regulamento Técnico sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais*. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Schwartz, M. C., Maia, J. R., Sousa, R. F., Aguiar, J. P., Yuyama, L. K., & Lima, E. S. (2012). Efeito hipolipidêmico do suco de camu-camu em ratos. *Rev. Nutr.*, 25(1), 35-44.
- Simões, C. e. (2007). *Farmacognosia. Da planta ao medicamento*. editora da UFSC.
- Sotero Solis, V., Silva Doza, L., Garcia De Sotero, D., & Iman Correa, S. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.). *Rev. Soc. Quím. Perú[online].*, 75(3), 293-299.
- Sousa, R. C., Bacelar-Lima, C. G., Silva, M. R., Smiderle, O. J., & Chagas, E. A. (2015). Automated morphostructural description and characterization of seeds of *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh: image diagnosis. *Rev. bras. biociências. [online]. (Não publicado - Em avaliação)*.

- Sousa, R. C., Chagas, E. A., Lima, C. G., & Vale, H. S. (2014). Valoração tecnológica de Coprodutos provenientes da bioprospecção técnico-científica de camu-camu (*Myrciaria dubia*) (Kunth.)McVaugh. *IX Semana Nacional de Ciência e Tecnologia no Estado de Roraima – SNCT-RR*.
- Sousa, R. C., Santos D. C., N. L., & Chagas, E. A. (2013). Tecnologia de bioprocessamento para produção de alimentos funcionais. *Revista Agro@mbiente On-line*, 7(3), 366-372.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. (2006). Acesso em 02 de 05 de 2016, disponível em UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP).: http://www.unicamp.br/nepa/.../taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf.
- Tango, J. S., Carvalho, C. R., & Soares, N. B. (2004). Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 6(1), 17-23.
- UNIVATES. (2014). *UNIVATES. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana*. (R. A. (Org.), Ed.) Lajeado: Editora da Univates.
- Valente, J. P. (abr-jun de 2000). Sobre um modo de transmissão da matemática. *OPINIÃO. Cad. Saúde Pública*, 16(2), pp. 561-567.
- Vasconcelos, A. L., Feitosa, E. A., Silva, M. M., Xavier, H. S., & Randau, K. P. (2011). Controle de qualidade físico-químico e legalidade de matéria-prima vegetal e produto acabado contendo ipê-roxo (*Tabebuia* sp.). *Rev. Bras. Farm.*, 92(3), 155-159.
- Vieira, P. A., Queiroz, J. H., Albino, L. F., Moraes, G. H., Barbosa, D., Müller, E. S., et al. (2008). Efeitos da inclusão de farelo do resíduo de manga no desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias. *Rev. Bras. Zootec.*, 37(12), 2173-2178.
- Villachica, H. (1996). El cultivo del camu-camu en la Amazonia Peruana. Lima. *Secretaria Pro Tempore del Tratado de Cooperación Amazônica*.
- Yuyama, K., Yuyama, L. K., Valente, J. P., Silva, A. C., Aguiar, J. P., Flores, W. B., et al. (2011). *Camu-camu Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh*. (1 ed.). Curitiba: CRV.
- Zanatta, C. (2004). Determinação da composição de carotenóides e antocianinas de camu-camu (*Myrciaria dubia*). [s.n.]. *Dissertação (Mestrado)*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.

CAPÍTULO III - SAIS MINERAIS EM EXTRATO AQUOSO DE COPRODUTOS DA *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae

Abstract: The camu-camu of fruits (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh, Myrtaceae) arising from Amazonia, are considered a major source of vitamin C in the world. There are still important sources of different bioactive compounds and good source of minerals such as sodium, potassium, calcium, zinc, magnesium, manganese and copper. However, the processing of these fruits for extraction of the pulp, the product of greatest interest to many consumption, creates an effective quantity of different wastes, solid and liquid, capable of utilization for various uses its technological potential is studied. Thus, this work aimed at determining, quickly, via direct conductometric electroanalytical method, the amount of dissolved minerals contained in the aqueous extract of processed seeds and peels, coproducts of *Myrciaria dubia*, with potential use in the area of biotechnology development. The samples used for the study come from the experimental processing of fruit camu-camu. Three coproducts (byproducts/waste) named: CF, CS and SSC also processed via Standard Operating Procedure (SOP) created in our own laboratory for the study of organic waste. Analyzing the results obtained it was found that the samples CF and SSC showed higher electrical conductivity, which characterizes them as a rich source of electrolytes, showing greater ability to exchange ions to the solution, which can be characterized as a nutrient solution. Conductivity values obtained from samples from CF, CS and SSC outweigh some brands of bottled water sold in the Brazilian market, ranging from 32 to 72% when compared to the highest value obtained, 408,0 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 25°C, considered as a nutrient solution of high value rich in minerals. The conductometry technique was effective for rapid determination of total dissolved coproducts of processed fruit samples camu-camu minerals. It also made possible by the high mineral contents, characterize them as nutrient solution, with potential for exploitation in the area of biotechnology development.

Keywords: Amazon; camu-camu; biotechnology development; seeds; nutrient solution.

Resumo

Os frutos do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) oriundos da Amazônia, são considerados como uma das maiores fontes de vitamina C do mundo. São ainda importantes fontes de diferentes compostos bioativos e boa fonte de minerais, tais como sódio, potássio, cálcio, zinco, magnésio, manganês e cobre. Entretanto, no processamento destes frutos, para extração da sua polpa, produto de maior interesse para diversos consumos, é gerado um quantitativo efetivo de diferentes resíduos, sólidos e líquidos, passíveis de aproveitamento para diversos usos, se estudado seu potencial tecnológico. Assim, neste trabalho teve-se por objetivo determinar, de forma rápida, via método eletroanalítico de condutometria direta, a quantidade de sais minerais dissolvidos, contidos em extrato aquoso de sementes e cascas processadas, coprodutos da *Myrciaria dubia*, com potencial de aproveitamento na área de desenvolvimento biotecnológico. As amostras utilizadas para o estudo são oriundas do processamento agroindustrial experimental dos frutos de camu-camu. Três coprodutos (subprodutos/resíduos) denominados: CF, CS e SSC, processados igualmente via Procedimento Operacional Padrão (POP) criado no próprio laboratório para estudo de resíduos orgânicos. Analisando os resultados obtidos verificou-se que as amostras CF e SSC apresentaram os maiores valores de condutividade elétrica, o que as caracteriza como uma fonte rica em eletrólitos, apresentando maior capacidade de troca de íons para a solução,

podendo ser caracterizadas como uma solução nutritiva. Os valores de condutividade obtidos nas amostras CF, CS e SSC superam os de algumas marcas de água mineral vendidas no mercado brasileiro, variando de 32 até 72% quando comparadas ao maior valor obtido, 408,00 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25° C, considerada como uma solução nutritiva de valor alto, rica em sais minerais. A técnica de condutimetria mostrou-se eficaz para determinação rápida de sais minerais dissolvidos totais em coprodutos de amostras de frutos de camu-camu processadas. Possibilitou ainda, pelos altos teores apresentados, caracterizá-las como solução nutritiva, com potencial para aproveitamento na área de desenvolvimento biotecnológico.

Palavras-chave: Amazônia; camu-camu; desenvolvimento biotecnológico; sementes; solução nutritiva.

1. Introdução

Os sais minerais desempenham um importante papel biológico nos seres vivos, agindo como ativadores de enzimas, como componentes estruturais de diversas moléculas orgânicas e participando da manutenção do equilíbrio osmótico, entre outras funções.¹ Pode ser encontrado sob duas formas, insolúvel e solúvel. Sob a forma insolúvel, acham-se os sais minerais imobilizados como componentes da estrutura esquelética e solúvel, os dissolvidos na água em forma de íons, ambos, fundamentais para a matéria viva.

A condutimetria permite a medição da condutância elétrica de soluções iônicas sendo um método de análise que se fundamenta na medida de condutividade elétrica.²

Estudos anteriores já apontavam o potencial desse método para uso na mensuração do teor de sais da solução do solo.³ Com os valores de condutividade elétrica (CE) do solo é possível também, quantificar de forma indireta os sais neles presentes. A medida de CE determina, de forma rápida, quanto de sais é possível conter em uma solução, conseqüentemente, essa informação serve como um controle de grande importância, pois quanto mais íons na solução, maior será a condutividade elétrica.⁴

Ordinariamente, a condução da eletricidade através das soluções iônicas se dá à custa da migração de íons positivos e negativos com a aplicação de um campo eletrostático.^{5,6} A condutância de uma solução iônica depende do número de íons presentes (concentração iônica), bem como das cargas e das mobilidades dos íons, estes podem ser determinados tanto por medida direta ou indireta.²

A técnica de condutimetria direta é utilizada para verificar a pureza de água destilada ou deionizada, verificar variações nas concentrações das águas minerais, determinar o teor em substâncias iônicas, dissolvidas, determinação da salinidade do mar em trabalhos oceanográficos e ainda para determinar a concentração de eletrólitos de soluções simples.⁷

A medida é feita através de condutivímetro e a unidade de condutância adotada pelo Sistema Internacional de Unidades é o Siemens (S). Como a condutividade aumenta com a temperatura, emprega-se 25 °C como temperatura padrão.⁸

Atualmente, vários trabalhos utilizando essa técnica, têm sido desenvolvidos, aprimorados e utilizados atualmente com o objetivo de estimar a qualidade fisiológica das sementes, por meio da medição da quantidade de exsudado liberado para o meio externo, quando imersas em água.

Por meio da leitura de condutividade em exsudado de sementes de feijão, verificou-se que é possível expressar a quantidade de sais dissolvidos total, entre os quais podem se destacar os cloretos de sódio, magnésio e cálcio, os sulfatos de magnésio, potássio e cálcio e os carbonatos e nitratos de cálcio e magnésio.

As sementes ou grãos com potencial comestível, principalmente as gramíneas, fazem parte do hábito alimentar de diversos povos, devido a sua facilidade de manutenção e conservação; por seu baixo custo e pelo alto valor nutritivo. Nos grãos de cereais podem-se encontrar nutrientes como: carboidratos, proteínas, gorduras, sais minerais, vitaminas, enzimas e outras substâncias. Entre os sais minerais presentes nos cereais estão: Na, K, Cl, P, Ca, Mg, S, Fe.⁹

Os sais minerais desempenham função essencial na nutrição do organismo. Esses elementos podem ser encontrados na água, no sal de cozinha, nas frutas, nos frutos do mar, no leite e derivados e em outros alimentos. Reguladores orgânicos, os sais minerais controlam os impulsos nervosos, as atividades musculares e o equilíbrio da relação ácido-base do organismo. No Brasil, o consumo de alguns desses nutrientes é preocupante, uma vez que se encontra abaixo dos padrões estabelecidos pelos órgãos internacionais de saúde.¹⁰

Portanto, produtos vegetais nativos, de uma região, ricos em sais minerais, pode ser uma alternativa para consumo alimentar desses nutrientes. Para tanto, há necessidade de estudos para identificação desse tipo de produto.

Os frutos do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) oriundos da Amazônia, são considerados como uma das maiores fontes de vitamina C do mundo. E ainda como importantes fontes de diferentes compostos bioativos e boa fonte de minerais, tais como Na, K, Ca, Zn, Mg, Mn e Cu. Entretanto, no processamento destes frutos, para extração da sua polpa, produto de maior interesse para diversos consumos, é gerado um quantitativo efetivo de diferentes coprodutos, sólidos e líquidos, passíveis de aproveitamento para diversos usos, se estudados seu potencial tecnológico.

Trabalhos sobre o potencial tecnológico dessa espécie, relativo aos seus coprodutos, cascas e principalmente as sementes são escassos. Tem um peso equivalente que varia entre

14 e 27% do peso total do fruto.¹¹ Para cada tonelada de frutos processados estimam-se 270 Kg, somente de sementes, sendo necessária uma maior valorização deste coproduto.

Assim, neste trabalho teve-se por objetivo determinar, de forma rápida, via método eletroanalítico de condutometria direta, a quantidade de sais minerais dissolvidos, contidos em extrato aquoso de sementes e cascas processadas, coprodutos da *Myrciaria dubia*, com potencial de aproveitamento na área de desenvolvimento biotecnológico.

2. Materiais e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Resíduos (LABRES), localizado na sede da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, situada a 8 km do centro da cidade de Boa Vista-RR, no ano de 2014. Para leitura da condutividade elétrica foi utilizado um Condutivímetro Microprocessado da marca Quimis calibrado com uma solução padrão de Cloreto de Potássio (KCl) a 0,01 M que corresponde a 1408,3 microsiemes.cm⁻¹ a 25°C.

As amostras utilizadas para o estudo são oriundas do processamento agroindustrial experimental dos frutos de camu-camu. Três coprodutos denominados: CF, CS e SSC, processados igualmente via Procedimento Operacional Padrão (POP) criado no próprio laboratório para estudo de resíduos orgânicos.

As amostras, CF, CS e SSC foram preparadas em triplicata, pesando-se 0,50 g em béquer de vidro, com capacidade de 50 mL. Após foram adicionados 50 mL de água deionizada, homogeneizadas com bastão de vidro e deixadas em repouso por 24 horas.

Para início do procedimento de medição ligou-se o condutivímetro, aguardando por aproximadamente 30 minutos, para realização das leituras. Nesse intervalo, lavou-se a sonda de medição da condutividade elétrica com água destilada e enxugou se com papel absorvente macio. Após, o equipamento foi calibrado com solução padrão de KCl a 0,01 mol.L⁻¹.

Como branco e testemunha utilizou-se duas amostras de água, processadas no laboratório, deionizada (B) e destilada (T), nas quais foi medida a condutividade, antes das amostras em estudo. A cada leitura, foi realizada a lavagem e secagem da sonda, para então proceder à leitura das amostras conforme estabelecido pelo fabricante.

Os dados de condutividade elétrica devem ser acompanhados da temperatura na qual foi medida. Para propósitos comparativos de dados de condutividade elétrica, define-se uma das temperaturas de referência (20 ou 25 °C).¹² Assim, por ser uma medida que depende expressivamente da temperatura, os resultados de análise das amostras foram corrigidos para 25°C. Para conversão, utilizou-se a equação abaixo.^{12,13}

$$C = (\chi_{\text{medida}}/1+0,019(T-25)) \text{ Equação (1)}$$

Onde: C = Condutividade elétrica a 25 °C; χ_{medida} = Condutividade elétrica medida; T = Temperatura de medida da condutividade elétrica.

O teor de sais minerais dissolvidos foi calculado utilizando-se o valor obtido da medida de condutividade elétrica por um fator de conversão que varia de 0,55 a 0,75.¹⁴

3. Resultados e Discussão

A presença de sais dissolvidos em solução transforma-na em um eletrólito capaz de conduzir corrente elétrica, estando em função da quantidade de íons presentes (concentração iônica) e temperatura, o que indica a quantidade de sais presentes no meio.¹⁵ A Tabela 1, mostra os resultados médios, valor de condutividade elétrica corrigida a 25 °C e teor de sais minerais dissolvidos, obtidos no estudo realizado com três amostras de co-produtos, CF, CS e SSC, oriundas do processamento agroindustrial experimental dos frutos de camu-camu.

Tabela 1. Valor de condutividade elétrica, corrigida a 25° C e teor de sais minerais dissolvidos obtidos no estudo realizado com três amostras de co-produtos, CF, CS e SSC, oriundas do processamento agroindustrial experimental em frutos de camu-camu

Amostras	Coprodutos (camu-camu)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$)	Sais minerais dissolvidos (mg/L)
1	CF	1521 \pm 132,8	1086,7
2	CS	603 \pm 60,6	430,7
3	SSC	1408 \pm 1,0	1005,1

Analisando os resultados obtidos (Tabela 1) verificou-se que as amostras CF e SSC apresentaram os maiores valores de condutividade elétrica, o que as caracteriza como uma fonte rica em eletrólitos, apresentando maior capacidade de troca de íons para a solução.

Estas amostras podem ser caracterizadas, ainda, como uma solução nutritiva, uma vez que há uma relação com o teor de sais dissolvidos pela medida de condutividade.¹⁶

A água mineral natural é um tipo de solução nutritiva, possui vários sais minerais em sua composição conforme o local de onde é retirada. A água possui propriedades minerais dissolvidas em sua composição vindas do solo e rochas por onde passa. Esses sais comprovadamente atuam de forma benéfica no corpo humano quando consumidos na quantidade ideal.

A capacidade de uma solução aquosa de conduzir uma corrente elétrica é devido à presença de íons. Essa propriedade varia com a concentração total de substâncias ionizadas dissolvidas na água, com a temperatura, com a mobilidade dos íons, com a valência dos íons e com as concentrações real e relativa de cada íon.¹²

A condutividade de uma solução nutritiva não influencia somente a absorção de água, mas também a absorção de sais, estando ambas intimamente ligadas.¹⁷

Por exemplo, numa amostra de água mineral natural de uma determinada empresa (X), a condutividade elétrica medida foi de $408 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, o que indica uma quantidade de sais minerais alta.

Comparando com outras marcas presentes no mercado, essa água mineral natural foi a que mais apresentou condutividade elétrica, e conseqüentemente maior volume de sais minerais dissolvidos em sua composição. Para comparar, na tabela 2, dados de condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25°C) obtidos a partir de consulta em rótulos de marcas vendidas no mercado.

Tabela 2. Dados de condutividade elétrica contido em rótulos de marcas de água mineral vendidas no mercado.¹⁸

Água mineral					
Característica físico-química	X	A	B	C	D
Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C)	408,0	105,9	234,0	257,0	336,0

Os valores de condutividade obtidos nas amostras CF, CS e SSC (Tabela 1) superam os valores das amostras de água mineral (Tabela 2), variando 32% até 72% maiores, quando comparadas ao maior valor obtido, $408,00 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25°C , relativo a algumas marcas de água mineral vendidas no mercado brasileiro (Tabela 2), considerada como uma solução nutritiva de valor alto, ou seja rica em sais minerais.

Os sais minerais não possuem classificação ou divisão, os principais são: cálcio, cromo, cobre, flúor, iodo, ferro, magnésio, manganês, fósforo, zinco, sódio, potássio. Portanto, é válido relatar suas principais características, bem como suas finalidades, e os efeitos da carência ou excesso destes minerais.¹⁹

O camu-camu vem ganhando espaço na pesquisa por ser uma fruta rica em ácido ascórbico, flavonoides e ser fonte de minerais.²⁰ Em estudos realizados com camu camu produzidos em Roraima foram identificados na casca a presença de Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, Cu e K.²¹

A caracterização física e química de duas amostras destes materiais, cascas e sementes, descartados durante um processo de avaliação em laboratório obtiveram, teor de água variando de 5,45 a 5,67 %, pH com variação de 6,7 a 7,6 e índice médio de acidez em torno de $0,02\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de ácido cítrico, considerando que o material tem potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias com possibilidade de uso na agricultura de pequeno porte.²²

4. Conclusão

A técnica de condutimetria mostrou-se eficaz para determinação rápida de sais minerais dissolvidos totais em co-produtos de amostras de frutos de camu-camu processados. Possibilitou ainda, pelos altos teores apresentados, caracterizá-las como solução nutritiva, com potencial para aproveitamento na área de desenvolvimento biotecnológico.

Agradecimentos

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa; Universidade Federal de Roraima – UFRR e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Referências Bibliográficas

1 Araujo, C. Água, Sais minerais, Carboidratos e Lipídeos. Disponível em: <<http://phdoctors.wordpress.com/2009/06/27/agua-sais-minerais-carboidratos-elipidios/>>.

Acesso em: 5 Agosto 2014.

2 Anderson, B. C.; Araújo, D. R.; Vasconcelos, G. A.; Fernandes, T. S. Titulação Condutimétrica de Ácido Fosfórico em Coca-Cola. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/94685203/Condutimetriaformatadohttp://analiticaqmc20132.paginas.ufsc.br/files/2013/10/CONDUTIMETRIA.pdf>>. Acesso em: 2 Agosto 2014.

3 Andrade-Neto, T. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2005. [Link]

4 Cavalcante, M. Z. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2007. [Link]

5 Caminha-Junior, I. C.; Seraphim, O. J.; Gabriel, L. R. A. Caracterização de uma área agrícola irrigada com efluente agro-industrial, através de análises químicas e da resistividade do solo. *Energia na Agricultura* **2000**, 13, 40.

6 Ohlweiler, O. A.; *Fundamentos de Análise Instrumental*, 1a. ed., Livros Técnicos e Científicos, 1981.

7 Condutometria. Disponível em: <http://www.ufjf.br/nupis/files/2012/04/aula-4-condutometria_1.pdf>. Acesso em: 10 Agosto 2014.

8 Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Krelling, K.; *Methods of seawater analysis*. 3a. ed., Wiley VCH, 1999.

9 Só Nutrição. Disponível em:<<http://www.sonutricao.com.br/conteudo/guia/cereais.php>>. Acesso em: 10 julho 2014.

10 Alimente-se com Sabedoria: Nutrição & Saúde. Disponível em: <<http://alimentesecomsabedoria.blogspot.com.br/2014/03/carencia-de-mineraisnoorganismo.html>>. Acesso em: 10 julho2014.

11 Yuyama, K.; Valente, J. P.; Chaves Flores, W. B. Taxonomia e descrição da planta. In: CRV. Camu camu. Curitiba, 2011a. p. 19-25.

12 CPRM – Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais. Banco de dados de QA Versão 2: Manual de instruções. Belo Horizonte: CPRM. 2007. Manual Medição *in loco*: Temperatura, pH, Condutividade Elétrica e Oxigênio Dissolvido. Organizado por Pinto, M. C. F. Versão maio 2007. [Link]

13 Conductivity A.; *Introduction, In: Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19a. ed., APHA, AWWA, WEF: Washington, 1995.

14 Parron, L. M.; Muniz, D. H. F.; Pereira, C. M. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Dados eletrônicos. - Colombo: Embrapa Florestas, 2011. Disponível em:<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/921050/1/Doc232ultimaversao.pdf>>. Acesso em: 7 outubro 2014.

15 Cetesb. Qualidade de água. São Paulo. Disponível em: <<http://www.CETESB.sp.gov.br/Agua/rios/curiosidades.asp>>. Acesso em: 10 julho 2014.

16 Fontes, A. S.; Azevedo, A. E. G.; Zucchi, M.R.; Medeiros, Y. D. P. *Resumos 18º Simpósio Brasileiro de recursos hídricos*. Campo Grande, Brasil, 2009.

17 Huett, D. O. Growth, nutrient uptake and tipburn severity of hydroponic lettuce in response to electrical conductivity and K:Ca ratio in solution. *Australian Journal of Agricultural Research* **1994**, *45*, 251.[CrossRef]

18 Itati. Água mineral natural. Disponível em: <<http://www.itati.com.br/blog/saude-2/saisminerais-na-agua-e-acondutividade/> Publicado em 31 de maio de 2011>. Acesso em: 10 julho 2014.

19 Campos, D. M. T. Mineralograma. Medicina Ortomolecular. Disponível em

<<http://www.dianacamposortomolecular.com.br/mineralograma.html>>. Acesso em: 5 julho 2014.

20 Schwertz, M. C.; Maia, J. R. P.; Sousa, R. F. S.; Aguiar, J. P. L.; Yuyama, L. K. O.; Lima, E.M. Efeito hipolipidêmico do suco de camucamu em ratos. *Revista Nutrição* **2012**, 25, 35. [CrossRef]

21 Ribeiro, P. F. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Viçosa, 2012. [Link]

22 Ferreira, M. W. M; Sousa, R. C. P; Mendes, L.; Smiderle, O. J.; Chagas, E. A; Lima, C. G. B. *Resumos do II Simpósio Internacional de Botânica Aplicada e II Simpósio Nacional de Frutíferas do Norte e Nordeste (SINBOT/SINFAN)*, Manaus, Brasil, 2013.

CAPÍTULO IV – PHYTOTOXICITY OF EXTRACTS OF *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh BIOPROCESSED IN VEGETABLE CROP SENSITIVE TO ALLELOCHEMICALS

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effect of extracts prepared from bioprocessed remaining (BR), seeds of fruit of *Myrciaria dubia* (çaçari) from the northern Amazon, applied to biological assay with *Lycopersicon lycopersicum* (tomato) seeds. To obtain and classify the degree of phytotoxicity were utilized samples of control and different aqueous extracts, with and without treatment, assessing their physical and chemical quality via pH analysis, electrical conductivity and total of dissolved salts. Thereafter, it was held monitoring of bioassay for five days in closed glass plate, with samples incubation at $25 \pm ^\circ\text{C}$ in a dark environment. It was obtained preliminary knowledge about four extracts prepared from T1 and T2 in proportion to 1:10 and 1:100. The methodological process applied allowed the quick examination, up to 120 hours, of the effect of the extracts on seed germination and root growth of tomato. Of the four extracts evaluated, those who were previously treated T2D1 and T2D2, regardless of the applied concentration, showed no phytotoxicity to the plant tested and classified according to Germination Index (GI) obtained, 90.2 and 96.6%. Therefore, there is possibility of availability of finished products and raw materials from the *M. dubia* seeds, since previously sterilized.

Keywords: çaçari, germination index, methodological process, bioprocessed remaining.

Abbreviations

BR, Bioprocessed remaining; (S), sand; (SS), sandy soil; (CS) clay soil; (EC) electrical conductivity; (TDS) total dissolved salts; (RBST) untreated bioprocessed remaining; (RBCT) treated bioprocessed remaining; (NSG) number of germinated seeds; (RL) root length; (GI) germination index; (RSG) relative percentage of germination; (DAS) day after sowing.

INTRODUCTION

The *Myrciaria dubia* is a fruit species native from the Amazon, and it has been the focus of different technical-scientific studies in Brazil currently, having prospects of improvement in its production. In this context, in the course of researches, it was verified a gap to be completed, referring to the possibility of development of new products after processing of the fruit, known as çaçari, in the extreme north of Brazil, making good use only of the pulp and discarding peel and seeds as residues, general practice, widely applied in the northern Amazon yet.

However, this practice has been modified over the years, due to the technical-scientific observation of various properties of bioprocessed remnants of other fruitful from the Amazon, like the cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd. Ex Spreng.) K. Schum.), known nationally and internationally for producing the cupulate, derived from seeds of the extraction process the pulp of its fruit.

However, in the case of processing the fruit *M. dubia* for each ton of processed fruit, it is estimated up to 270 kg, only seeds, which are not well yet exploited, in the Amazon, mainly as a product, possibly due to ignorance or lack of adequate disclosure about its potential, as well as its quality and level toxicity when bioprocessed.

Considering the current methods of toxicological evaluation, *in vitro* tests offer several advantages, including controlled testing conditions; a high level of standardization; a reduction in variability among experiments; the absence of systemic effects; low cost testing; a small amount of material required; a limited amount of toxic waste, cells and human tissues used; as well as transgenic cells carrying human genes and reduced animal testing (Araujo et al., 2014).

According to Araujo and Monteiro (2005), seeds germination and plant growth bioassays are the most common techniques used to assess the phytotoxic compounds. Allowing to determinate, according to Trautmann and Krasny (1997), whether there are, in the compound or in the raw material, substances which may inhibit the germination of seeds, the root growth or development of plants.

Simoneto and Cruz-Silva (2010) reported that the use of seeds of cultivated species and good quality is advisable, including the tomato, easily found and quite sensitive to many allelochemicals (chemical compounds), secondary metabolic products of plants according to Ribeiro et al. (2012).

Researches have shown that certain plants, such as alfafa, contain soluble in water phytotoxic compounds which are released into the soil environment using fresh leaves, stems and crown tissues, as well as dry material, roots in decomposition and seeds (Hall and Henderlong, 1989; Dias de Almeida et al., 2008). In fact, they are according to Weir et al. (2004), allelopathic substances released by the plant, which can affect the growth, to damage the normal development and even to inhibit the germination of seeds of other plant species.

According to Souza Filho et al. (2010) the allelochemicals are found in different parts of the plant including leaves, flowers, roots, stalks, fruits, peels, seeds, and pollen grains. These secondary metabolites may be released directly into the environment by root exudation, volatilization, leaching or decomposition of plant material (Moreno, 1989; Cipollini et al., 2012).

Furthermore plant secondary metabolites can act in the recipient plant by altering the structure of cell membranes, including the receptors and were present flags being also capable of causing interference in the cell cycle, modify the action of several hormones, alter the conformation of enzymes and process of transcription and translation (Habermann et al., 2015).

Previous studies demonstrate the phytotoxic potential of aqueous leaf extracts of *B. salicifolius* on the early development of bio-indicator species such as onions, tomatoes and lettuce (Mairesse et al., 2007; Imatomi et al., 2013). In a study conducted by Sausen et al. (2009) the aqueous leaf extracts of *Eugenia involucrata* (Myrtaceae) and *Acca sellowiana* (Myrtaceae) were phytotoxic to the germination and growth of tomato and onion seedlings.

However, work on the phytotoxicity *M. dubia* (Myrtaceae) on these bioindicators using extracts obtained from seeds, remnants of the pulping of fruits of this species were not found in literature.

The with vegetables germination test is a widely used model to assess the potential of the plant extract allelochemical or isolated compounds, and one of the purposes set out when certain compound interfere with cell function is the change in the germination rate of seeds, revealing toxic action and / or cytotoxic (Luz et al., 2012). Second, Fiskesjö (1985), considered a toxic agent promoted the reduction of more than 50% of *Allium cepa* seed germination index, compared to the negative control.

However, according to Faria et al. (2009), further studies are needed regarding the forms of extraction, types of extractors, extraction time and application rates, in addition to part of the plants to be used as low phytotoxic effect may occur by low concentrations of compounds inhibitors present in the extracts tested.

The use of vegetable biological assays to monitor bioactivity of extracts, fractions and compounds isolated from plants according Noldin et al. (2003) is one of the alternatives that

have often been incorporated into the identification and monitoring of potentially toxic substances.

In this context, considering that the processes have earned a prominent place in the global technological development, displaying economic and operational characteristics that confer advantages over chemical processes conventionally used, in this study, as purpose, it was taken the evaluation of the effect of extracts made from bioprocessed remaining, seeds of the fruit of *Myrciaria dubia* from the northern Amazon, applied to biological assay with seeds of *Lycopersicon lycopersicum* (L.) H. Karst. (tomato) in the laboratory to obtain and classify the degree of phytotoxicity with a view to providing raw materials and new process methodological / biotech product for Brazilian society.

MATERIALS AND METHODS

Study site and provenance of the plant material

The study was conducted at the Brazilian Agricultural Research Corporation, 02°45'28 "N 60°43'54" W, located in the state of Roraima, in June, in the year 2015, with bioprocessed remaining (BR), seeds of fruit of *M. dubia*, from technological prospection, related to the years 2012, 2013 and 2014 in the northern Amazon.

Samples of the plant material – BR

The BR samples were obtained from 10 materials that were stored and preserved in a freezer since the collection period, 2012-2014.

Samples preparation

The BR samples were prepared from the formation of a series of sub-samples (01 kg) prepared from materials that were stored in the freezer, intending to obtain at least 500 g of processed sample according to granulometric specifications usually used for organic fertilizers. They were pre-dried in air circulating stove, calibrated in the range of 60 ± 5 °C, for 48 hours. After this period, they were weighted and processed using a Willye type mill with a 1mm mesh, having previously calculated the efficiency of crushing and time required for processing.

From the processed material, suitably uniformed by granulometry, it was selected two samples, each containing 100 g to compose the biological assay in the laboratory, according to methodology principles of Zucconi et al. (1981) and Wong et al. (2001), with some adjustments.

Bioassay preparation

It was prepared, a witness control (WC), only deionized water and aqueous extracts, liquid substrates made from BR with and without treatment, known as T1 and T2, respectively. To obtain T2, it was placed 100 g of BR in a calibrated stove at a temperature of 200 ± 10 °C for 2 hours, in order to control the microbial population.

The experiment was conducted from preliminary results obtained in qualitative microbiological test conducted in a greenhouse with BR samples. In ten of the thirteen treatments designed, solid substrates with different dosages in sand (S), sandy soil (SS) and clay soil (CS), shown in a simplified way, treatment and identification in Table 1, it was found the presence of microorganisms in visual inspection from the third until the end, the seventh day of implementation of the experiment in all treatments containing the BR-intensive growth.

Table 1. Results obtained on visual inspection absence (-) or presence (+) of microorganisms in different dosages of BR sand (S), sandy soil (SS) and clay soil (CS).

Treatments	Identification	Visual inspection	
		3rd day	7th day
1	100% S	-	-
2	75% S + 25% BR	+	+
3	50% S + 50% BR	+	+
4	25% S + 75% BR	+	+
5	100% SS	-	-
6	75% SS + 25% BR	+	+
7	50% SS + 25% BR	+	+
8	25% SS + 75% BR	+	+
9	100% CS	-	-
10	75% CS+ 25% BR	+	+
11	50% CS + 50% BR	+	+
12	25% CS + 75% BR	+	+
13	100% BR	+	+

Source: authors (2015).

From the established treatments (T1 and T2), the biological assay was performed in specialized laboratory using sterilized materials, deionized water, ionic contaminants free and BR aqueous extracts, five repetitions for each witness control (WC) and treatments, obtained by means of two dilutions (D1 and D2) respectively defined by the ratio m: v, 1:10 normally used in the assessment of organic compounds and 1: 100 was performed as Sousa et al. (2015).

Once prepared, the extracts were shaken up manually for 20 seconds each, with a glass rod, repeating the action for three more times, in order to dissolve the material satisfactorily. Therefore, each extract was filtered through Whatman filter paper #1. Then, it was realized simplified physicochemical evaluation, pH, electrical conductivity (EC) and total dissolved salts (TDS) to obtain preliminary knowledge of the elaborated extracts. The measurement of pH, TDS and EC was determined by pH meter and microprocessor conductivity meter, after calibration with standard solution, according to the producer's instructions.

A model scheme was developed (Table 2) for simplified facilitation and identification of the experiment and extracts, use in the tabulation and presentation of results, as follows: RBST originated from untreated bioprocessed remaining (identified as T1) and RBCT originated from treated bioprocessed remaining (identified as T2), added to their respective dilution: T1D1 = 1:10; T1D2 = 1:100; T2D1 = 1:10; T2D2 = 1:100.

Table 2: Schematic model for simplified identification of the experiment and extracts made from bioprocessed remaining (BR).

Identification	Treatment	Dilution	Name Simplified
RBST	T1	D1	T1D1
		D2	T1D2
RBCT	T2	D1	T2D1
		D2	T2D2

Source: authors (2015).

Bioassay Installation

In laboratory bench, for each established treatment (Table 2) was added a qualitative analysis filter paper (Whatman #2) into five glass petri plate 9 cm in diameter, wetting with 5 ml each of extract. For the TC, the same procedure, adding, in this case, 5 mL of deionized water per plate. Then, in each petri dish were placed 10 *Lycopersicon lycopersicum* Mill. seeds uniformly distributed.

The *L. lycopersicum* seeds were acquired in agricultural store, after lifting of the most cultivated varieties in Roraima, also taking into consideration the characteristics of the “cultivar IPA 6”. According to information contained in the package, the IPA 6 has determined growth, vigorous and productive plant, firm (globular) fruit, with excellent internal and external color, as well as being resistant to disease such as *Fusarium*, *Verticillium*, nematode and Cracking. The germination takes place from 5 to 14 days after sowing.

Assessment of the Bioassay

To obtain the results relative to assays established in the laboratory, it was conducted visual inspection of the presence or absence of microorganisms and monitoring of the germination process of the seeds of *L. lycopersicum* (tomato) in the proposed treatments for 120 hours (five days), in a closed plate, by incubating the samples at 25 ± 1 °C in a dark environment.

At the first 120 hours were recorded through photographic images and spreadsheet the number of germinated seeds (NSG) and also by measuring with a caliper, root length (RL) of germinated seeds in each petri dish. The seeds germinated considered were those who had rootlets and / or developed little stem.

Germination index (GI)

The value for the germination index (GI) was obtained by quantifying the relative percentage of seed germination (RSG - Relative Seed Germination) and the relative percentage of root length (RRG - Relative Root Growth), as proposed by Zucconi et al. (1981). Thus, the calculation of the relative percentage of germination, RSG is made by the equation:

$RSG (\%) = (NSG,T/NSG,C) * 100$, where NSG,T is the arithmetic mean of the number of germinated seeds in each extract (treatment) and NSG,C is the arithmetic mean of the number of germinated seeds in witness control (WC).

The relative percentage of root length, RRG was obtained by the equation: $RRG (\%) = (LR,T/LR,B) * 100$, where LR, T is the mean length of the roots on the aqueous extract and LR,B is the length mean of the roots in the witness control (WC).

The germination index (GI), proposed by Zucconi et al. (1981), which joins the RSG and the RRG parameters according to the equation: **GI (%) = (RSG %)*(RRG %)/100**

Statistical analysis

The results were submitted to analysis of variance and means compared by Tukey test at 5% probability ($p < 0.05$) with the help of statistical program SISVAR® (Ferreira, 2011), with a view to comparison among treatments and verification if they have the same effect on a measured characteristic or at least one of them has different effect on the other, the results relative to pH, electrical conductivity, number of germinated seeds (NSG) recorded and root length (RL) measures, resulting from the germination tests in aqueous extract and the result of the germination index (GI).

Degree qualification or phytotoxicity level of bioprocessed remaining, *M. dubia* seeds

For characterization of the degree or level of phytotoxicity of the bioprocessed remaining, *M. dubia* seeds (Table 3), from the GI (%), obtained after the use of the aqueous extracts with different treatments applied to biological assay with *L. lycopersicum* (tomato) was selected one that varies slightly among others found in the literature, adding small adjustments.

Table 3: Methodological model proposed to quantify the degree or phytotoxicity level of the product from the tests with *Lycopersicon lycopersicum*.

GI (%)	Product rating under analysis
80-100	Non-phytotoxic
60-80	Moderately phytotoxic
30-60	Phytotoxic
< 30	Very phytotoxic

Source: Adapted from Trautmann and Krasny (2009); WERL (2000).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, it was obtained preliminary knowledge of the physical and chemical quality, presence of microorganisms in BR extracts, *M. dubia* seeds of northern Amazonia, and germination rate and degree of phytotoxicity (Table 4) of these from bioassay with *L. lycopersicum* (tomato), containing a control sample and four elaborated extracts from T1 treatments (RBST) and T2 (RBCT) in the proportion to 1:10 (D1) and 1:100 (D2).

Table 4: Mean results obtained in the simplified physicochemical characterization, visual inspection of absence (-) or presence (+) of microorganisms, germination index and degree of phytotoxicity in the treatment with different dosages of RBST and RBCT concentrated (10%) and diluted (1%).

Analyzed parameters	Treatment / Concentration				Attestation
	T1D1	T1D2	T2D1	T2D2	TC
pH	4,75±0,010 d	5,15±0,010 c	4,73±0,008 d	5,18±0,017 b	5,83±0,018 a
EC (dS m ⁻¹)	1,73±5,513 a	0,25±5,642 c	1,35±5,748 b	0,18±5,518 d	0,003±0,007 e
TSD (mg L ⁻¹)	951,50±3,390 a	135,63±3,470 c	742,17±3,535 b	100,49±3,393 d	2,05±0,046 e
Visual inspection	+	+	-	-	-
GI (%)	3,57	0,08	90,24	96,57	97,82
Phytotoxicity Degree	very phytotoxic	very phytotoxic	non-phytotoxic	non-phytotoxic	non-phytotoxic

Means followed by the same letters on the lines do not differ among them by Tukey test, at 5% probability.

Source: Authors (2015).

In Table 4, it can be seen that all extracts (T1D1, T1D2, T2D1 and T2D2) tested showed pH values ranging from 4.73 to 5.18, below the obtained (5.83) with the witness control (WC), clearly indicating the influence of BR. Irrespective of treatment and applied dilution, T1D1 and T2D1 showed no significant difference related to pH, while T1D2 and T2D2 suffered directly influences in the applied dilution, differing from each other, and between WC and the other treatments performed with BR.

Analyzing the pH values obtained in the treated and untreated samples (Table 4), it is possible that pre-drying may have influenced the results, causing decay in pH values when compared to WC. In this case, according to Zanatta et al. (2010), verified variation is a consequence of the water removal and concentration of the acids present in the sample after drying. Minor pH occurred in extracts where BR was more concentrated T1D1 and T2D1 (Table 4).

According to Chaves et al. (2004) the pH directly influences the development of microorganisms and temperature of sterilization, among other factors, corroborating to the data obtained, concerning to the classification of the degree of phytotoxicity found for the four treatments performed (Table 4).

During the visual inspection for the absence (-) or presence (+) of microorganisms in different dosages of RBST and RBCT, after 3 days of seeding, it was observed on plates containing aqueous extract without treatment/sterilization, in the proportion to 1:10 to 1:100, low rate of germination and visible presentation of microorganism colonies, demonstrating the phytotoxicity. Dampened plates with deionized water (WC) and treated extracts already presented in this period, even on the third day, acceptable germination rate, values above 75%.

Generally, the germination capacity is often affected by the presence of pathogens inside or on the surface of the seeds (Souza et al., 2013). In this case, in T1D1, the most concentrated extract, proportion to 1:10, it was observed that the microorganisms present on the fifth day, not affecting the germination process.

On other hand, in T1D2, the germination capacity of the seeds was affected (Table 5). In this case, the extract had become more diluted, in ratio to 1:100. As well as the BR used for the preparation of both extracts had not undergone any treatment, in addition to washing and pre-drying stove. In T2D1 and T2D2 extracts, where there was a previous treatment, sterilization, it was observed that the germination of the seeds was not affected (Table 5).

The evaluation of the health of seeds enables development, more precisely, treatments to promote the elimination of present pathogens, thus providing the restoration of health quality (Souza et al., 2013). Sources phytotoxicity and salt levels among the treatments induce

different effects regarding to the size and appearance of sunn hemp seedlings, a study conducted by Nunes et al. (2009), the same effect was observed, regarding to the appearance of roots of *L. lycopersicum*.

In Table 5 are shown results for the average number of germinated seeds (NSG) and average root length (RL) which led to the germination index (GI) of *L. lycopersicum* and its classification of phytotoxicity degree of the tested extracts (Table 4), obtained on the 5th day after sowing (DAS) in different treatments.

Table 5: Average number (%) of germinated seeds (NSG) and average roots length (mm) (RL) of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato), to five days after sowing (DAS) in different treatments (WC, T1D1, T1D2, T2D1 and T2D2).

Treatments / Parameters	WC	T1D1	T1D2	T2D1	T2D2
NSG (%)	92 a	84 a	24 b	88 a	90 a
RL (mm)	36,59 a	2,32 b	0,22 b	33,37 a	38,02 a

Means followed by the same letters on the lines do not differ among them by Tukey test, at 5% probability. Sources: Authors (2015).

Of the four extracts evaluated those who were previously treated, T2D1 and T2D2, regardless of the applied concentration, showed no phytotoxicity to the tested plant, being classified according to the germination index obtained (Figure 1).

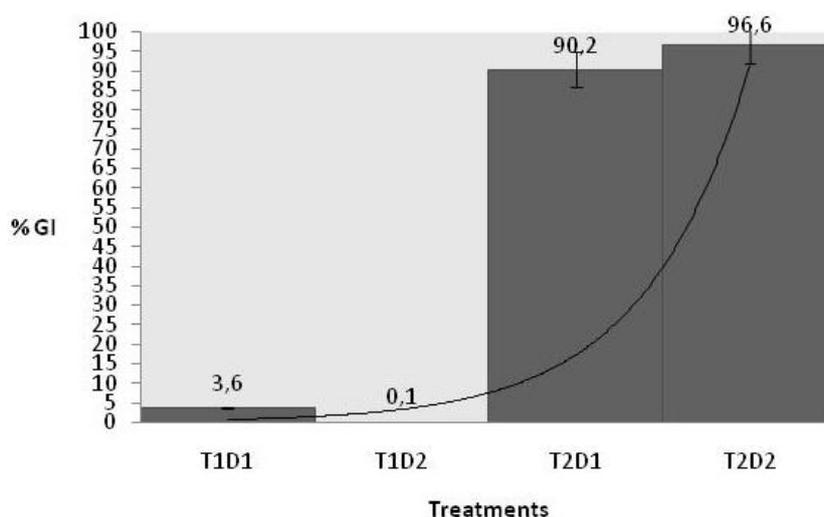


Figure 1: Germination Index (GI) of *L. lycopersicum* (tomato) obtained at 5 days after sowing (DAS) with *Myrciaria dubia* extracts of different treatments, T1D1, T1D2, T2D1 and T2D2 of BR.

Source: Authors (2015).

Said extracts, T2D1 and T2D2 (Figure 1), when applied to substrates did not inhibit germination of the seeds of *L. lycopersicum* (Table 5) nor the growth of their roots. This may have occurred due to pH values presented, from 4.73 to 5.18 (Table 4) respectively acids to all the treatments, as well as the ionic behavior of the extracts (Figure 2).

Figure 2 shows the ionic behavior of the extracts analyzed, T1D1 and T1D2 untreated and T2D1 and T2D2 with treatment when the pH values obtained are interrelated to electrical conductivity (EC) and total dissolved salts contents (TDSC).

The acidity and pH are important factors antimicrobial considered, providing greater stability to the product and the development of microorganisms (Souza et al., 2009). In despite of the presence of this natural barrier, the physiology of many yeasts and molds allows its adaptation to these adverse conditions, growing on substrates with intolerable sugar concentrations for

bacteria, because they are not so sensitive to the high osmotic pressure. For these characteristics, Souza et al. (2006) and Souza et al. (2009) found pH values ranging between 3.15 and 4.66.

Vieira and Cartapatti-Stuchi (2006), when evaluated the effect of particle size suspended in mango juice on the electrical conductivity, concluded that the larger the particles on suspension, the lower will be the electrical conductivity, due to reduced ion mobility. This fact can be observed in EC results obtained in T1D1 and T2D1 (Figure 2).

From the mentioned results, Figure 2, it can be verified and according to other authors that the electric conductivity can be influenced by many parameters, such as temperature, electrolyte concentration, contents of chemical components, viscosity, solids in suspension, electrolytic strength and the presence of cellular structures (Min et al., 2007).

Thus, it can be inferred, according to Lewicki (2004), that the electrical conductivity occurs in media containing electrically charged molecules. Because of this, according to Min et al. (2007), the in situ measurement of electrical conductivity makes it possible to check the physical and chemical changes during the process of transformation of plant products.

The electrical conductivity (EC) reflects the salinity degree, which may indicate possible phytotoxic effects on the germination and growth of plants (Lin, 2008). Therefore, it can be a factor with a determining effect, mainly in the germination stage. For this study, it was found that the same trend, only with extracts which have not undergone any heat treatment. These showed electrical conductivity values relatively high (Figure 2), making possible its influence on the GI obtained, 3.6 and 0.1% for T1D1 T1D2 (Figure 1).

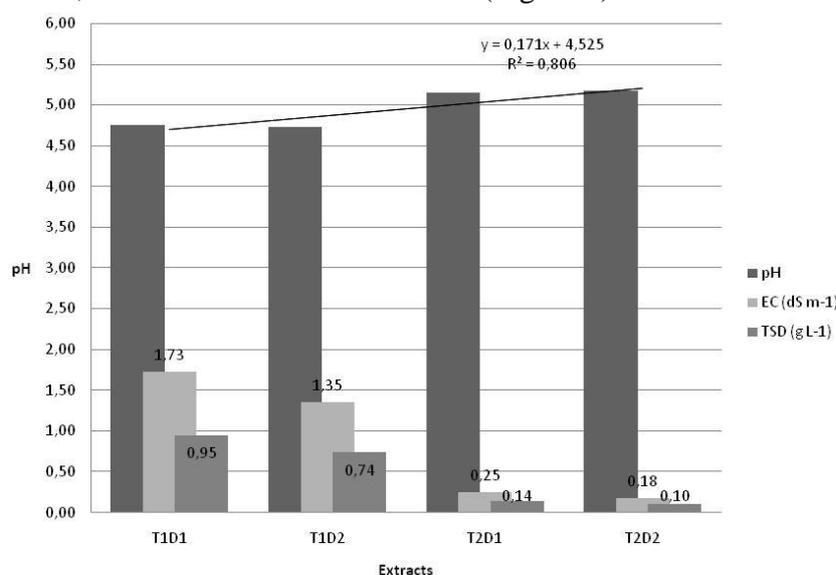


Figure 2: Demonstration related to pH trends, interrelated to electrical conductivity (EC) and total dissolved salts contents (TDS) of the four types extracts (T1D1, T1D2, T2D1 and T2D2) of bioprocessed remaining of *Myrciaria dubia* evaluated.

Source: Authors (2015)

In this context, the results obtained from the analysis of electrical conductivity, total dissolved salts of aqueous extract at the beginning of the experiment and further visual inspection of the presence or absence of microorganisms, and the pH, facilitated the testing and evaluation of the phytotoxicity of bioprocessed remaining of *M. dubia* seeds.

Extracts derived from bioprocessed remaining, *M. dubia* seeds from the northern Amazon, only those treated thermally sterilized (T2D1 and T2D2) independent of the applied concentration, were not phytotoxic to the production of tomato.

Fracassetti et al. (2013) performed an evaluation of polyphenols, vitamin C content and antioxidant capacity of the dehydrated pulp, dry powder, the flour obtained from the peel and

seeds, remaining residue after processing the *M. dubia* fruits. As result, fifty-three different phenolic compounds were obtained, which were characterized by cutting-edge instruments. However, the content of phenolic compounds of remaining residue flour was higher than the pulp powder (4007.95 mg / 100 g versus 48.54 mg / 100 g).

The flour is a rich source of bioactive compounds with potential health-promoting properties such as antioxidant, anti-inflammatory activity and hypocholesterolemic which have been linked to vitamin C and phenolic compounds such as flavonoids and ellagitannins. Nevertheless, according to the researchers, works *in vivo* and intervention studies are needed to assess the nutritional and functional potential of this product (Fracasetti et al., 2013).

According to Akter et al. (2011) and Chagas et al. (2015), fruit of *M. dubia* (Caçari) is promising sources of various bioactive compounds like vitamin C, carotenoids and phenolic compounds. They have also good sources of potassium, iron, calcium, and various types of amino acids of phosphorus, such as serine, valine and leucine. In this way, these evidences enable the following inferences, the presence of different bioactive compounds in this fruit can be used to retard or prevent various diseases such as cardiovascular disease and cancer (Akter et al., 2011).

The methodological process applied allowed a quick assessment, within 120 hours, the aqueous extracts of *M. dubia* effect on seed germination and root growth of *Lycopersicon lycopersicum* Mill. From originated extracts of BR, those who were treated independent of the applied concentration, were not phytotoxic in the initial production of tomatoes.

CONCLUSIONS

Based on these results, it is concluded that there is a possibility of availability of finished products and raw materials from the *M. dubia* seeds, from northern Amazon, if previously sterilized. It is important that the classification of toxic reaction products are effected not only by the GI (germination rate), plus inter-related and compared to the facilitators parameters of interpretation of the results obtained, as control sample of the presence and absence of microorganisms, and physical -chemical, conductivity, pH and total dissolved salts.

Conflict of interests

The author(s) did not declare any conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil).

REFERENCES

Akter MS, Oh S, Eun JB, Ahmed M (2011). Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. Food Res. Int. 44:1728-1732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.045>.

Araujo GL, Campos MAA, Valente MAS, Silva SCT, França FD, Chaves MM, Tagliati CA (2014). Alternative methods in toxicity testing: the current approach. Braz. J. Pharm. Sci. 50(1):55-62.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>

Araujo ASF, Monteiro RTR (2005). Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. Sci. Agric. 62(3):286-290.

- Chagas EA, Grigio ML, Durigan MFB, Fujita E, Vieites RL (2015). Caracterização centesimal e compostos bioativos de frutos de camu-camu em diferentes estádios de maturação. In: Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças, 001. Anais... Aracaju-SE: (CD ROM), Maio de 2015.
- Chaves MCV, Gouveia JPG, Almeida FAC, Leite JCAL, Silva FLH (2004). Caracterização físico-química do suco de acerola. Rev. biol. ciênc. terra. 4(2):123-157.
- Cipollini D, Rigsby CM, Barto EK (2012). Microbes as target and mediators of allelopathy in plants. J. Chem. Ecol. 38(6):714-727. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-012-0133-7>.
- Dias de Almeida G, Zucoloto M, Zetun MC, Coelho I, Sobreir FM (2008). Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. Rev. Facul. Nac. de Agron. 61(1):4237-4247.
- Faria TM, Gomes Junior FG, Sa ME, Cassiolato AMR (2009). Efeitos alelopáticos de extratos vegetais na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão. Rev. Bras. Ciênc. Solo (online). 33(6):1625-1633. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832009000600011>.
- Ferreira DF (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. Ciênc. e Agrotec. 35(6):1039-1042.
- Fiskesjö G (1985). The *Allium* test: a standard in environmental monitoring. Hereditas. 102:99-112.
- Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Barberán FAT (2013). Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). Food Chem. 139:578-588.
- Habermann E, Imatomi M, Pereira VC, Pontes FC, Gualtieri SCJ (2015). Atividade fitotóxica de cascas do caule e folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (MYRTACEAE) sobre espécies infestantes. Acta biol. Colomb. 20(1):153-162. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.42756>.
- Hall MH, Henderlong PR (1989). Alfalfa autotoxic fraction characterization and initial separation. Crop Sci. 29:425-428.
- Imatomi M, Novaes P, Gualtieri SCJ (2013). Interspecific variation in allelopathic potential of the Myrtaceae family. Acta Bot. Bras. 27(1):54-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062013000100008>.
- Lewicki PP (2004). Water as the determinant of food engineering properties. J. Food Eng. 61:483-495.
- Lin C (2008). A negative-pressure aeration system for composting food wastes. Bioresour. Technol. 99:7651-7656.
- Luz AC, Pretti IR, Dutra JCV, Batitucci MCP (2012). Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste in vivo. Rev. Bras. Plantas Med. (online). 14(4):635-642. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400010>.

- Mairesse LAS, Costa EC, Farias J, Fiorin RA (2007). Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). Rev. FZVA. 12(2):1-12.
- Min S, Sastry SK, Balasubramaniam VM (2007). In situ electrical conductivity measurement of select liquid foods under hydrostatic pressure to 800MPa. J. Food Eng. 82:489-497.
- Moreno LF (1989). Efectos alelopáticos de *Rumex crispus* L. sobre *Pisum sativum* L. Acta biol. Colomb. 1(5):35-43.
- Noldin VF, Cechinel Filho V, Monache FD, Benassi JC, Christmann IL, Pedrosa RC, Yunes RA (2003). Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. Quím. Nova. 26(3):331-4.
- Nunes AS, Lourenção ALF, Pezarico CR, Scalon SPQ, Gonçalves MC (2009). Fontes e níveis de salinidade na germinação de sementes de *Crotalaria juncea* L. Ciênc. agrotec. 33(3):753-757.
- Ribeiro LO, Barbosa S, Balieiro FP, Beijo LA, Santos BR, Gouvea CMCP, Paiva LV (2012). Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. Rev. bras. Bioci. 10(2):220-225.
- Sausen TL, Löwe TR, Figueiredo LS, Buzatto CR (2009). Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. Polibotanica. (27):145-158.
- Simoneto EL, Cruz-Silva CTA (2010). Alelopatia de sálvia sobre a germinação e o desenvolvimento do milho, tomate e girassol. Casc. 3(3):48-56.
- Sousa RCP, Chagas EA, Guimarães PVP, Nascimento Filho WB, Melo Filho AA (2015). Minerals in Aqueous Extract of the Coproducts *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae. Rev. Virtual Quím. 7(4):1299-1305.
- Sousa RCP, Santos DC, Neves LTBC, Chagas EA (2013). Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. Rev. Agro@mb. (Online). 7(3):366-372.
- Souza BA, Marchini LC, Oda-Souza M, Carvalho CAL, Alves RMO (2009). Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona Illiger*, 1806 (apidae: meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. Quím. Nov. 32(2):303-308. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000200007>.
- Souza BA, Roubik DW, Barth OM, Heard TA, Enríquez E, Carvalho CAL, Villas-Bôas JK, Marchini LC, Locatelli JC, Persano-Oddo L, Almeida-Muradian LB, Bogdanov S, Vit P (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. Intercienc. Carc. 31:867-875.
- Souza Filho APS, Guilhon GMSP, Santos LS (2010). Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. Planta Daninha. 28(3):698-697. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582010000300026>.
- Souza LMS, Silva JB, Gomes NSB (2013). Qualidade sanitária e germinação de sementes de copafba. Rev. Biosci. J. 29(1):1524-1531.

Trautmann NM, Krasny ME (1997). Composting in the Classroom, Scientific Inquiry for High School Students. Cornell University. Disponível em: <<http://cwmi.css.cornell.edu/compostingintheclassroom.pdf>>. Acesso em: nov. 2015.

Vieira JAG, Cartapatti-Stuchi GAS (2006). Efeito do tamanho das partículas e da tensão aplicada sobre a condutividade elétrica e o tempo de descongelamento do suco de manga. *Sitientib.* 35: 99-109.

Weir TL, Park SW, Vivanco JM (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(4):472-479.

WERL - Woods End Research Laboratory (2000). Interpretation of waste and compost test. 1(4):1-6.

Wong J, Mak K, Chan N, Lam A, Fanf M, Zhou L, Wu Q, Liao X, (2001). Co-composting of soybean residues and leaves in Hong Kong. *Bioresource Technol.* 76:99-106. Disponível em: <<http://www.fayetteville-ar.gov/DocumentCenter/Home/View/2086>>. Acesso em: nov. 2015.

Yuyama, K (2011). A cultura de camu-camu no Brasil. *Rev. Bras. Frut.* 33(2)335-690.

Zanatta CL, Schlabitiz C, Ethur EM (2010). Avaliação físico-química e microbiológica de farinhas obtidas a partir de vegetais não conformes à comercialização. *Alim. Nutr.* 21(3):459-468.

Zucconi F, Forte M, Bertoldi M (1981). Biological evaluation of compost maturity. *Biocycle.* 22(4):27-29.

CAPÍTULO V – ATIVIDADE ACARICIDA DE EXTRATO DESENVOLVIDO A BASE DE SEMENTES DOS FRUTOS DE CAÇARI

Resumo

No presente trabalho objetivou-se avaliar a atividade acaricida potencial in vitro de extrato desenvolvido a base de sementes de Myrciaria dubia (caçari) em diferentes concentrações sobre o ácaro- vermelho- das- palmeiras, Raiiella indica Hirst (Tenuipalpidae) com vistas disponibilização de bioproduto alternativo para prevenção relativa a propagação e disseminação de pragas que atacam as culturas agroalimentares e ornamentais. Foram avaliadas quatro concentrações, 1, 2, 4 e 8% de extrato hidro-álcool-glicólico concentrado com sementes de caçari, em cinco (05) repetições que consistiram de arenas formadas com pedaços de folíolos de palmeira de manila (Adonidia merrillii), de 4x4 cm, com 10 fêmeas adultas de R. indica em cada arena. As bandejas foram mantidas em BOD a 27±1 °C, 70±5% de umidade relativa do ar e 12:12 de fotoperíodo. Posteriormente, o número de fêmeas vivas e mortas foi contado após 24, 48 e 72 horas de aplicação do extrato. Este, apresentou atividade acaricida potencial sobre o R. indica nos tratamentos relacionados as doses 4 e 8 % com valores médios brutos de mortalidade superiores a 82 % nos intervalos de 48 e 72 h. Conclui-se que o bioproduto testado tem potencial biotecnológico para utilização como inseticida alternativo.

Palavras-chave: bioproduto, inseticida, Myrciaria dubia, Raiiella indica

Abstract

In the present study aimed to evaluate the acaricide activity potential in vitro extract developed Myrciaria dubia seed base (caçari) in different concentrations on the Raiiella indicates Hirst (Tenuipalpidae) with a view availability of alternative bioproduct prevention concerning propagation and spread of pests that attack the agri-food and ornamental crops. four concentrations were evaluated 1, 2, 4 and 8% concentrate hydro-alcohol glycol extract with seeds of caçari in five (05) repetitions that consisted of formed arenas of a piece of leaflets Manila palm (Adonidia merrillii), 4x4 cm with 10 female adult R. indicates each arena. The trays were kept in BOD at 27 ± 1 ° C, 70 ± 5% relative humidity and 24:12 photoperiod. Subsequently, the number of live and dead females was counted after 24, 48 and 72 hours to extract application. It was found that the byproduct is tested biotechnological potential for use as a natural insecticide. Acaricide shows potential activity against R. indicates the treatments related to dosis 4 and 8% of gross average values over 82% mortality in the ranges of 48 and 72 h. It follows that the tested bioproduct has biotechnological potential for use as an alternative insecticide.

Key-words: byproduct, insecticide, Myrciaria dubia, Raiiella indica.

1. Introdução

A busca de substâncias naturais alternativa vem aumentando a cada dia, para uso na prevenção relativa a propagação e disseminação de pragas que atacam as culturas agroalimentares e ornamentais, caso do ácaro-vermelho-das-palmeiras (*Raoiella indica*) Hirst (*Tenuipalpidae*) na Amazônia setentrional.

O *Raoiella indica* é conhecido como a principal praga das palmeiras. Com incidência atualmente nos países do hemisfério ocidental, já é reconhecido como uma severa praga da espécie *Cocos nucifera* L. (coqueiro) em muitos países do hemisfério oriental. Dispersa-se pelas correntes de ar, sendo transportada a partir de plantas infectadas para saudáveis, facilmente observáveis sobre as folhas verdes, sendo controlada basicamente por meio de produtos químicos (Rodriguez, Montoya e Ramos, 2007), não específicos para os mesmos, provavelmente por falta de estudos mais apurados que possibilitem a indicação e o registro devido, principalmente no Brasil.

No Brasil, esta praga foi reportada a primeira vez em 2009 no estado de Roraima (Navia et al., 2011) e, posteriormente, no Amazonas em 2011 (Rodrigues e Antony, 2011). Considerado uma praga quarentenária, além de causar danos pelo amarelecimento das folhas das plantas hospedeiras, a presença deste ácaro em regiões produtoras afeta a comercialização de produtos de áreas infestadas para áreas livres desta praga. Portanto, medidas atenuantes para prevenir ou retardar a propagação e disseminação dessa espécie são necessárias.

O ciclo biológico de *R. indica* compreende as fases de: ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto (Jeppson, Keifer e Baker, 1975). O ovo recém posto adere a superfície da folha e tem na extremidade livre uma estrutura fina em forma de pelo ou filamento, maior que o próprio ovo que age de forma, particularmente, negativa sobre os frutos da palmeira datilera (*Phoenix dactylifera*) e outras espécies de palmeiras (Rodriguez, Montoya e Ramos, 2007).

As larvas possuem três pares de patas, são avermelhadas e de movimentos lentos (Jeppson, Keifer e Baker, 1975). Alimentam-se, geralmente, por um período de 3-5 dias, antes de começar o estado de repouso, que demora entre 1-2 dias (Rodriguez, Montoya e Ramos, 2007). E dependendo, do produto da alimentação podem desenvolver manchas escuras na parte dorsal posterior do corpo (Hoy, Peña e Ru, 2015). O corpo é oval e pode medir de 120 a 160 µm de comprimento e de 100 a 120 µm de largura (Nageshachandra e Channabasavanna 1984).

Portanto, a aplicação em larga escala de produtos químicos na área de infestação seria uma estratégia para reduzir a dispersão de *R. indica*, entretanto é economicamente e ambientalmente dispendiosa (Navia et al., 2011). Além disso, não há registro, até o presente

momento, de pesticidas (inseticidas) para o controle dessa espécie no Brasil. Somente, ensaios laboratoriais visando avaliação de eficiência de alguns acaricidas já foram realizados e os produtos que apresentaram êxito foram abamectina, fenpiroximato, milbemectina e spirodiclofeno (Assis, Morais e Gondim, 2013).

Como alternativa, muitas plantas medicinais e especiarias tropicais têm sido utilizados como agentes de controle de pragas (Lale, 1992). De acordo com Pereira et al. (2008), inseticidas de origem vegetal (pós, óleos e extratos) podem provocar a mortalidade, repelência, efeitos no crescimento, redução na oviposição e na emergência de adultos de determinadas pragas (BOEKE et al., 2004; KETOH et al., 2005; LALE e ABDULRAHMAN, 1999; PASCUAL-VILLALOBOS e BALLESTA-ACOSTA, 2003). Geralmente, possuem baixa toxicidade para o homem e animais, baixo custo e são fáceis de serem adquiridos e utilizados pelos produtores.

No entanto, a atividade inseticida de qualquer extrato de plantas depende dos constituintes ativos do extrato vegetal (Asawalam et al., 2007). Assim, para seleção/indicação de uma planta com atividade inseticida é necessário estudos preliminares ou registros anteriores com indicativos da sua potencialidade, como por exemplo, as plantas da família Myrtaceae.

A família Myrtaceae, apresenta distribuição pantropical e subtropical, possui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies. No Brasil são 23 gêneros e, aproximadamente, 1000 espécies (Paula et al., 2010), algumas com grande potencial já comprovado. Dentre estas, destaca-se o caçari ou camu camu (*Myrciaria dubia*) pressuposto por Genovese et al., (2008) como fonte de compostos bioativos com conteúdo de fenólicos totais em torno de 397 mg/100 g, apresentando derivados de quercetina, kaempferol como principais flavonóides e cianidina, bem como teores totais de ácido elágico em torno de 48 mg/100 g em polpas congeladas extraída dos frutos (Genovese et al., 2008).

O camu camu cresce na margem dos rios e lagos de toda a bacia Amazônica (DELGADO e YUYAMA, 2010; YUYAMA, 2011) sendo conhecido, pelo alto teor de vitamina C, capacidade antioxidante (CORREA et al., 2011) e por possuir propriedades adstringentes que são encontradas tanto na polpa quanto na casca (CHIRINOS et al., 2010).

Por conta disso, os frutos da família Myrtaceae, a qual pertence o caçari, tem sido foco de inúmeros estudos por apresentarem significativo conteúdo de substâncias antioxidantes (LANGUER VARGAS et al., 2015). O perfil químico da família caracteriza-se, basicamente, pela presença de taninos, flavonóides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenóides e outros (Cruz e Kaplan, 2004; Schneider et al., 2008). Portanto, potenciais fontes para obtenção de compostos biologicamente ativos.

Uma vez obtido um composto biologicamente ativo, como por exemplo, a base de extratos vegetais de componentes do camu camu, pode-se lançar mão de estudos envolvendo modificação molecular, também, chamada de variação molecular ou manipulação molecular (Cechinel Filho e Yunes 1998). E ainda, dos processos biotecnológicos, os quais exibem atualmente características econômicas e operacionais que possibilitam a produção de grande número de metabólitos de interesse industrial (Sousa, 2013). Bem como, a simplicidade, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo dos testes biológicos (Hamburger, 1991).

Nesse contexto, dentre as opções de manejo fitossanitário compatíveis com a qualidade ambiental, o uso de extratos vegetais possuidores de substâncias bioativas (Santos et al., 2007) e a exploração da atividade biológica dos metabólitos secundários de plantas (Amorim, et al., 2011) surgem como uma forma potencial de controle alternativo de doenças e pragas das plantas cultivadas.

Assim, com vistas a recomendação e disponibilização de substâncias naturais alternativa, bioprodutos fitossanitários para prevenção relativa à propagação e disseminação do ácaro-vermelho das-palmeiras na Amazônia setentrional, Brasil, neste trabalho teve-se por objetivo avaliar a atividade acaricida potencial de extratos desenvolvidos a base de sementes de caçari (*Myrciaria dubia*) bioprocessadas com diferentes concentrações sobre o *Raoiella indica* Hirst (*Tenuipalpidae*) em bioensaio *in vitro*.

2. Materiais e métodos

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios de Resíduos e de Entomologia da Embrapa Roraima em 2015.

2.1 Preparo dos extratos

No laboratório de Resíduos foi desenvolvido o extrato hidro-álcoolglicólico (Hag) concentrado de sementes de *M. dubia* bioprocessadas anteriormente, coletadas de frutos do caçari provenientes de prospecção tecnológica na Amazônia setentrional, via processo de cossolvência, uma mistura quantitativa de água destilada, álcool etílico (95%) e glicerina PA.

A partir desse extrato foram preparadas quatro concentrações (1, 2, 4 e 8 %) para uso na avaliação da atividade acaricida potencial no laboratório de entomologia via bioensaio *in vitro*.

2.2 Bioensaio de atividade acaricida

Para cada tratamento foram utilizadas cinco (05) repetições, que consistiram de arenas formadas de um pedaço de folíolos de palmeira de manila (*Adonidia merrillii*), de 4x4 cm, com 10 fêmeas adultas de *R. indica* em cada arena.

Os folíolos da palmeira foram mergulhados, por cinco segundos, na solução com seu respectivo tratamento. Após a secagem por 10 minutos, os folíolos foram colocados individualmente em bandejas com uma camada de espuma de polietileno de um centímetro de espessura umedecida em água destilada.

As bandejas mediam 17,8 cm com diâmetro de e 2,7 cm de altura e foram cobertas com tampa que apresentava uma abertura circular com 6,0 cm de diâmetro, vedada com tecido voal. As bordas dos folíolos foram recobertas com algodão umedecido e internamente por circundada com cola entomológica, para manter a turgescência da folha e impedir o escape dos ácaros.

Posteriormente, 10 fêmeas de *R. indica*, obtidas de folhas de *A. merrillii* infestadas naturalmente no jardim da sede da Embrapa Roraima, foram transferidas para os folíolos com auxílio de um pincel de cerdas finas. As bandejas foram mantidas em BOD a 27 ± 1 °C, $70\pm 5\%$ de umidade relativa do ar e 12:12 de fotoperíodo.

O número de fêmeas vivas e mortas na arena foi contado 24, 48 e 72 horas após a instalação do experimento.

2.3 Análise estatística

Os valores da mortalidade das fêmeas de *R. indica* foram corrigidos, utilizando a fórmula de Abbott (1925) e submetidos à análise de regressão e à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Adotou-se a fórmula de Abbott (1925) com adaptações para cálculo da eficiência agrônômica (EA), eficiência dos tratamentos (ET) e eficácia do extrato (EE) em cada tratamento, utilizando as seguintes expressões, respectivamente:

$(EA\%) = t/p * 100$ onde *t* é a infestação nas testemunhas e *p* é a infestação nas tratamentos.

$(ET\%) = (T-t) * 100 / T$, onde "*T*" é o o nº de ácaros mortos no tratamento, e "*t*" nº de ácaros mortos na testemunha (C1).

$(EE) =$ média das taxas de mortalidade (*M*) por tratamento, em cada repetição, corrigida conforme fórmula de Abbott (1925), descrita a seguir:

$Mc(\%) = \%Mo - \%Mt \times 100/100 - \%Mt$ onde: Mc = Mortalidade corrigida, Mo = Mortalidade observada e Mt = Mortalidade na testemunha (C2)

Para a estimativa da CL_{50} , foi utilizada a análise de Probit (Finney, 1971; Castilhos et al., 2001), método gráfico para dose-resposta - Probit, onde se representa a mortalidade acumulada em % (no eixo Y) e a concentração no eixo X (log-ln transformado).

3. Resultados e discussões

3.1 Atividade acaricida potencial do bioproduto desenvolvido em diferentes concentrações sobre o *Raoiella indica* Hirst (*Tenuipalidae*)

Estão demonstrados na Tabela 1 os percentuais de mortalidade de *Raoiella indica* obtidos pela contabilização e média do número de indivíduos nos diferentes tratamentos 1, 2, 4 e 8% nas concentrações de 10, 20 40 e 80 mg.mL⁻¹ e intervalos de avaliação. São resultados preliminares obtidos na avaliação da atividade acaricida potencial de bioproduto elaborado com sementes de *M. dubia* bioprocessada.

Tabela 1: Mortalidade (%) (média ± erro padrão) de *R. indica* nas diferentes concentrações do extrato hidroálcoolglicólico de sementes de *M. dubia* bioprocessada e testemunha, 24, 48 e 72 horas após a instalação do bioensaio *in vitro*.

Tratamento (%)	Concentração (mg.ml ⁻¹)	Mortalidade (%)		
		24 h	48 h	72 h
Água	0	2 a	8 a	10 a
1	10	16 a	26 a	40 b
2	20	48 b	62 b	82 c
4	40	56 b	82 bc	86 c
8	80	96 c	100 c	100 c
Erro padrão		7,429	7,456	6,755

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Autoria própria (2015)

Houve diferenças estatísticas entre a mortalidade média de *R. indica* nos folíolos tratados com extrato de sementes de caçari, em todas as concentrações, e o controle. A concentração de 80 mg.ml⁻¹ foi a mais letal para as fêmeas, com eficiência de controle de 96 e 100 %, 24 e 48 horas após a aplicação do produto (Tabela 1).

Para registro de agrotóxico junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o produto deve apresentar eficiência de controle comprovada acima

de 80% para cada alvo biológico. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o extrato hidroalcoólglicólico de sementes de caçari nas doses de 4% e 8% em 48 h, atendem essa prerrogativa, Figura 1.

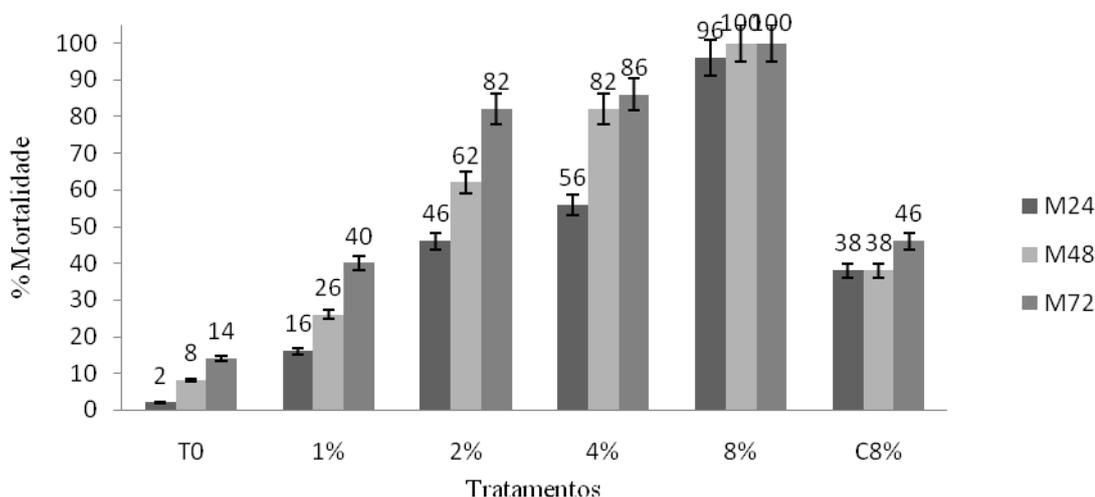


Figura 1 – Mortalidade total (%) de fêmeas de *R. indica* em folíolos de *Adonidia merrillii* em 24 h, 48 h e 72 h após aplicação com água (T0), extratos Hag com e sem sementes de *M. dubia* bioprocessada, 1, 2, 4, 8% e C8%.

Fonte: Autoria própria (2015)

Testes de eficácia com resultado igual ou superior a 80% de morte dos animais sinantrópicos ou repelência, em caso de repelentes, os quais podem ser aferidos nas primeiras 48 horas ou 96 horas de aplicação do produto são classificados pela ANVISA (2002) como satisfatórios, fato verificado nesse estudo. Na Figura 1 observa-se que os maiores índices de mortalidades aconteceram nos tratamentos com as dosagens de 4 e 8% (82 a 100 % de mortalidade) nos intervalos de 48 e 72 horas.

Como são provenientes de dados brutos, por meio da fórmula de Abbott (1925) obteve-se a comprovação da eficiência agrônômica e eficácia do bioproduto nos intervalos de 24, 48 e 72 horas nas diferentes concentrações estabelecidas e devidamente interrelacionados ao C1 (Testemunha) e C2 (bioproduto sem material vegetal a 8 %). Os resultados obtidos nos testes de eficiência e eficácia estão apresentados nas Tabela 2 e 3.

3.2 Testes de eficiência e eficácia comprobatórios do potencial biotecnológico do bioproduto desenvolvido sobre *R. indica* nas dosagens 1, 2, 4 e 8 % e intervalos de 24, 48 e 72h.

De acordo com Silva et al. (2010), Lima, Moreira e Aragão (2013), a atividade inseticida de extratos de plantas pode ser manifestada através da mortalidade direta, repelência, esterilidade, interferência no desenvolvimento e modificação no comportamento

dos artrópodes. Na Tabela 2 verificou-se essa manifestação com relação aos resultados obtidos, com a aplicação de diferentes doses do bioproduto.

Tabela 2 – Número de indivíduos vivos e valores médios obtidos no teste de eficiência agrônômica nas diferentes concentrações de bioproduto composto de *M. dubia* bioprocessada, nos intervalos de 24 a 72 h.

Controle/doses (mg/mL)	No de indivíduos vivos (V) nos intervalos			% Eficiência (E) agrônômica nos intervalos		
	V24	V48	V72	E 24 h	E 48 h	E 72 h
Controle (C2)	6 bc	6 bc	5 bc	14	20	30
10	8 bc	7 bc	6 c	47	59	79
20	5 b	4 ab	2 ab	55	80	84
40	4 ab	2 a	1 ab	96	100	100
80	0	0 a	0 a	100	100	100
DMS	4,15	4,16	4,59	-	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Autoria própria (2015)

O bioproduto apresentou eficiência agrônômica satisfatória, acima de 80%, a partir das doses 20, 40 e 80 mg/mL (Tabela 2). Já com relação aos tempos de aplicação verificou-se que em 24 horas somente as doses 40 e 80 mg/mL foram efetivas com 96 e 100 % de eficiência. Em 48 e 72 horas verificou-se que foram efetivas a partir das doses 20, 40 e 80 mg/mL com valores de 80 a 100% de eficiência agrônômica (Tabela 2).

Tabela 3 – Valores médios percentuais e índices de eficácia obtidos pela fórmula de Abbott nas diferentes concentrações e intervalos de aplicação de bioproduto composto de sementes *M. dubia* bioprocessada na mortalidade de *R. indica*.

Tratamentos concentração (mg/mL)	% de indivíduos mortos na arena (M) e na cola (MC) nos intervalos			% Mortalidade total corrigida (MTC) nos intervalos			% Mortalidade nos intervalos
	M+MC24h	M+MC48h	M+MC72h	MTC 24 h	MTC 48 h	MTC 72 h	média corrigida
1% (10)	16	26	40	12	10	12	11
2% (20)	46	62	72	42	46	44	44
4% (40)	56	82	86	52	66	58	59
8% (80)	96	100	100	92	84	72	83

Fonte: Autoria própria (2015)

Com relação a eficácia do bioproduto no bioensaio in vitro, obteve-se índice médio de 83% referente aos três intervalos de tempo avaliados na concentração de 80 mg.mL⁻¹. Observou-se nessa mesma concentração os maiores índices 92 e 84 % (Tabela 3) de atividade acaricida nos intervalos de 24 e 48 h, respectivamente. Na Figura 2 está apresentado o gráfico ajustado para os intervalos de tempo de exposição 24 e 48 h, para a espécie *R. indica* com suas respectivas expressões de regressão (A) e um gráfico analítico da regressão dose-resposta

- Probito, a mortalidade acumulada em % (no eixo Y) e a concentração no eixo X (log-ln transformado), gerando uma resposta do tipo simoidal (B).

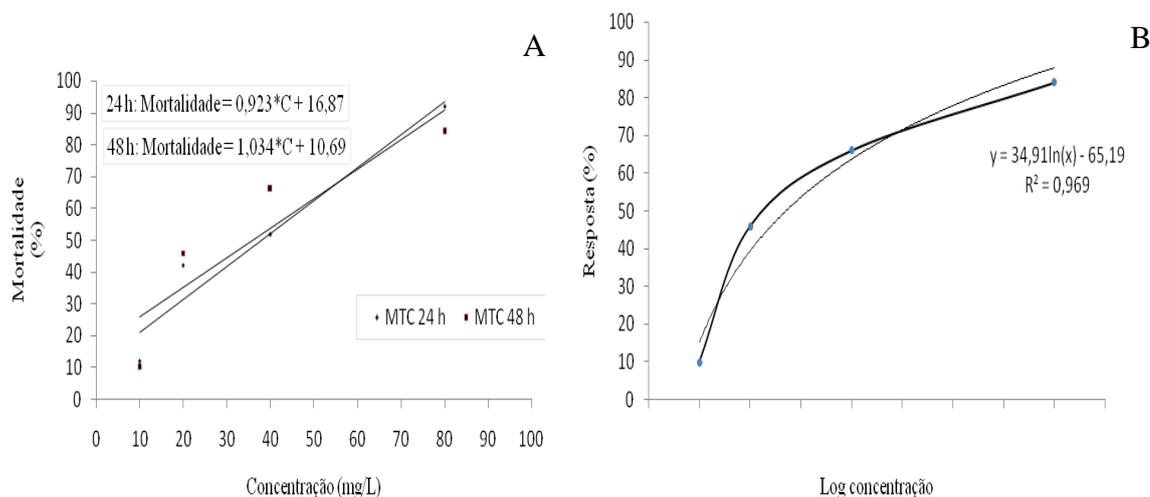


Figura 2: Linha de regressão mortalidade vs concentração nos tempos de 24 e 48 h (A) e relação dose-resposta em 48 h com transformação Probit e logarítmica (B) entre diferentes doses do bioproducto para espécie *R. indica*

Fonte: Autoria própria (2015)

Na Figura 2, observou-se que ambos os tempos avaliados não apresentaram diferenças significativas entre as linhas de regressão (Figura 2-A). A partir dessas expressões obtiveram-se índices de mortalidade de 93,41 e 84,53 % de *R. indica*, respectivamente, em 24 e 48 h com a concentração de 80 mg/mL. Verificou-se que a taxa de mortalidade do bioproducto - extrato Hag de *M. dubia* variou conforme o aumento das doses, como demonstrado na curva dose-resposta (Figura 2-B).

A partir da aplicação de expressão logarítmica (Figura 2-B) obteve-se, também, uma estimativa da concentração letal mediana (CL₅₀), 27,3 mg/mL com intervalo de confiança de 96,9 %, o qual constitui-se no primeiro registro obtido das médias de mortalidade de *R. indica* nas doses de 1, 2, 4 e 8 % de bioproducto no intervalo de tempo de 48 h, o que facilita a comprovação ou indicativo preliminar da bioatividade do extrato Hag composto de sementes de *M.dubia*.

De acordo com Colegate e Molyneux (1993), o ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos. Fato constatado e observado nesse estudo (Figura 2-B) com aplicação da expressão logarítmica. Os dados obtidos confirmaram a efetividade do bioproducto com índices superiores a 50 % de letalidade, a partir das doses de 4 e 8 % para *R. indica* (ácaro-vermelho-das-palmeiras).

O modelo de Probit se ajustou aos dados de mortalidade de *R. indica* (χ^2 , $p > 0.05$). Às 24 horas, as concentrações estimadas que ocasionassem 50 e 90% de mortalidade (CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente) foram 35,89 mg/mL e 79,23 mg/mL. Às 48 horas, as concentrações estimadas que ocasionassem 50 e 90% de mortalidade (CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente) foram 38,01 mg/mL e 76,70 mg/mL (Figura 2).

O extrato, apresentou atividade acaricida potencial sobre *R. indica* nos tratamentos relacionados as doses 4 e 8 % com valores médios brutos de mortalidade superiores a 82 % nos intervalos de 48 e 72 h. Dentre as doses testadas verificou-se que a mais indicada para controlar o ácaro-vermelho-das-palmeiras é a de 8%, na concentração de 80mg mL⁻¹ que causou 84% de mortalidade das fêmeas. Este resultado demonstrou que o bioproduto tem efeito satisfatório, ou seja, apresenta bioatividade, moléculas naturais (metabólitos secundários), capazes de neutralizar e/ou eliminarem o patógeno-alvo.

Estudos já têm demonstrado que extratos obtidos de *M. dúbia* tem efeito neurotóxico sobre *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) (Azevêdo et al., 2015). Dentre os compostos envolvidos na neurotoxicidade estão o ácido ascórbico, proantocianidinas, o ácido elágico e flavonoides, como miricetina e quercetina (Azevêdo et al., 2015). Assim, estudos são necessários para verificação de como estes compostos agem sobre os ácaros. Segundo Roel (2001) a diversidade molecular dos metabólitos secundários oriundos das plantas, poderá retardar o processo de resistência no inseto. Neste estudo, verificou-se que o bioproduto causou mais de 80% de mortalidade em 48 h, o mínimo exigido pela ANVISA (2002) para que um produto seja recomendado.

4. Conclusões

O bioproduto a base de sementes de *Myrciaria dubia* bioprocessadas tem potencial biotecnológico para utilização como acaricida natural.

Pesquisas futuras são necessárias para determinação da ação de seus metabolitos, bem como, testes de toxicidade e eficácia a campo. E ainda a realização de testes de eficiência deste bioproduto sobre as outras fases do *R. indica*.

Referências

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, n. 1, p. 265-267, 1925.
- AMORIM, E. P. R.; ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. S.; SILVA, J. C.; LIMA, R. S.; LEMOS, E. E. P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o

desenvolvimento de *Ralstonia Solanacearum* em mudas de bananeira. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 33, n. spe1, p. 392-398, Oct. 2011. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000500050&lng=en&nrm=iso>. access on 26 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000500050>.

ANVISA - Ofício n.º 154/DICOL/GGSAN - ANVISA 20/12/2002 - Classifica como satisfatórios os testes de eficácia com resultado igual ou superior a 80% de morte dos animais sinantrópicos ou repelência, em caso de repelentes.

ANVISA - Manual de Testes de Eficácia em Produtos Desinfestantes – 3ª Ed. – ANVISA, 2009, Cap. 06

ASAWALAM, E. F.; EMOSAIRUE, E. F.; WOKOCHA, R. C. Insecticidal effects of powdered parts of eight Nigerian plant species against maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Entomology and Agricultural Food Chemistry** 6 (11): 2526-2533. 2007.

ASSIS, C. P. O.; MORAIS, E. G. F.; GONDIM Jr. M. G. C. Toxicity of acaricides to *Raoiella indica* and their selectivity for its predator, *Amblyseius largoensis* (Acari: Tenuipalpidae: Phytoseiidae). **Experimental & Applied Acarology**, 60, 357 – 365. 2013.

AZEVÊDO, JULIANA C.S.; BORGES, KÁTIA C.; GENOVESE, MARIA I.; CORREIA, ROBERTA T.P. ; VATTEM, DHIRAJ A. . Neuroprotective effects of dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) residue in *C. elegans*. **Food Research International**, v. 73, p. 135-141, 2015.

BOEKE, S. J.; BAUMGART, I. R.; LOON, J. J. A.; HUIS, A.V.; DICKE, M. V; KOSSOU, D. K. Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stored cowpea against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 423-438, 2004.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, Feb. 1998. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000100015&lng=en&nrm=iso>. access on 29 Feb. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 04, p. 1019-1024, 2010.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, an Structural Determination**. Boca Raton: CRC, 1993.

CORREA, S. I.; FREYRE, S. P.; ALDANA, M. M. Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, del INIA Loreto-Perú. **Scientia Agropecuaria**, v. 02, n. 04, p. 189-201, 2011.

CRUZ, A.V. M.; KAPLAN, M.A.C. **Estudo comparativo do perfil químico e o uso popular de espécies das famílias myrtaceae e melastomataceae**. Rio de Janeiro: UFRJ/Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

DELGADO, J.P.M. YUYAMA, K. Comprimento de estaca de camu-camu com ácido indolbutírico para a formação de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 522-526, 2010.

FERREIRA, D.F. **Sisvar: A computer statistical analysis system**. *Ciênc. e Agrotec.* 35(6):1039-1042. 2011.

GENOVESE, M.I.; PINTO, M.S.; GONÇALVES, A.E.S.S.; LAJOLO, F.M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v.14, p.207,2008.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n.12, p. 3864-3874, 1991. [Links]

HOY MARJORIE, A.; PEÑA, J.E.; RU, N. **Red Palm Mite, Raoiella indica Hirst (Arachnida: Acari: Tenuipalpidae)**. *Featured*. EENY-397; 2006. Original publication date November 2006. Revised April 2010 and August 2015. Acesso: 27 Jan 2016. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN71100.pdf>.

JEPPSON, L.R.; KEIFER, H.H.; BAKER, E.W. **Mites injurious to economic plants**. University of California Press, Berkeley; 1975, Califórnia, USA, 614pp.

KETOH, G. K.; KOUMAGLO, H. K.; GLITHO, I. A. Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 363-371, 2005.

LALE, N. E. S. **Oviposition deterrent and repellent effects of product from dry chill pepper fruits, capsicum species on *Callosobruchus maculatus***. *Post Harvest Biology and Technology* 1: 343-348. 1992.

LALE, N. E. S.; ABDULRAHMAN, H. T. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed oil obtained by different methods and neem powder for the management of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 135-143, 1999.

LANGUER, V. B.; AMARO, G. F.; OZAKI, Y. L. K.; DAS CHAGAS, A.S. F.; PAIVA, L. A. J. Efeito das cápsulas de camu-camu sobre a glicemia e o perfil lipídico de adultos saudáveis. **Rev Cubana Plant Med**, Ciudad de la Habana, v. 20, n. 1, marzo 2015. Disponible en <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000100005&lng=es&nrm=iso>. accedido en 28 feb. 2016.

LIMA, B. M. F. V.; MOREIRA, J. O.T.; ARAGAO, C. A. Avaliação de extratos vegetais no controle de mosca-branca, *Bemisia tabaci* biótipo B em abóbora. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 44, n. 3, p. 622-627, Sept. 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902013000300026&lng=en&nrm=iso>. access on 07 Mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902013000300026>.

PAULA, J.A.M.; REIS, J.B.; FERREIRA, L.H.M.; MENEZES, A.C.S.; PAULA, J.R. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12(3), 363-379. 2010. Retrieved February 28, 2016, from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000300015&lng=en&tlng=pt.

NAGESHACHANDRA, B.K.; CHANNABASAVANNA,G.P.; (1984) **Development and ecology of Raoiella indica Hirst (Acari: Tenuipalpidae) on coconut**. In: Griffiths DA, Bowman CE (eds), *Acarology VI*, Ellis Horwood Publishers, Chicester, UK. p785–790.

NAVIA, D.; MARSARO Jr. A.L.; SILVA, F.R.; GONDIM Jr, M.G.C.; MORAES, G.J. First report of the red palm mite, *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae), in Brazil. **Neotropical Entomology**, 40(3), 409-411. 2011. Retrieved January 26, 2016, from

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2011000300018&lng=en&tlng=en.

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; BALLESTA-ACOSTA, M. C. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 673-679, July 2003.

PEREIRA, A. C. R. L. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 3, p. 717-724, maio/jun., 2008

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Interações**, Campo Grande, v. 1, n. 1, p. 43-50, 2001.

RODRIGUES, J. C. V.; ANTONY, L. M. K. First report of *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) in Amazonas state, Brazil. **Florida Entomologist**, Florida, USA, v. 94, p. 1073-1074, 2011.

RODRIGUEZ, H; MONTOYA, A; RAMOS, M. *Raoiella indica* HIRST (ACARI: TENUIPALPIDAE): UNA AMENAZA PARA CUBA. **Rev. Protección Veg.**, La Habana, v. 22, n. 3, dic. 2007. Disponible en <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522007000300002&lng=es&nrm=iso>. acesso em 26 janeiro 2016.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; RESENDE, M. L.V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; MANERBA, F. C. Efeito de Extratos Vegetais no Progresso de Doenças Foliares do Cafeeiro Orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.59-63, 2007.

SCHNEIDER, N. F. Z.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; MARINS, K.; MARANGONI, C.; FLACH, A.; *Rev. Bras. Farm.* **2008**, 89, 131.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Extratos de Plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Coord.). *Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica*. Viçosa: EPAMIG, 2010. 232 p.

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n.6, p.1599-1607, Dec.2002. Available from <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2002000600014&lng=en&nrm=iso>. access on 16 May 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2002000600014>.

SOUSA, R. C. P.; SANTOS, D. C.; NEVES, L. T. B. C.; CHAGAS, E. A. Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. **Agro@ambiente**, v. 7, p. 366-372, 2013.

YUYAMA, K. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 335-690, 2011.

CAPÍTULO VI – EFFECT OF SOME MYRTACEAE PLANTS EXTRACTS ON *Callosobruchus maculatus* IN GRASS LEGUME

ABSTRACT

Some plants of the Myrtaceae family have active principles that inhibit the development and growth of many insects, . In the present study, we evaluated the bioactivity of three doses of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, Myrtaceae seeds extract of, against *Callosobruchus maculatus* within a experimental field of the grass legume *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea). The sequential probability ratio test for the period and minimum dose of extract application was applied with and without the presence of *M. dubia*, inter-related to the health and physiological behavior of cowpea, evaluated initially at six and fifty days of infestation. The positive effect was obtained around 94% for the health and in the physiological evaluation, an average value of 73% of effectiveness on the doses tested, which showed no significant difference with each other. In the *In vitro* conditions, the extract causes the death of adult *C. maculatus* and standstill of hatchings in cowpea.

Keywords: physiological assessment, bioactivity, *Myrciaria dubia*, pesticide, seeds, *Vigna unguiculata*.

Abbreviations

(Bp) bioproduct; (C) control; (HAG) hydro-alcohol glycol; (W) Witness treatment.

INTRODUCTION

Callosobruchus maculatus (Fabr, 1775.) (Coleoptera: Chrysomelidae), commonly known as cowpea weevil is the major pest insect of stored grass legume cowpea (*Vigna unguiculata*) (L.) Walp. It compromises the grain and seed quality and germination capacity (Dongre et al., 1996), reducing the weight of seeds up to 60%, causing enormous damage to producers (Tanzubil, 1991). It is necessary, therefore, to control this through chemical insecticides, generally applied in the form of pest fumigation for grain disinfestation (Almeida et al., 2006).

The problem is that there is very limited number of registered insecticides available to control this type of insect pests (Lima et al., 2014). Moreover, when the application criteria of dosages and safety guidelines present in the label and description leaflet of these products are not properly followed, this practice can dramatically compromise the environment and human health.

The insecticides of plant origin (powders, oils and extracts) were considered promising for integrated management of *C. maculatus* in storage units (Pereira et al., 2008). They act by contact, ingestion and fumigation (Almeida et al., 2005; Sousa et al., 2005; Brito et al., 2006), causing mortality, repellency, effects on growth, reduction in oviposition and adult emergence (Lale and Abdulrahman, 1999; Pascual-Villalobos and Ballesta-Acosta, 2003; Boeke et al., 2004; Ketoh et al., 2005). They generally have low toxicity to humans and animals, low cost and ease of acquisition and use by producers (Pereira et al., 2008). The natural compounds have also advantages over synthetic compounds due to the absence of halogenated molecules, an inferior half-life and, in most instances, water solubility, providing inhibitory activity at lower concentrations (Duke et al., 2000; Oliveros-Bastidas 2008; Imatomi et al, 2015). Thus some scholars (Cutler and Schmutteres, 1999; Ducrot., 2005; (Dequech et al., 2008); Mendoza et al, 2008) postulated , that the use of extracts from plant species that act as

biocontrol, due to the presence of secondary metabolites, would be a viable alternative for the control of pest insects, mainly in small cultivation areas, such as gardens, and small grain storages.

Another advantage of vegetable insecticides is that they are compatible with other low risk options acceptable in the control of insects such as pheromones, oils, soaps, entomopathogenic, predator and parasitoid fungi, which greatly increases the chances of integration to an integrated pest management program (Molina, 2001).

Currently, the production of large numbers of metabolites of industrial interest, important new bioactive chemicals (*NCEs*) has been obtained from natural resources and waste recycling (bioprocessed remnants) and/or agribusiness by-products, abundantly available in Brazil (Maciel, 2006), through biotechnological processes, as the case of plant insecticides.

In Brazil, there is a high biodiversity of plant species, most of them scientifically unknown, especially those of Amazon origin. Possibly, in primary and secondary metabolism of these species, various compounds are biologically active and could possess fungicidal, insecticidal, cytotoxic, antiviral, tranquilizer, analgesic action, among others (Pletsch, 1998).

Many plant families such as Myrtaceae, Asteraceae, Piperaceae are well known to have active ingredients like terpenoids and amide groups, which have antifeedant, repellent and insecticide effect that inhibits the development and growth of many insects of the *Lepidoptera* order (Srivastava et al., 2000; Mendoza et al., 2008).

Researchers have recently found that aqueous extracts of the leaves of the Myrtaceae plant species have bioactivity (Silva Junior and Orefice, 2001; Imatomi et al., 2015). The extracts have potential for the isolation of specific active compounds to be used in the production of natural herbicides in future (Imatomi et al., 2015).

Myrciaria dubia (camu camu) of the Myrtaceae family is rich of secondary metabolites (Fracassetti et al., 2013). It grows along the banks of rivers and lakes throughout the Amazon basin (Delgado and Yuyama, 2010; Yuyama, 2011). It is known for high content of vitamin C, 800-6100 mg/100 g, according to Yuyama (2011), present in the pulp of its fruit, antioxidant capacity (Correa et al., 2011) and has astringent properties found both in the pulp and in shell (Chirinos et al., 2010).

The secondary metabolites produced by plants were considered as special metabolites (Gottlieb, 1996). These are specific of the species and participate in intra- and intercellular interactions of the organism itself or with cells of other organisms (Montanari and Bolzani, 2001). Therefore, according Schwan-Estrada et al., 2003, exploitation of the biological activity of secondary compounds present in the essential oil or plant extract may be an option to safely reduce the use of pesticides.

Active compounds found in plants have been commercially valued, via biotechnological processes for various industries. They contribute to the resistance against pests and diseases, among others, while maintaining favorable environmental conditions (Braz-Filho, 2010). The greatest difficulty is the technical-scientific finding of bioactivity in extracts developed fast, and the determination of an appropriate concentration (Bogorni and Vendramim, 2007).

Quick verifications of bioactivity was identified in aqueous extract of medicinal plants in fava bean seeds via physiological and health behavior (Nobre et al. 2014). Germination test, first count of germination, germination speed index, root length in the first and last count, and sanity test were performed (Nobre et al. 2014).

Thus, the present study aimed to evaluate the compound product bioactivity with seeds of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, Myrtaceae, bioprocessed in *in vitro* bioassay, via physiological and health behavior of *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea) without prior treatment in order to use them for the biocontrol of *Callosobruchus maculatus*.

MATERIALS AND METHODS

Study site and provenance of the plant material

The experimental studies were conducted from May to December 2015, in the residues and seeds laboratories of the Brazilian Agricultural Research Corporation, located (02°45'28 "N 60°43'54" W) in Boa Vista-Roraima, Brazil.

Samples of the plant material – BR: Bioprocessed remaining the fruits of *Myrciaria dubia*

The BR samples were obtained from 10 materials that were stored and preserved in a freezer since the collection period, 2012-2014.

Obtaining cowpea samples and preparation of compound extract of *Myrciaria dubia* seeds

Cowpea seeds (BRS Aracê) infested with *C. maculatus* were obtained in the demonstration unit of the Brazilian Agricultural Research Corporation. They were taken to the seed laboratory (21 ± 3°C and 65 ± 5% relative humidity) in November, already contaminated by weevils (*Callosobruchus maculatus*).

Based on expertise procedures (Mapric, 2001 and Ardisson et. al., 2002), the extract composed of *Myrciaria dubia* seed was obtained in May, in the company's waste laboratory, from a mixture of distilled water-based solvents, ethyl alcohol (95%) and PA glycerin and powders of seeds, pre-dried and crushed, grown in the northern Amazon. Named as concentrate hydro-alcohol glycol extract (Hag) - bioproduct (Bp) bioprocessed *M. dubia* seeds-based bioproduct.

To perform preliminary *in vitro* bioassay, the Hag extract, concentrated and maintained under semi-controlled room temperature, was diluted at 8% for performing the treatment on contaminated cowpea sample, applying three doses (1, 2 and 3 ml) of Hag.

Bioassay with cowpea seeds and bioproducts - Preparation

From the sample of approximately 2 kg of cowpea seeds, contaminated by weevils, three sub-samples of 600 g were weighed and split into three aliquots of work, 200 g each. These were identified and prepared as Bioproduct (Bp), control (C) and Witness (W).

In the samples Bp and C containing cowpea seeds, three previously prepared doses (1, 2, 3 mL) of Hag extract were applied, with and without plant product (seed powder of *M. dubia*), both unprecedented. In the T sample containing the same seeds, only water was applied.

Later, these were manually shaken for 1 minute to homogenize the surface of the seeds and then kept at constant temperature of 24 °C in the seed laboratory.

Properly treated samples were divided into four replicates (I, II, III and IV) of 50 g and placed in glasses with screened lids.

The bioassay was established based on the sequential probability ratio test (Wald, 1947), statistical method characterized by the fact that the number of observations is not fixed before conducting the experiment. The decision to continue or complete the assessment depends on the results obtained at each stage (Wald, 1947).

Thus, taking into account the partial information obtained from sampling, health (Nobre et al., 2014) and germination tests (Brasil, 2009) of samples were established to verify the bioactivity, pre-selection of a minimum dose and appropriate period of application of the product in contaminated cowpea samples with oviposition of pest insects, *C. maculatus* (weevil)

Bioassay assessment - Health and physiological behavior of samples

The bioassay was evaluated in a randomized experimental design, arranged in a factorial 2 x 4, according to results obtained in the sequential probability ratio test for the period and minimum dose of application interrelated to health and physiological performance of samples. We used two extracts (C and Bp) and four doses (0, 1, 2 and 3 ml), with four replications, and the dose 0 related to the T sample and the others, C and Bp.

Thus, after six days of bioassay installation, the hatched weevils were removed from the glass jars, counted and discarded, remaining only the seeds. Completing 10 days, new withdrawal and counting of insect pests were held successively at 21, 30, 40 and 50 days and the population level evaluated by measures of relative population (number of insects per survey) and population indices (average products and the effects caused by insects) according to Castellani and Brandao (2000).

The assessment of the damage to seeds and adult emergence of *C. maculatus* on cowpea was held at fifty days of the application of bioproducts. Based on Almeida et al. (2015) the number of hatched insects was counted, mass loss of seeds in study quantified, and by weighing the remaining mass by the difference of the initial weight, the loss percentage was calculated.

In order to quantify the mass and evaluate the number of grains with holes caused by emerged adults, and set the percentage and number of holes per grain, 100 grains were separated from the sub-sample. These were classified into grains with 1, 2, 3, 4, 5, and 6 holes in each repetition. Then, with these same grains, germination and vigor tests were carried out as Brasil (2009) to detect the bioactivity itself of Hag extracts.

Statistical analysis

The data obtained in the bioassay were subjected to analysis of variance and the means were compared by Tukey test ($p \leq 0.05$) with SISVAR software (Ferreira, 2011) and for bioproduct doses, regression in the analysis of variance was performed considering the equation of largest correlation coefficient R^2 .

RESULTS AND DISCUSSION

Minimum dose and duration of the studies on the bioactivity of Hag extracts on *C. maculatus*

In the evaluation of the *in vitro* bioassay, the population level of insect pests was first obtained (Table 1) on the application of three doses (1, 2 and 3 mL) of Hag extract at 8% compared to a control with the same dosages and the Witness in six periods: sixth, tenth, twenty-third, thirtieth, fortieth and fiftieth day of monitoring, carried out in accordance with the positive evolution observed, reduction of the number of insects with increasing time of exposure to doses.

Table 1: Mean number of insects obtained in the witness (W) and the three doses of Hag extract at 8% (Bp) and control (C) in six periods of monitoring of *in vitro* bioassay.

Identification		Number of days after application					
Treat*	D (mL)	6	10	21	30	40	50
W	0	7 b	29 b	99 b	150 b	415 b	1246 b
C	1	1 a	3 a	18 a	29 a	62 a	74 a
	2	0 a	0 a	12 a	23 a	47 a	65 a
	3	1 a	4 a	18 a	34 a	64 a	76 a
Bp	1	0 a	2 a	16 a	27 a	61 a	72 a
	2	0 a	0 a	12 a	21 a	51 a	61 a
	3	0 a	1 a	12 a	26 a	58 a	67 a

¹Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey test at 5% probability.

Legend: Treat*=treatment; D= Doses; C=control; Bp=bioproduct

In relation to the population level of insects, the results (Table 1) showed that the control (C) and byproduct (Bp) did not differ significantly regardless of the dose applied. However, when compared to Witness (W) both showed bioactivity of *C. maculatus*. Thus, from the results obtained (Table 1) only the first dose tested was selected, C (d1) and Bp (d1), for demonstrations in statistical graph (Figure 1), where we observed positive effectiveness of Hag extracts from the tenth to the fiftieth day of monitoring (a) and the number of hatched and reduced individuals was obtained at fifty days, related to weight loss of seeds in percentage values compared to witness (b).

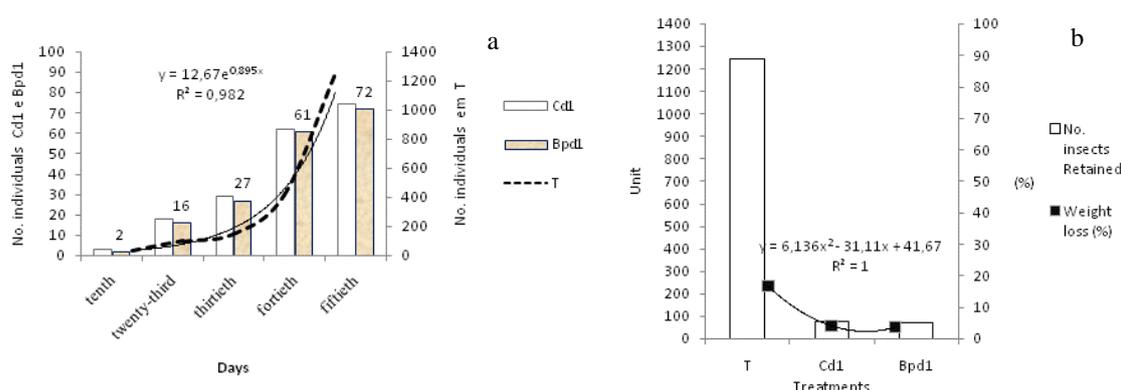


Figure 1: Effectiveness values obtained from the tenth to the fiftieth day between treatments (a) and number of hatched and reduced individuals at fifty days in Cd1 and Bpd1, compared to T and related weight loss (b).

Source: Authors (2015)

In Figure 1-a, we can observe that over time, the tested Hag extracts began to show a potent insecticidal action on *C. maculatus*. It is efficient in reducing the hatched adults when applied directly to the stored cowpea grains (Figure 1b). The Cd1 and Bpd1 extracts significantly reduced the number of insect pests, from 1246 to 73 in average (Figure 1-a), with a positive effect around 94% by the end of the evaluation period of the bioassay at 50 days (Figure 1 -b). Other researchers, when testing the effect of alcoholic extracts on *C. maculatus*, observed that the *A. indica* extract, whose active ingredient is azadirachtin, caused 100% mortality in adults when using a dose of 9 mL of extract (Almeida et al., 1999; Almeida et al., 2005; Azevedo et al., 2010). In addition, when evaluating the effects of plant alcohol extracts on this insect pest, they observed the efficiency of *Calloponium caeruleum*, a root containing rotenone (Almeida et al., 1999). The extract inhibited the insect postures performance, thus, inducing fewer eggs laid on the cowpea grains (Azevedo et al., 2010). This was observed in the assessments (Figure 1-b).

Rotenone has active chemical constituents that possibly are diffused in *C. maculatus* eggs, affecting the biochemical and physiological process of embryo formation, avoiding their viability or slowing their development (Azevedo et al., 2007). *M. dubia* has chemical constituents such as phenolic compounds, which probably act similarly. They are secondary metabolites of vegetables, usually involved in the defense against pathogens. They have function of inhibiting herbivores, since at high concentrations they become unpalatable to phytophagous (Volz and Clausen, 2001).

In this sense, we verified that the extracts of insecticide plants have emerged as research object, and have been studied as an alternative in integrated pest management (Lima Junior, 2011). Moreover, when combined with other practices, it can contribute to the reduction of doses and number of applications of synthetic chemical pesticides (Santos, 2013).

The adults insect pest of *C. maculatus* are fully mature 24 to 36 hours after emergence. Males seek females to inseminate and females store viable sperm in their spermatheca. Neither male nor female adults require food or water during their short adult lifetime (10-14 days) (Beck and Blumer, 2014).

Thus, from the analysis of results (Figure 1), in continuity with the proposed bioassay reviews, we obtained the average values of mass and perforated grains (Table 2) after 50 days of monitoring, related to damage to the seeds and emergency of *C. maculatus* adults in the Witness and three doses (1, 2, 3 mL) of Hag extract with and without the presence of bioprocessed *M. dubia* seeds, respectively, control and byproduct (C and Bp).

Damage to seeds and emergency of *C. maculatus* adults on cowpea - Health Test

Both doses showed no significant differences (Table 2). However, they interchangeably caused reduction of hatching around 33% of *C. maculatus* in the development period as shown in Figure 2, when compared to the efficiency of W (Witness) to Hag extracts for the first dose (Cd1 and Bpd1).

Table 2: Average mass values of 100 seeds and percentage of perforated grains after applying doses of Hag extracts, Cd1, Cd2, Cd3, Bpd1, Bpd2 and Bpd3 compared to the Witness (W) at 50 days of monitoring of *C. maculatus*

Variables in treatments	Witness and doses of Hag extracts (C,Bp)						
	T	Cd1	Cd2	Cd3	Bpd1	Bpd2	Bpd3
Mass 100 seeds¹ (g)	13.92 a	16.21 b	16.64 b	16.83 b	16.27 b	16.77 b	16.89 b
Variance	1.794	0.118	0.039	0.426	0.164	0.187	0.279
Standard deviation	1.340	0.343	0.198	0.653	0.405	0.433	0.528
Coefficient of variation	9.62	2.12	1.19	3.88	2.49	2.58	3.13
% Perforated grains¹	88.25 a	51.00 b	55.00 b	55.00 b	49.00 b	51.00 b	51.00 b
Variance	30.917	1.333	38.667	18.667	22.667	12.00	38.667
Standard deviation	5.560	1.155	6.218	4.320	4.761	3.464	6.218
Coefficient of variation	6.30	2.26	11.31	8.00	9.72	6.79	12.19

¹Means followed by the same letters on the line do not differ by Tukey test, at 5% probability.

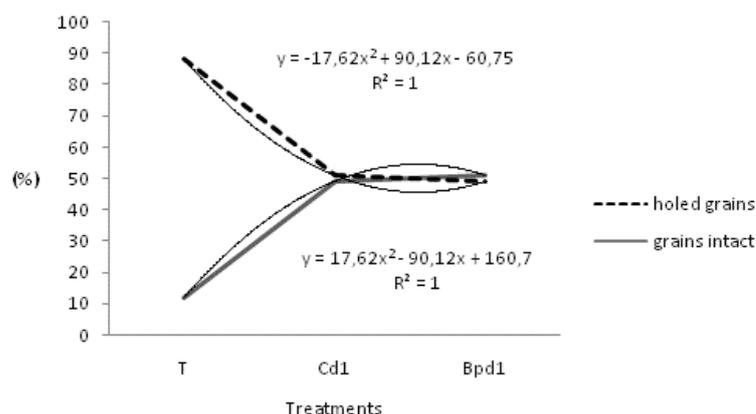


Figure 2: Comparison of efficiency percentage values obtained in the reduction of hatching (intact grains) and in the development of pest insects (holed grains) in the Witness treatment, Cd1 and Bpd1.

Source: Authors (2015)

The results obtained (Figure 2) from the health test, it was found that in the damage assessment and emergency of adult pest insects, both tested extracts (bioproducts) were effective for the biocontrol of *C. maculatus*. They caused mortality of adult insect pests and they stopped the hatchings, indicating that they also have repellent bioactive properties against adult pest insects.

Physiologic Evaluation of cowpea seeds - bioactivity of Hag extracts

The most surprising results for the evidence of bioactivity of Hag extracts prepared from bioprocessed *M. dubia* seeds were obtained in the physiological assessment through germination tests of cowpea seeds treated with Bp, but already contaminated with pest insect postures, weevil, at fifty days of monitoring (Figure 3).

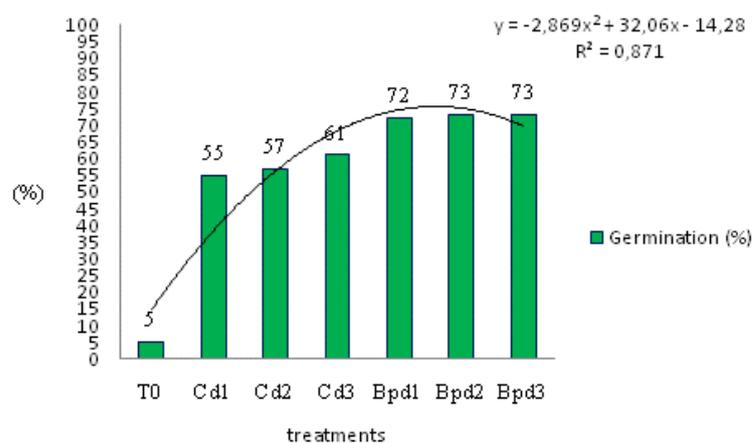


Figure 3: Percentage values obtained in the germination test with cowpea seeds in treatments established for verification and evidence of bioactivity of the extracts

Source: Authors (2015)

In Figure 3, we verify that Bp dosages were effective and there was no significant difference between them in seed germination, but there were significant differences when compared to T (5%), expected result, as well as with other dosages of control sample (55, 57, 61%). The set of methods facilitated the quick verification of the extract efficiency, insecticidal activity, and the physiological assessment was essential for the evidence of bioactivity (Figure 3). This can

be understood as the ability of the material to interact with living tissues in such a way to stimulate physicochemical processes inherent to biological systems that allow integration of the biomaterial in the receiving environment (Silva Junior and Orefice, 2001).

Germination in bioassay, according to Rice, (1984) and Hoffman et al. (1996) is the most used method to inspect the cytotoxic activity, and the total germination percentage (GP) is an index commonly used to measure the effects of cytotoxic substances (Haugland and Brandsaeter, 1996; Hoffman et al. 1996). In this study, the beneficial effect of the bioproduct tested on *C. maculatus* in cowpeas was observed.

Seed germination bioassays are usually conducted in germination camera under controlled conditions of temperature and light, lasting a variable time, usually between 7 and 10 days. In some cases, at the end of the incubation period, the germinated seeds are counted and the allelopathic effects are calculated comparatively to the W treatment (Souza Filho et al., 2010). The tested solution volume is another factor that has varied considerably in the bioassays (Leather and Einhellig, 1986). Some researchers have used for Petri dish of 9.0 cm in diameter only 3.0 mL solution (Souza Filho et al., 2010). According to them, this volume has provided satisfactory results, and deleterious effects have not been observed due to the anaerobic factor. This was observed in the bioassay performed (Figure 3) when the same dosage (Bpd3) was used.

Both bioproduct dosages – Hag extract based on bioprocessed camu camu seeds – showed similar bioactivity (Figure 3); when compared to the witness (W), it was found that they promoted the best physiological quality of cowpea seeds, considering that the sample had not been treated previously.

Thus, in general, the results obtained revealed the product potential with positive biocontrol effects shown in the health and physiological quality of cowpea seeds treated with any of the doses tested for fifty days.

CONCLUSIONS

In the *In vitro* conditions, hydro-alcohol glycol extract of *Myrciaria dubia*, causes the death of adult *C. maculatus* and standstill of hatchings in cowpea, suggesting that it has bioactive properties equally repellent against adult insects.

Conflict of interests

The author(s) did not declare any conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brazil), National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Brazil). Managers and researchers from the Brazilian Agricultural Research Corporation for its special cooperation in providing facilities for studies.

REFERENCES

Almeida MLS, Oliveira AS, Rodrigues AA, Carvalho GS, Silva LB, Lago, J. H. G., & Casarin*, F. E. (2015). Antitermitic activity of plant essential oils and their major constituents against termite *Heterotermes sulcatus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(4), 97-103.

Almeida SA, Almeida FAC, Santos NR, Medeiros SSA, Alves HS. (2006). Controle do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleóptera: Bruchidae) utilizando extratos

de Piper nigrum L. (Piperaceae) pelo método de vapor. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(4), 793-797. Retrieved January 14, 2016, from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542006000400029&lng=en&tlng=pt.

Almeida FAC, Almeida, SA, Santos, NR, Gomes, JP, Araújo M E R (2005). Efeitos de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão vigna (*Callosobruchus maculatus*). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 9(4), 585-590. Retrieved February 21, 2016, from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662005000400023&lng=en&tlng=pt.

Almeida FAC, Goldfarb AC, Gouveia JPG. (1999). Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus* spp. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.1, n.1, p.13-20.

Ardisson L, Godoy JS, Ferreira LAM, Stehmann JR, Brandão MGL.(2002).Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão).*Rev. bras. farmacogn.*[online]. Vol.12, n.1: p. 27-34 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2002000100004&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0102-695X.<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2002000100004>. E-mail: branlins@dedalus.lcc.ufmg.br

Azevedo FR, Leitão ACL, Lima MAA, Guimarães JA. (2007). Eficiência de produtos naturais no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fab.) em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) armazenado. *Rev. Ciênc. Agron.*, Vol.38, n.2, p.182-187.

Azevedo AIB, Lira AS, Cunha LC, Almeida FAC, Almeida RP. (2010).Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 14, n. 3, p. 309-313.

Boeke SJ, Baumgart, IR; Loon JJA, Huis A, Dicke M, Kossou DK. (2004). Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stored cowpea against *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Stored Products Research*, Oxford, Vol. 40, n. 4: p. 423-438.

Bogorni, PC, Vendramim, JD.(2007).Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho.**Neotrop.Entomol**, Londrina. Vol.32,n.4:p.665-669.Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2003000400018&lng=en&nrm=iso>.access on 25 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2003000400018>. Email: paulobogorni@terra.com.br

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.(2009).**Regras para análise de sementes**.Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS. 399p.

Braz-Filho R.(2010). Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente.**Quím. Nova**, São Paulo. Vol. 33, n. 1,p. 229-239 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>

Beck CW, Blumer LS. 2014. A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus* Department of Biology, Emory University christopher.beck@emory.edu and Lawrence S. Blumer Department of Biology, Morehouse College lawrence.blumer@morehouse.edu <http://www.beanbeetles.org/handbook/handbook.pdf>.

Brito JP, Oliveira JEM, Bortoli S. (2006). A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande*. Vol. 6, n. 1: p. 96-103.

Castellani MA, Brandão ALS. (2000). Amostragem de insetos (Desenvolvimento de material didático). Retrieved October 21, 2015, from <http://www.uesb.br/entomologia/amostrag.html>.

Chirinos R, Galarza J, Betalleluz-Pallardel, I, Pedreschi R, Campos D. (2010). Antioxidant compounds and antioxidant capacity of peruvian camucamu (*Myrciariadubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**. Vol. 120, n. 04: p. 1019-1024.

Correa SI, Freyre SP, Aldana MM. (2011). Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camucamu *Myrciariadubia* (H.B.K) Mc Vaugh, del INIA Loreto-Perú. **Scientia Agropecuaria**, Vol. 02, n. 04: p. 189-201.

Cuttler P, Schmutterer H. (1999). Natural pesticides from the Neem seed and other plants. *J. Ethnopharmacology* 333, 11-19.

Dequech ST B, Ribeiro LP, Sausen CD, Egewarth R, Kruse ND. (2008). Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, p. 71-80

Delgado JPM, Yuyama K 2010. Comprimento de estaca de camu-camu com ácido indolbutírico para a formação de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 522-526.

Dongre TK, Pawar SE, Thakare RG, Harwalkar MR. (1996). Identification of resistant sources to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) in *Vigna* spp. and inheritance of their resistance in black gram (*Vigna* var. mungo). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, Vol. 32: p. 201-204.

Ducrot PH. (2005). Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticidal activity of natural products from higher plants. pp. 47-58. En: Regnault, R.C., B.J.J. Philogene y C. Vincent (eds.). *Biopesticides of plant origin*. Lavoisier and Intercept, Ltd., Paris and Andover. 313 p.

Duke SO, Dayan FE, Romagni, JG, Rimando AM. (2000). Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*, Vol. 40, n. 1: p. 99-111.

Ferreira DF. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência & Agrotecnologia*, 35(5), 1039-1042.

Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Barberán FAT. (2013). Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciariadubia*). *FoodChem*. Vol. 139: p.578-588.

Gottlieb, O. R., Kaplan, M. A.; Borin, M. R. (1996). *Biodiversidade um Enfoque Químio-biológico*; Editora UERJ; Rio de Janeiro, RJ.

Haugland E, Brandsaeter L. (1996). Experiments on bioassay sensitivity in the study of allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 22: p.1845-1859.

Hoffman ML, Weston LA, Snyder JC, Regnier EE. (1996). Allelopathic influence of germinating seeds and seedlings of cover crops on weed species. *Weed Sci.*, Vol. 44, n. 3: p. 579-584.

Imatomi M, Novaes P, Miranda MAFM, Gualtieri SCJ. (2015). Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. *Acta Scientiarum. Agronomy*. Vol37(2): p. 241-248. Epub April 00, 2015. <https://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v37i2.19079>

Ketoh GK; Koumaglo HK, Glitho IA. (2005). Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Stored Products Research*, Oxford, Vol. 41, n. 4: p. 363-371.

Lale NES, Abdulrahman HT. (1999). Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed oil obtained by different methods and neem powder for the management of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*, Oxford, Vol. 35, n. 2: p. 135-143.

Leather GR, Einhellig FA. (1986). Bioassays in the study of allelopathy. In: PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. (Eds.). **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons. p. 133-143.

Lima JME, Fagundes GS, Smiderle OJ. (2014). Qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi tratadas com terra diatomácea e infestadas por carunchos. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, Vol.7, n.3: p. 733-746 - ISSN 1981-9951. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/113839/1/3029-14561-1-PB.pdf>

Lima-Junior AF. Efeito de diferentes extratos vegetais no controle de *Anthrenus obtectus* e *Sitophilus* sp. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – UEG. Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.

Maciel, LGP, Garcia, M PD, Rodriguez, A A, Silva, IO. (2009). Anatomia da semente do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) e sua caracterização morfológica do fruto. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBPC EM TABATINGA, Tabatinga, Amazonas. Available from: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/tabatinga/resumos/585.htm>>. Cited in: 10 April. 2015.

Mapric 2001. Extrato glicólico de aroeira. Boletim 581_23082007_182420.pdf. Disponível em www.mapric.com.br/anexos/boletim581_23082007_182420.pdf. Cited in: 21 julho, 2015.

Mendoza AR, Kiewnick S, Sikora RA. (2008). In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Biocontrol Science and Technology**. Volume 18, Issue 4. p 377-389. DOI:10.1080/09583150801952143

- Molina AJP, LÓPEZ NJC. (2001). Producción *in vivo* de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. revista Colombiana de Entomología, 27 (1/2): 73-78
- Montanari CA, Bolzani VS.(2001). Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, São Paulo ,Vol. 24, n. 1:p. 105-111, Feb. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000100018&lng=en&nrm=iso>. access on 26 Feb. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000100018>.
- Nobre DAC, Silva Neta IC, David AMSS, Gonçalves NP, Amaro HTR. (2014). Bioatividade de extratos aquosos de plantas medicinais em sementes de feijão-fava. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu ,Vol. 16, n. 2:p. 467-472. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500020&lng=en&nrm=iso>.access on 02 Feb. 2016. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_021.
- Oliveros-Bastidas AJ. (2008). El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y sua plicación en la búsqueda de herbicidas naturales. Química Viva, Vol. 7, n. 1: p. 1-34.
- Pascual-Villalobos MJ, Ballesta-ACosta MC. (2003). Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. Biochemical Systematics and Ecology, Oxford, Vol. 31, n. 7: p. 673-679.
- Pereira ACRL, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG. (2008). Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. Ciênc. agrotec., Lavras, Vol. 32, n. 3: p. 717-724.
- Pletsch M. (1998) Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, n.4, p.12-15. 1998.
- Rice EL. (1984). **Allelopathy**. New York: Academic Press. 422 p.
- Santos PL , Prando MB, Morando R, Pereira GVN, Kronka AZ. (2013). Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p.
- Silva Junior PE, Orefice, RL. (2001). Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli(Metacrilato de Metila). **Polímeros**, São Carlos , Vol. 11, n. 3: p. 109-115. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282001000300009&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282001000300009>.
- Sousa AH, Maracajá, PB, Silva RMA, Moura AMN, Andrade WG. (2005). Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande, Vol. 5, n. 2.

Souza Filho APS, Guilhon, GMSP, Santos, LS.(2010). Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. *Planta daninha* [online], Vol.28, n.3: p. 689-697. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582010000300026&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-8358. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582010000300026>.

Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Cruz MES. (2003). Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 54-56. Suplemento.

Tanzubil PB. (1991). Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica*) in Northern Ghana. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, Vol. 37: p. 216–217.

Volz TJ, Clausen TPJ. *Chem Ecol* (2001) 27: 725. doi:10.1023/A:1010349918664

Wald A. (1947). *Sequential analysis*. J. Wiley & Sons, Inc. N. York, 212p.

Yuyama KA (2011) cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33,n. 2, p. 335-690.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas, métodos e aplicações laboratoriais alternativas, eletroanalítica, infravermelho e SAS, utilizadas nesse estudo mostram que é possível a caracterização de sementes de frutos *in natura* e bioprocessadas na Amazônia setentrional, bem como a identificação de fontes de compostos com potencial para biotecnologia verde (agroalimentar). São processos de apoio e estratégias específicas e acessíveis que facilitam o desenvolvimento de protótipos de bioprodutos/bioprocessos e promovem a Utilização Prática da Biotecnologia por meio de parcerias tipo spin-off como ferramenta de apoio para transformação dos conhecimentos científicos e tecnológicos obtidos em produtos a serem utilizados pelo mercado/indústria local, na Amazônia.

A partir dos resultados satisfatórios obtidos nesse estudo, onde se verificou que as sementes do caçari apresentam potencial agroalimentar, foi estabelecida uma parceria tipo *spin-off*, no mês de dezembro de 2015, um acordo de cooperação técnica entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa e a cervejaria Boa Vista, para valorização e elaboração de produtos a base de caçari e ainda fornecimento de apoio técnico-científico para desenvolvimento de bebidas a partir da incorporação de produtos da Amazônia.

Para elaboração das bebidas serão utilizados produtos (em forma de pós e concentrados) oriundos do processamento de sementes e casca de caçari coletados para execução de trabalhos de pesquisas desenvolvidos na Embrapa Roraima. As referidas empresas fornecem como contrapartida, a disponibilização de laboratórios especializados, área de produção, auxílio técnico, além de materiais e equipamentos discriminados no plano de aplicação. Uma sequência de testes será realizada para obtenção de formulações, contendo diferentes concentrações dos constituintes dos frutos selecionados. Com isso, espera-se promover a inovação tecnológica para o desenvolvimento do produto final.

Houve grande avanço no conhecimento técnico-científico relativo as sementes de frutos nativos do caçari. Obtiveram-se amostras bastante representativas, provenientes de diversas localidades da Amazônia setentrional e de plantios em área experimental de pesquisa em terra firme, o qual não foi encontrado no período de desenvolvimento do presente estudo, informações sobre as características morfoanatômica, os bioelementos, grupos funcionais, pigmentos e, bioativos presentes.

Outros estudos podem ser desenvolvidos e estes aperfeiçoados, principalmente, se a finalidade dos pós e concentrados obtidos no processamento das sementes do caçari forem à utilização para fins biotecnológicos diversos. Nesse ponto, confirmou-se nesse estudo que a realização da amostragem representativa dos materiais vegetais é de fundamental importância.

ANEXOS

Análise Granulométrica

Amostras de droga vegetal

25 - 100 g (pó grosso a semi-fino)
< 25 g (pó fino a muito fino)

Passagem por vibração através de tamises tarados

Abertura de malha nominal:
0,800; 0,635; 0,315; 0,200; 0,071 e 0,063mm

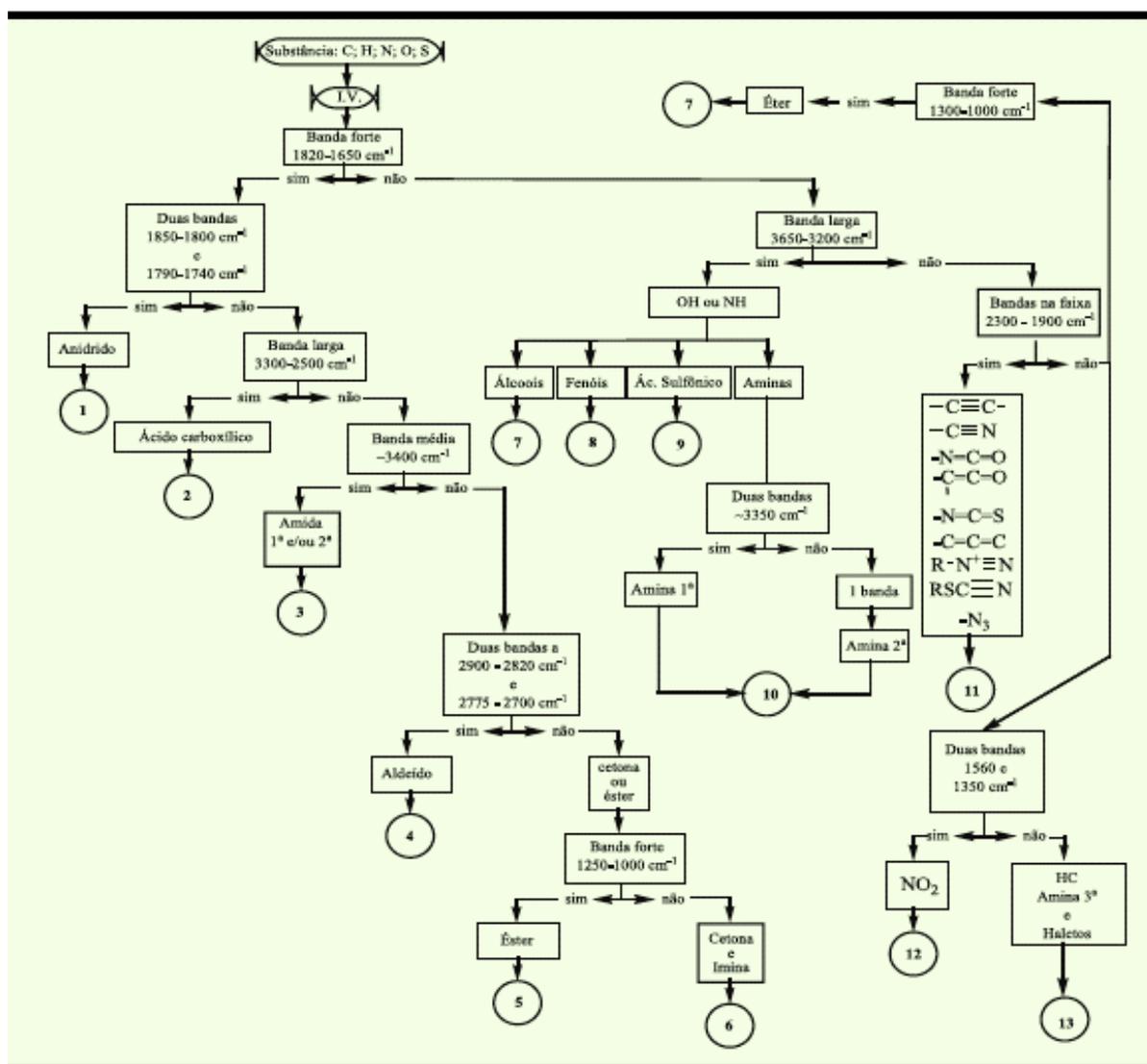
Condições operacionais:
60 vibrações/minutos durante 15 minutos

Pesar
Massa das frações retidas nos tamises e no coletor



Anexo - 1 - Técnica para avaliação granulométrica

Fonte: https://farmacia200902.files.wordpress.com/2011/.../aula_1_materia_prima_vegetal



Anexo 2 – Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas no Infravermelho (Espectrofotômetro na região 4000-400 cm^{-1})

Fonte: Ribeiro e Souza (2007).