

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DOUTORADO EM QUÍMICA**

**Caracterização Molecular de óleos fixos de alguns  
frutos da região Amazônica**

**Patricia de Souza Pinto Hidalgo**

Manaus - Amazonas  
Dezembro - 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DOUTORADO EM QUÍMICA**

**Patricia de Souza Pinto Hidalgo**

**Caracterização molecular de óleos fixos de alguns  
frutos da região Amazônica**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração em Química Orgânica.

**Orientador: Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Saraiva Nunomura**

Manaus - Amazonas  
Dezembro – 2012

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Hidalgo, Patricia de Souza Pinto

*H632c* Caracterização molecular de óleos fixos de alguns frutos da Amazônia / Patricia de Souza Pinto Hidalgo. - Manaus: UFAM, 2012.

113 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

1. Óleos vegetais 2. Frutos amazônicos – Composição química 3. Plantas oleaginosas I. Nunomura, Sergio Massayoshi (Orient.) II. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 633.85(811.3)(043.2)

## Resumo

Os óleos vegetais têm sido uma das principais potencialidades econômicas apontadas pela Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA). No entanto, pouco se conhece à respeito da composição química de muitos dos óleos amazônicos. A composição química dos frutos de quatro espécies frutíferas amazônicas (*Oenocarpus bataua* (patauá), *Oenocarpus bacaba* (bacaba), *Endopleura uchi* (uxi-amarelo) e *Leopoldinia piassaba* (piaçava)) foi estudada. Para o fruto de piaçava é o primeiro relato da composição de ácidos graxos, tocoferóis e esteroides. A composição de ácidos graxos destes óleos foi determinada por cromatografia gasosa de alta resolução e foram obtidos resultados semelhantes aos da literatura para as amostras de patauá, bacaba, e uxi-amarelo. Os tocoferóis foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência e o óleo de uxi-amarelo foi aquele que apresentou o maior percentual de tocoferóis totais, enquanto que o óleo de patauá possui o maior teor de  $\alpha$ -tocoferol. Os esteroides foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e quantificados por cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama, indicando a bacaba e piaçava com maior teor de  $\beta$ -sitosterol. Quanto à atividade biológica, a atividade antioxidante foi maior para os extratos metanólicos das polpas de patauá e bacaba, de onde foi isolada uma substância antioxidante de patauá identificada como piceatanol. Os extratos metanólicos de bacaba e patauá apresentaram capacidade de inibição da enzima lipoxigenase, e baixa inibição da enzima acetilcolinesterase para bacaba e boa inibição para patauá. Amostras de extratos de piaçava e bacaba se mostraram ativas contra larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. O conhecimento da química e atividade biológica destes frutos possibilitará um melhor aproveitamento destes frutos pela indústria nutracêutica e de alimentos.

Palavras-chave: tocoferóis, esteroides, ácidos graxos, *Leopoldinia piassaba*, *Oenocarpus bacaba*, *Oenocarpus bataua*, *Endopleura uchi*.

## Abstract

The economic exploitation of vegetable oil is considered by SUFRAMA (Superintendência da zona franca de Manaus) one of the best possibilities in the region. However there are a few studies related to the chemical composition of Amazon fruits and their oil. We have studied the chemical composition of four Amazon fruits, namely pataua (*Oenocarpus bataua*), bacaba (*Oenocarpus bacaba*), uxi-amarelo (*Endopleura uchi*) and piassava (*Leopoldinia piassaba*). It is the first report describing the fatty acid, tocopherol and phytosterol composition of piassava fruits. The fatty acid composition was determined by methyl ester conversion and high resolution gas-liquid chromatography and we achieved similar results as the published for pataua, bacaba and uxi-amarelo. Tocopherol composition and quantification was determined by high performance liquid chromatography. Uxi-amarelo had the higher contents of total tocopherols, while pataua the higher amounts of  $\alpha$ -tocopherol. The phytosterols were determined by high resolution gas-liquid chromatography with flame-ionization and mass spectrometry detectors. Bacaba and piassava had the higher contents of  $\beta$ -sitosterol. Some biological activities were also determined for the available extracts. The antioxidant activity of methanolic extracts of pataua and bacaba were higher and an antioxidant compound, piceatanol, was also isolated. These extracts also showed the highest capacity to inhibit the enzyme lipoxidase. In the acetylcholinesterase inhibition assay, bacaba had lower capacity, but pataua showed good capacity. The extracts of piassava and bacaba showed also good larvicidal activity in the assays with *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. The chemical and biological results obtained by this study will help the use and development of new products from the extracts of these fruits.

Dedico este trabalho a Deus, ao meu esposo Daniel Hidalgo, e aos meus pais Darci Nizaldo e Raimunda Carvalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde, força e inspirações diárias recebidas.

Ao meu esposo Daniel por seu grande apoio e compreensão.

Aos meus pais Darci e Raimunda que me deram vida e apoio e aos meus irmãos Rogério e Junior pelos momentos compartilhados.

Ao meu orientador Dr. Sergio Massayoshi Nunomura pela orientação, amizade e por confiar em meu trabalho.

À Dra. Rita Saraiva Nunomura pela co-orientação.

Ao Dr. Noberto Peporine Lopes pelo Espectro de massas.

Ao Dr. Emerson Silva Lima pelos testes de inibição enzimática realizados em seu laboratório.

À Dra. Ana Cristina da Silva Pinto pelos testes de atividade biológica com *Aedes aegypti* e *culex*.

Ao CBA pela obtenção dos espectros de RMN.

Aos companheiros de trabalho do LAPAAM: Suniá, Marycleuma, Ellen, Andreza, Banny, Magno, Henrique, Rita Cynara, Kethelin, Paulo, Bruno, Berna, e Suelen pela amizade e companheirismo.

A todos os professores da pós- graduação pelos ensinamentos e amizade.

À Universidade Federal do Amazonas, à CAPES, à FAPEAM pelo apoio financeiro e bolsa concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas da Amazônia -INPA-, pelo apoio técnico para a realização da pesquisa.

Mas os que esperam  
no Senhor renovam as suas  
forças, sobem com asas  
como águias, correm e não  
se cansam, caminham e não  
se fatigam. Is 40:31



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1	Alimentação x saúde.....	2
1.1	Lipídios.....	3
1.2	Tocoferóis.....	5
1.3	Esteróides.....	8
1.4	Oleaginosas amazônicas.....	10
1.4.1	<i>Oenocarpus bacaba</i> Mart.....	13
1.4.1.1	Usos de bacaba.....	14
1.4.2	<i>Oenocarpus bataua</i> Mart.....	14
1.4.2.1	Usos de patauá.....	15
1.4.3	<i>Leopoldinia piassaba</i> A. Wallace.....	16
1.4.3.1	Usos de piaçaba.....	17
1.4.4	<i>Endopleura uchi</i> Huber.....	17
1.4.4.1	Usos de uchi.....	18
1.5	Componentes químicos dos frutos.....	18
1.5.1	<i>Oenocarpus bataua</i> .....	19
1.5.2	<i>Endopleura uchi</i> .....	21
1.5.3	<i>Oenocarpus bacaba</i> .....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	24
<b>2.1</b>	Geral.....	24
<b>2.2</b>	Específico.....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1	Cromatografia.....	25
3.2	Espectroscopia.....	26
3.2.1	RMN.....	26
3.2.2	CG/EM.....	27
3.3	Equipamentos e acessórios de laboratório.....	27
3.4	Reagentes e solventes.....	27
3.5	Levantamento bibliográfico.....	28
3.6	Coleta dos frutos e triagem do material vegetal.....	28
3.6.1	Coleta de patauá.....	28
3.6.2	Coleta de piaçaba.....	29
3.6.3	Coleta de bacaba.....	29
3.6.4	Aquisição de uchi.....	29
3.7	Estudo ponderal dos frutos e calculo de teor	29

	percentual de água.....	30
3.8	Preparação de extratos orgânicos.....	30
3.8.1	Extração do óleo a frio.....	30
3.8.2	Extração em soxhlet.....	31
3.9	Análise de ácidos graxos através de Cromatografia gasosa de alta resolução CGAR-DIC.....	32
3.10	Obtenção de material insaponificável.....	34
3.11	Identificação e quantificação de tocoferóis.....	35
3.11.1	Identificação de tocoferóis.....	35
3.11.2	Quantificação de tocoferóis.....	36
3.12	Análise de fitoesteróides.....	37
3.12.1	Instrumentos cromatográficos.....	37
3.12.2	Método de análise e quantificação.....	37
3.13	Isolamento de substância antioxidante PPP1.....	38
3.14	Ensaio biológicos.....	40
3.14.1	Análise com reveladores químicos em CCD.....	40
3.14.2	Análise de fenólicos totais.....	40
3.14.3	Teste da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical DPPH.....	41
3.14.4	Teste da atividade antioxidante pela capacidade redutora do Fe <sup>3+</sup> - (FRAP).....	44
3.14.5	Teste de atividade larvicida.....	46
3.14.5.1	Teste de letalidade para as larvas de <i>Aedes aegypti</i> ...	46
3.14.5.2	Teste de letalidade para as larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	47
3.14.6	Teste de inibição enzimática.....	47
3.14.6.1	Teste de inibição da enzima lipoxigenase.....	47
3.14.6.2	Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.1	Estudo ponderal dos frutos.....	50
4.2	Teor percentual de água.....	51
4.3	Preparação de extratos.....	52
4.3.1	Extrações em soxhlet.....	53
4.4	Análise da composição de ácidos graxos.....	54
4.4.1	Cadeia graxa de patauá.....	55
4.4.2	Cadeia graxa de bacaba.....	57
4.4.3	Cadeia graxa de uxi.....	59
4.4.4	Cadeia graxa de piaçaba.....	60
4.5	Composição de esteroides nos óleos das polpas.....	62
4.5.1	Identificação de fitoesteróides.....	63
4.5.2	Quantificação de fitoesteróides.....	70
4.6	Identificação e Quantificação de tocoferóis.....	73
4.6.1	Identificação de tocoferóis.....	73
4.6.2	Quantificação de tocoferóis.....	78
4.7	Caracterização espectroscópica e identificação de PPP1.....	82
4.7.1	Identificação de PPP1.....	82
4.7.2	Análise do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de PPP1.....	82
4.7.3	Análise do espectro de RMN de <sup>13</sup> C de PPP1.....	84

4.7.4	Análise do espectro de massas de PPP1.....	86
4.8	Atividade biológica.....	87
4.8.1	Atividade antioxidante.....	87
4.8.1.1	Estudo da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH.....	87
4.8.1.2	Teor de fenólicos totais.....	89
4.8.1.3	Estudo da capacidade de redução de ferro (FRAP)....	91
4.8.2	Atividade Larvicida.....	93
4.8.2.1	Atividade larvicida para <i>Aedes aegypti</i> .....	93
4.8.2.2	Atividade larvicida para <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	96
4.8.3	Atividade de inibição enzimática.....	98
4.8.3.1	Atividade de inibição de lipoxigenase.....	98
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>101</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Estrutura química de $\alpha$ , $\beta$ -, $\gamma$ - e $\delta$ - tocoferol.....	6
<b>Figura 02</b> - Estrutura carbônica básica de um esteroide.....	8
<b>Figura 03</b> – Estrutura do colesterol e fitoesteróides representativos.....	9
<b>Figura 04</b> – Frutos de <i>Oenocarpus bacaba</i> .....	14
<b>Figura 05</b> – Frutos de <i>Oenocarpus bataua</i> .....	15
<b>Figura 06</b> – Frutos de <i>Leopoldinia piassaba</i> .....	17
<b>Figura 07</b> – Frutos de <i>Endopleura uchi</i> .....	18
<b>Figura 08</b> – Estrutura de bergenina.....	22
<b>Figura 09</b> – Reação de saponificação em presença de nitrogênio em condições brandas.....	35
<b>Figura 10</b> – Substância isolada PPP1 ( $R_f=0,39$ em $CHCl_3$ : MeOH (8:2) em fase normal).....	39
<b>Figura 11</b> – Estruturas das formas radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e sua forma reduzida.....	42
<b>Figura 12</b> – Estrutura do TPTZ (2,4,6 – tri-(2-piridil)-1,3,5 – triazina) com Fe II e Fe III.....	43
<b>Figura 13</b> - Cromatograma obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de patauá.....	57
<b>Figura 14</b> - Cromatograma obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de bacaba.....	58
<b>Figura 15</b> - Cromatograma obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de uxi.....	60
<b>Figura 16</b> - Cromatograma obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de piaçava.....	61
<b>Figura 17</b> - Placa de CCD com frações obtidas na purificação via SEP-PAK antes da derivatização e padrão de esteroide.....	63
<b>Figura 18</b> - Espectro de massas de campsterol.....	64
<b>Figura 19</b> - Espectro de massas de estigmasterol.....	65
<b>Figura 20</b> – Espectro de massas de $\beta$ -sitosterol.....	66
<b>Figura 21</b> - Espectro de massas de d5-avenasterol.....	67
<b>Figura 22</b> - Espectro de massas de cicloartenol.....	68
<b>Figura 23</b> - Espectro de massas de 24 – metileno – cicloartenol.....	69
<b>Figura 24</b> - Espectro de massas de eufadienol.....	70
<b>Figura 25</b> - Coluna de calibração do padrão interno, o colesterol.....	71
<b>Figura 26</b> - Cromatograma de material insaponificável de patauá e material insaponificável de patauá + padrões. Método: Coluna Superspher Si-60 (5 $\mu$ M, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de	

diâmetro interno), fase móvel: (hexano com 0,1% HOAc e I-PrOH (99,5:0,5)) fluxo: 2mL/min., 45 min. Detector UV – VIS- DAD (220 e 295nm).....	75
<b>Figura 27</b> - Cromatograma de material insaponificável de uchi e material insaponificável de uchi + padrões. Método: Coluna Superspher Si-60 (5uM, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno), fase móvel: (hexano com 0,1% HOAc e I-PrOH (99,5:0,5)) fluxo: 2mL/min., 45 min. Detector UV – VIS- DAD (220 e 295nm).....	76
<b>Figura 28</b> - Cromatograma de material insaponificável de piaçava e material insaponificável de piaçava + padrões. Método: Coluna Superspher Si-60 (5uM, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno), fase móvel: (hexano com 0,1% HOAc e I-PrOH (99,5:0,5)) fluxo: 2mL/min., 45 min. Detector UV – VIS- DAD (220 e 295nm).....	77
<b>Figura 29</b> - Cromatograma de material insaponificável de bacaba e material insaponificável de bacaba + padrões. Método: Coluna Superspher Si-60 (5uM, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno), fase móvel: (hexano com 0,1% HOAc e I-PrOH (99,5:0,5)) fluxo: 2mL/min., 45 min. Detector UV – VIS- DAD (220 e 295nm).....	78
<b>Figura 30</b> - Curva de calibração de $\alpha$ – tocoferol.....	79
<b>Figura 31</b> - Curva de calibração de $\beta$ – tocoferol.....	79
<b>Figura 32</b> - Curva de calibração de $\gamma$ – tocoferol.....	79
<b>Figura 33</b> - Curva de calibração de $\Delta$ - tocoferol.....	80
<b>Figura 34</b> - Comparação do teor de tocoferóis entre os frutos.....	81
<b>Figura 35</b> - Estrutura do piceatanol.....	82
<b>Figura 36</b> – Expansão da região aromática do espectro de RMN $^1\text{H}$ do piceatanol.....	84
<b>Figura 37</b> - Curva de calibração da quercetina.....	87
<b>Figura 38</b> - Curva de calibração de Ácido gálico.....	89
<b>Figura 39</b> - Curva de calibração de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	91
<b>Figura 40</b> - Percentual de inibição de lipoxigenase.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Ácidos graxos mais comuns de ocorrência natural.....	04
<b>Tabela 02</b> - Estudo ponderal dos frutos.....	50
<b>Tabela 03</b> - Teor percentual de água.....	52
<b>Tabela 04</b> - Teor percentual de óleo extraído de material fresco e seco.....	52
<b>Tabela 05</b> - Teor de extrativos das extrações e partições.....	53
<b>Tabela 06</b> - Teores de extração em soxhlet.....	54
<b>Tabela 07</b> - Tempos de retenção dos padrões de FAME e analisados por CG-FID.....	55
<b>Tabela 08</b> - Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados.....	56
<b>Tabela 09</b> - Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados.....	57
<b>Tabela 10</b> - Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados.....	59
<b>Tabela 11</b> - Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados.....	60
<b>Tabela 12</b> - Resultado comparativo da composição da cadeia graxa dos frutos.....	62
<b>Tabela 13</b> - Composição % de esteroides nos óleos dos frutos.....	71
<b>Tabela 14</b> - Composição de esteroides nos óleos dos frutos (mg/Kg óleo).....	72
<b>Tabela 15</b> - Comparação dos tempos de retenção médios obtidos para padrões de tocoferol nas amostras.....	74
<b>Tabela 16</b> - Conteúdo de tocoferóis no óleo (mg/g óleo).....	80
<b>Tabela 17</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para PPP1 e dados da literatura para piceatanol.....	83
<b>Tabela 18</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C e DEPT obtidos para PPP1 comparados aos dados de piceatanol na literatura.....	85
<b>Tabela 19</b> - Correlações no espectro de COSY de PPP1 .....	85
<b>Tabela 20</b> - Correlações no HSQC e HMBC de PPP1.....	86
<b>Tabela 21</b> - Resultado da capacidade de sequestro do radical livre DPPH dos extratos metanólicos de polpas e sementes dos frutos.....	88
<b>Tabela 22</b> - Resultados do teor de fenólicos totais para extratos metanólicos dos frutos.....	90
<b>Tabela 23</b> - Resultados da capacidade de redução do Fe (III) dos extratos metanólico dos frutos.....	92
<b>Tabela 24</b> - Correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante.....	93
<b>Tabela 25</b> - Letalidade das larvas 24h após exposição aos extratos/frações dos frutos.....	94

<b>Tabela 26</b> - Letalidade das larvas 48h após exposição aos extratos/frações dos frutos.....	95
<b>Tabela 27</b> - Letalidade das larvas 24h após exposição aos extratos/frações dos frutos.....	96
<b>Tabela 28</b> - Letalidade das larvas 48h após exposição aos extratos/frações dos frutos.....	97

## INTRODUÇÃO

A exploração de óleos amazônicos é uma das principais atividades econômicas apontadas pela Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA). No entanto, a química destes óleos ainda é pouco conhecida. Um maior conhecimento em nível molecular destes óleos possibilitará uma melhor utilização como matéria-prima na produção de diversos produtos industriais na área de alimentos, nutracêutica, cosmética e farmacêutica. Neste trabalho foi identificada e quantificada a composição de ácidos graxos, tocoferóis, e fitosteroides do óleo vegetal de quatro espécies amazônicas: *Endopleura uchi* (uxi-amarelo), *Oenocarpus bacaba* (bacaba), *Oenocarpus bataua* (pataua) e *Leopoldinia piassaba* (piaçava). Esse é o primeiro estudo da composição química dos frutos da *L. piassaba*. Determinou-se também algumas atividades biológicas destes frutos para um melhor aproveitamento nas indústrias nutracêutica e de alimentos. Para isso mediu-se a atividade antioxidante dos extratos metanólicos, e também se mediu a atividade frente à enzima lipooxigenase e a enzima acetilcolinesterase. Foi verificada a atividade larvicida dos extratos e frações geradas do particionamento destes extratos contra as larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Do extrato metanólico de patauá foi isolado um composto antioxidante identificado como piceatanol.



## 1. ALIMENTAÇÃO X SAÚDE

Atualmente o meio científico cada vez mais se conscientiza da relação existente entre dieta alimentar e saúde, o que leva ao estudo contínuo de alimentos que, além de nutritivos para o organismo, também previnam ou inibam o aparecimento de certas doenças. (Wildman, 2001).

Frutas e hortaliças são recomendadas na alimentação humana, devido sua riqueza nutricional, além da presença de substâncias que exercem ação antioxidante (onde também estão incluídas as vitaminas), as quais exercem ação protetora contra a evolução de processos degenerativos que conduzem às doenças e ao envelhecimento precoce. Dentre os principais fitoquímicos considerados em exercer propriedades antioxidantes, estão incluídos a vitamina C, vitamina E beta-caroteno (que é um precursor da vitamina A), os quais estão presentes em diversas frutas. Os antioxidantes adquiridos através da dieta, como a vitamina C e a vitamina E, são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres oriundos de processos oxidativos. (Barcia, *et al.*, 2010; Kitts, 1997).

Os ácidos graxos e seus derivados têm despertado o interesse pelo seu potencial nutracêutico. Estudos revelam que nas regiões em que há um maior consumo de óleo de oliva, há uma menor incidência de câncer de mama, devido à associação do óleo de oliva com a atividade protetora do ácido oléico presente neste óleo, pode-se citar ainda atividades cardioprotetoras e antioxidantes. Os óleos vegetais são apontados como uma importante fonte de lipídios benéficos à saúde (Wildman, 2001).

## 1.1 LIPÍDIOS

São compostos de origem biológica que dissolvem em solventes apolares. O nome lipídio vem da palavra grega, *lipos*, que significa gordura. E incluem uma variedade de tipos estruturais, dentre eles, os ácidos graxos e triacilgliceróis, os terpenos, os esteroides, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, fosfolipídeos e esfingolipídeos. (Solomons, 2006).

São formados principalmente pelos triacilglicerídeos. A maioria dos ácidos carboxílicos, de origem biológica é encontrada na forma desses ésteres de glicerol. Os triacilgliceróis que são líquidos a temperatura ambiente são chamados de óleos, aqueles que são sólidos são chamados de gorduras. (Solomons, 2006; Moreto, 1989).

Nos óleos vegetais a fração majoritária de triacilglicerídeos é chamada de fração saponificável e a não-glicerídea, com menos de 5%, é chamada de não saponificável e compreendem os fosfatídeos, tocoferóis, carotenóides, esteroides e antocianinas que conferem cor ou são responsáveis por outras características organolépticas dos óleos como odor, etc. (Moreto, 1989, Penteadó, 2003).

Óleos vegetais são fontes de ácidos graxos insaturados tal como ácido oleico e linoléico (Ali, 2010) que compreendem as séries  $\omega$ -9 e  $\omega$ -6 que juntamente com a série  $\omega$ -3, são ditos essenciais e precisam ser adquiridos na dieta. (Devlin, 2003). Naturalmente os ácidos graxos insaturados são encontrados na forma cis, e os ácidos graxos em geral possuem números pares de carbono. (Dewick, 2001) Ver Tabela 01 com os ácidos graxos mais comuns.

Tabela 01 – Ácidos graxos mais comuns de ocorrência natural

<b>Saturados</b>		
butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	4:0
caproico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{H}$	6:0
caprílico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$	8:0
capríco	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{H}$	10:0
laurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$	12:0
mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$	14:0
palmitico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$	16:0
estéarico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$	18:0
araquídico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$	20:0
behenico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}_2\text{H}$	22:0
lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}_2\text{H}$	24:0
cerótico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{CO}_2\text{H}$	26:0
montânico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{26}\text{CO}_2\text{H}$	28:0
melissico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}\text{CO}_2\text{H}$	30:0
<b>Insaturados</b>		
palmitoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	16:1 -9
oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	18:1 -9
cis-vaccênico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{CO}_2\text{H}$	18:1 – 11
linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	18:2 -9,12
$\alpha$ -linolenico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	18:3 – 9,12,15
$\gamma$ -linolenico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{H}$	18:3 – 6,9,12
gadoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	20:1 – 9
araquidônico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$	20:4 – 5,8,11,14

Tocoferóis e fitoesteróides são importantes componentes na fração insaponificável de óleos vegetais. Seus benefícios na saúde tem aumentado o interesse, ao longo dos anos, de quantificá-los em diferentes alimentos. A proporção de tocoferóis varia com a natureza do óleo e também com outros fatores tal como clima, e cultivo do vegetal. A quantidade de fitoesteróides também pode ser diferente dependendo do tipo de óleo analisado. (Costa *et al.*, 2010).

## 1.2 TOCOFERÓIS

Óleos vegetais são a principal fonte alimentar de vitamina E, que diminui o risco de câncer e doenças cardiovasculares. A vitamina E é composta de oito compostos lipossolúveis naturais:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - tocoferóis e seus correspondentes tocotrienóis, que são antioxidantes naturais que evitam a autooxidação do óleo. A atividade antioxidante da vitamina E é a sua função mais divulgada. O  $\alpha$ -tocoferol é o mais ativo componente da vitamina E em vivo e o menos suscetível a degradação. As formas  $\gamma$ - e  $\delta$ - da vitamina são eficientemente absorvidas pelo sangue humano (Gimeno, *et al.*, 2000; Rodrigues, *et al.*, 2010, Penteado, 2003).

Os tocoferóis são derivados do tocol, enquanto os tocotrienóis são derivados do tocotrienol. (Penteado, 2003).

Tanto os tocoferóis quanto os tocotrienóis possuem um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral. Esta cadeia é de natureza isoprênica, constituída por 16 átomos de carbono, sendo responsável pela lipossolubilidade da vitamina E. Enquanto os tocoferóis apresentam esta cadeia totalmente saturada, os

tocotrienóis têm duplas ligações nas posições 3', 7' e 11'. Os diferentes isômeros destes compostos ( $\alpha$ ,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -) diferem entre si pelo número e pela posição de grupos metil no anel cromanol. (Figura. 01)

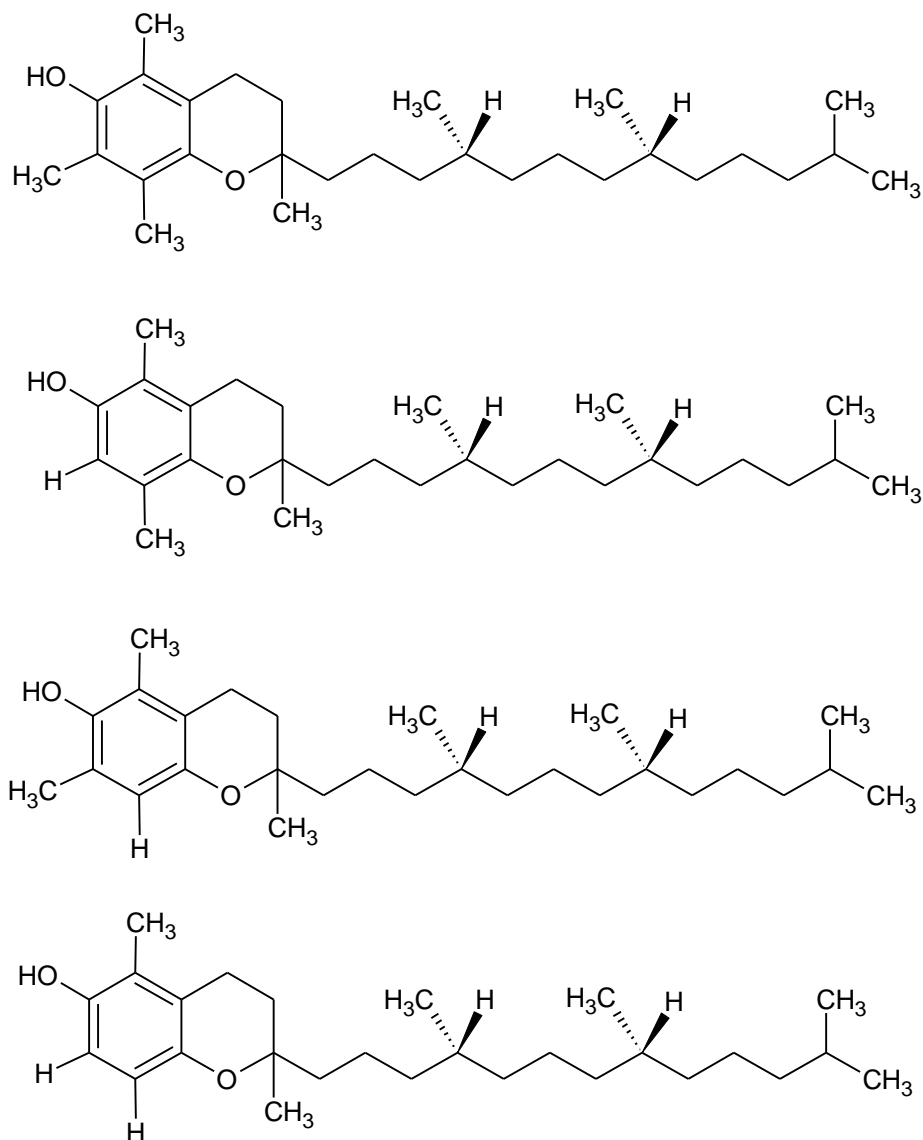


Figura 01. Estruturas químicas de  $\alpha$ ,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - tocoferol respectivamente

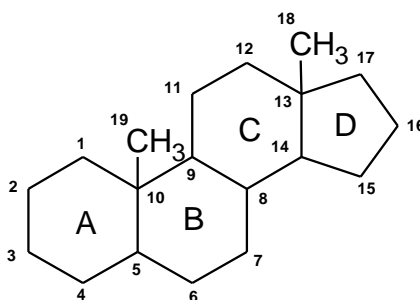
Tocoferóis ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal, como nas frutas, vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no gérmen de trigo. Diferentes concentrações de tocoferol em óleos têm sido relatadas e tem diversas funções para a estabilidade oxidativa dos óleos. Tocoferóis tem se mostrado ativos contra doenças cardiovasculares, câncer, inflamações, retardamento do envelhecimento e proteção a doenças crônicas não transmissíveis, como de Parkinson e Alzheimer. Devido a sua contribuição para a estabilidade oxidativa e benefícios para a saúde, a determinação de tocoferóis em óleos vegetais é importante. (Hu, *et al.*, 2009, Barcia, *et al.*, 2010)

Os óleos vegetais comestíveis apresentam grande consumo em nível mundial, constituindo-se, portanto, nos alimentos de maior contribuição para a ingestão de vitamina E para a população. Dentre os óleos vegetais o principal contribuinte é o óleo de soja, devido ao grande consumo em nível mundial. (Guinazi, *et al.*, 2009).

O conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais depende da forma de obtenção desse óleo. Assim, óleos refinados contêm um teor vitamínico reduzido em até 80%, de acordo com as condições empregadas. Além disso, perdas podem acontecer devido as formas de estocagem, pela exposição à luz, oxigênio, altas temperaturas, entre outros fatores. (Guinazi, *et al.*, 2009).

### 1.3 ESTERÓIDES

Os esteroides são um grupo de substâncias de ocorrência natural derivados do sistema de isopentanóides policíclicos hidroxilados com uma estrutura 1,2-ciclopentanofenantreno ou peridro-ciclopentanofenantreno (Abdi, 2001). Os átomos de carbono são numerados como mostrado na Figura 02. Os quatro anéis são designados como letras: A, B, C e D (Solomons, 2006). Esses compostos contém um total de 27-30 átomos de carbono e uma cadeia lateral em C17 com cerca de 7 ou mais carbonos. (Abdi, 2001).



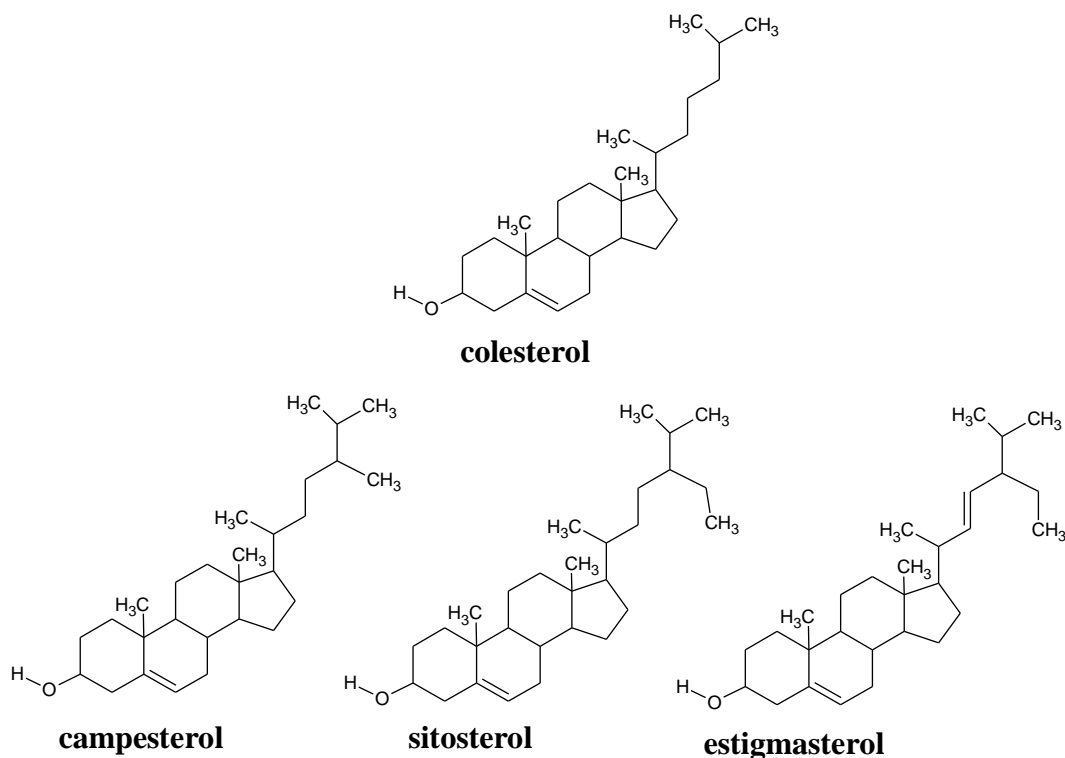
**Figura 02 – Estrutura carbônica básica de um esteroide**

O mais conhecido é o colesterol que é o mais abundante nos animais e responsável pela estabilização da bicamada fosfolipídica em membranas celulares, é também o precursor de vários hormônios. (Costa *et al.*, 2010)

Os fitoesteróides possuem, nas plantas, a mesma função básica que o colesterol possui nos animais, ou seja, regulam a fluidez da membrana das células das plantas, e outras funções associadas com a biologia das plantas. (Rocha *et al.*, 2011).

Estruturalmente os fitoesteróides possuem uma grande variedade de moléculas, e sua estrutura química difere do colesterol devido a presença de uma cadeia lateral modificada em C-24 e /ou a presença de dupla ligação em

C-22. Em sua forma saturada, os fitoesteróides são conhecidos como estanoóis, tendo o sitostanol como exemplo mais representativo. (Rocha *et al.*, 2011). Na Figura 03 tem-se a estrutura do colesterol e dos fitoesteróides mais encontrados em plantas. (Rocha *et al.*, 2011)



**Figura 03 – Estrutura do colesterol e fitoesteróides representativos.**

Em geral, os fitoesteroides (esteroides provenientes de plantas) podem ser classificados em três sub-classes: 4,4-desmetil-esteróis, 4 $\alpha$ -metil-esterol, 4,4-dimetil-esteróis. (Costa *et al.*, 2010)

Os esteroides possuem uma larga quantidade de atividades biológicas e propriedades físicas. Os fitoesteróides, em particular, são importantes produtos para a indústria alimentícia e saúde. Eles são utilizados como emulsificantes para cosméticos e são utilizados como precursores para a produção de



hormônios farmacêuticos. Eles inibem a deterioração oxidativa dos óleos e são agentes benéficos para a saúde do coração. (Abdi, 2001)

Existem crescentes evidências que sugerem que os fitoesteróides possuem efeitos contra o câncer do pulmão, ovário, seio e estômago. Tem se especulado que os fitoesteróides inibem o crescimento de células cancerosas, invasão e metástase e promovem a apoptose de células cancerosas. (Woyengo *et al.*, 2009).

Fitoesteróides também são responsáveis por uma potencial diminuição dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) o chamado colesterol ruim, devido sua interferência na absorção do colesterol no intestino, (Woyengo *et al.*, 2009) o que tem levado a indústria alimentícia a enriquecer alguns alimentos com fitoesteróides. (Costa *et al.*, 2010)

#### **1.4 OLEAGINOSAS AMAZÔNICAS**

A busca de novas fontes de óleos vegetais tem sido um tópico de grande interesse nos últimos 20 anos. Isto é particularmente interessante para países onde há um grande consumo de óleos ricos em gordura saturada, como é o caso do óleo de dendê e o óleo de côco, na África. A região amazônica possui mais de 150 espécies de palmeiras, algumas das quais representam uma grande fonte de óleos comestíveis, por exemplo, *Oenocarpus bataua*, *Oenocarpus bacaba*, *Mauritia flexuosa*, *Atallea maripa*, *A. speciosa*, *Bactris gasipaes*, entre outras. (Montúfar, *et al.*, 2010)

Os frutos oleaginosos da região amazônica apresentam composição notável de micronutrientes, especialmente em vitaminas, sendo valorizados no contexto atual como alimentos saúde; alimentos naturais ou ainda como

produtos éticos ou ecologicamente corretos. Mais que 61% da gordura existente nos frutos amazônicos são de gordura insaturada, tal como ácido oléico e linoléico, gordura considerada saudável com propriedades cardioprotetoras (Rodrigues *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2010 Morón-Villarreyes, 1998; Vallilo *et al.*, 1999; Pallet, 2002).

Na indústria cosmética, óleos são usados como umectantes, emolientes, emulsificantes e agentes modificadores de viscosidade (Lawson, 1995; Behrens *et al.*, 2006). Os ácidos graxos assim como seus derivados ésteres podem ser usados em uma variedade de aplicações relacionadas aos cuidados pessoais. Os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoléico e linolênico são muito comuns em certos tipos de cosméticos. Outros possuem propriedades rejuvenescedoras ou curativas. (Possolo, 1945; Behrens *et al.*, 2006; Wildman, 2001).

Em se tratando de óleos amazônicos, o governo já vem apontando seus estudos como primordiais para a economia da região. O Amazonas vem exportando esses óleos para diversas indústrias e mercados sem um maior conhecimento da composição desses óleos. Algumas oleaginosas amazônicas não possuem sequer qualquer estudo a respeito de sua composição química, como é o caso da caraná ou buritirana (*Mauritiella armata* (Mart.) Burret), um fruto comestível do gênero *Mauritiella*, que é processado e consumido igualmente como o do buriti, dando um vinho tão saboroso quanto o desse, que pode também ser boa fonte de carotenóides, talvez até melhor, e de outros princípios ativos. (Miranda *et al.*, 2001; Cavalcante, 1996; Rosso e Mercadante, 2007).

Outra espécie oleaginosa amazônica pouco estudada é a jauari (*Astrocaryum jauari* (Mart.)), A polpa do fruto é comestível “in natura”, os seus frutos são usados como isca para peixe e é muito importante na dieta de alguns peixes, em especial do tambaqui, conhecido peixe amazônico (Goulding e Lima, 1998; Miranda *et al.*, 2001). Da polpa e da amêndoa são extraídos óleos comestíveis, na literatura encontra-se apenas relato dos aspectos físico-químicos do óleo da polpa do jauari, (Goulding e Lima, 1998).

O uxi-amarelo (*Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas) possui uma polpa oleosa, de sabor e cheiro peculiares, muito agradáveis; é consumida no estado natural, pura ou com farinha de mandioca, constituindo um importante complemento na alimentação das classes populares. Seus caracteres físico-químicos determinados por Pinto (1956) são bastante aproximados dos referidos para o óleo de oliveira; apenas o índice de iodo e refração são pouco inferiores. As propriedades organolépticas são as mais aproximadas possíveis. (Cavalcante, 1996). Sua composição lipídica é ainda desconhecida.

O patauá (*Oenocarpus bataua* (Mart.)) é largamente distribuído na região Amazônica, e seus frutos são largamente utilizados para o preparo de suco muito apreciado pela população local, bem como para extração de óleo muito parecido com o óleo de oliva. (Lorenzi, 2004). Também poucos são os estudos sobre a composição química do óleo, como aspectos físico-químicos e alguns ácidos graxos segundo Chaves e Pechnik (1946).

Finalmente, cita-se a bacaba (*Oenocarpus bacaba* (Mart.)), palmeira nativa da Amazônia, dispersa pelo norte do continente sendo mais freqüente no Pará e no Amazonas, tendo como habitat ideal à mata virgem alta de terra firme e também de várzea. Pelo mesmo processo do açaí, prepara-se o “vinho”

de bacaba, de cor creme-leitoso. É um vinho de sabor realmente agradável, mas com um teor de óleo bastante elevado, o que faz recomendar comedimento no seu consumo. (Pinto, 1955)

#### **1.4.1 *Oenocarpus bacaba* Mart.**

Palmeira monocaule, com 7 a 22 m de altura e caule liso medindo de 12 a 25 cm de diâmetro. Folhas do tipo pinadas de 8 a 17; tamanho da folha varia de 2,2 a 5,6 m de comprimento, o seu pecíolo de 0,3 a 1,6 m, são agrupadas regularmente e dispostas em diferentes planos. As flores são unissexuais de ambos os sexos dispostos na mesma inflorescência em tríades, pares e solitárias. Frutos elipsóides globosos lisos, medindo de 1,3 a 1,5 de diâmetro, de coloração escura arroxeada (Figura 04). Conhecida popularmente como bacaba é uma espécie muito freqüente na floresta de terra firme e áreas abertas, nos solos bem drenados de baixa altitude. Pode suportar baixa insolação, mas cresce melhor em condições de alta exposição à luz. Encontrase distribuída principalmente ao norte do Rio Amazonas, nos estados do Amazonas e Pará, também na Colômbia, Venezuela e Guianas. Frutifica abundantemente durante o verão. Um quilo de frutos desprovidos de polpa contém cerca de 380 unidades, cuja germinação ocorre em 60-90 dias. (Miranda *et al.*, 2001, Lorenzi *et al.*, 2004)



**Figura 04. frutos de *Oenocarpus bacaba***

#### **1.4.1.1 Usos de bacaba**

A polpa do fruto é usada para produzir um “vinho”, que é bastante nutritivo e energético. Dela extrai-se também um óleo semelhante ao de oliva, utilizado às vezes em frituras caseiras. O fruto tem potencial industrial na obtenção de óleo comestível, que serve também de matéria prima para as indústrias de saboarias, velas e alimentícias, para preparação de picolés, sorvetes e sucos concentrados. É utilizado no trato de asma, tuberculose, diarreia, dor de cabeça e estômago (Miranda *et al.*, 2001)

#### **1.4.2 *Oenocarpus bataua* Mart.**

*Oenocarpus bataua* é uma das plantas mais utilizadas pela comunidade indígena na Amazônia. (Montúfar *et al.*, 2010) É uma palmeira monocaule, com 4,3 a 26 m de altura e caule liso medindo de 15 a 45 cm de diâmetro. Folhas do tipo pinadas variando de 9 a 20; o tamanho da folha varia de 3,2 a 11 m de comprimento, pares e solitárias. Frutos ovóide-elipsóides lisos, de coloração escura arroxeada (Figura 05). Conhecida como patauí é uma espécie muito abundante nas florestas de baixio, e ocasionalmente em terra firme, nos solos

arenosos mal drenados de baixa altitude. Largamente distribuída na região Amazônica brasileira e norte da América do Sul, na floresta úmida de várzeas e de galeria, tanto inundáveis como de terra firme. A frutificação ocorre no verão. Um quilo de sementes contém cerca de 170 unidades cuja germinação ocorre em 30-90 dias. (Miranda *et al.*, 2001, Lorenzi *et al.*, 2004). *Oenocarpus bataua* foi considerada como sendo uma espécie “oligárquica” na Amazônia, cuja população natural produz de 11,1 toneladas de frutos/ha/ano, podendo gerar rendas substanciais e ecologicamente sustentáveis (Ruiz e Alencar, 2004).



**Figura 05. Coleta do fruto de *Oenocarpus bataua***

#### **1.4.2.1 Usos de patauá**

A polpa do fruto é usada para produzir o vinho de patauá, que é bastante nutritivo e energético. Dela extrai-se um óleo que pode substituir o azeite de oliva na culinária, por ter sabor e propriedades químicas semelhantes. A polpa do fruto tem usos medicinais no controle da queda de cabelo, caspa, bronquite e tuberculose, a maceração dos frutos é utilizada no tratamento da malária. O fruto tem potencial industrial na produção de óleo comestível, que serve de matéria-prima na composição de cosméticos, na

fabricação de sabões, estearina e alimentícia para a fabricação de picolés, sorvetes e sucos concentrados. (Miranda *et al.*, 2001, Lorenzi *et al.*, 2004, Revilla, 2001, Montúfar *et al.*, 2010)

#### **1.4.3 *Leopoldinia piassaba* A. Wallace**

*Leopoldinia piassaba* possui caule simples ou raramente cespitoso com poucas hastes, densamente revestido na metade superior por fibras longas e fortes. Possui de 4-5 m de altura e 15 cm de diâmetro (cerca de 60 cm incluindo as fibras). Folhas pinadas, em número de 14-16 contemporâneas, emitindo de suas bainhas persistentes muitas fibras amarronzadas com mais de 1 m de comprimento, que envolvem a parte superior do caule. Inflorescências interfolias, com pedúnculo de cerca de 80 cm de comprimento; raque (parte ramificada) de cerca de 50 cm, com numerosas raquillas de cerca de 15 cm de comprimento. Frutos ovalados ou elipsóides, de cerca de 3 cm de diâmetro e 2,5 cm de espessura, de cor castanho-alaranjada ou marrom-avermelhada quando maduros (Figura 06). Conhecida popularmente como piassaba ou piaçava, ocorre no Estado do Amazonas, na bacia do alto do Rio Negro, nas margens de igapós e igarapés de águas negras, em solos arenosos. Frutificação moderada nos meses de inverno. Multiplica-se por sementes. Um quilograma de frutos contém cerca de 68 unidades, cujas sementes apresentam baixa germinação em 4-6 meses. (Lorenzi *et al.*, 2004)



**Figura 06. Frutos de *Leopoldinia piassaba***

#### **1.4.3.1 Usos de piassaba**

As fibras das bainhas que envolvem a parte superior do estipe são empregadas para o fabrico de vassouras, escovas e cordas, constituindo o seu extrativismo numa das principais atividades econômicas da região. Dos frutos se prepara uma bebida chamada “chiquexiqui”. A palmeira é de aparência estranha e curiosa devido à presença das barbas (fibras) no estipe, tendo por isso grande potencial para cultivo no paisagismo. (Lorenzi *et al.*, 2004)

#### **1.4.4 *Endopleura uchi* Huber**

Pertence à família das Humiriaceae, é uma árvore que atinge cerca de 25 m de altura, galhos com flores de cor verde com cheiro forte, madeira avermelhada ou amarela dura e pesada, freqüente nas matas de terra firme nos estados do Amazonas e Parintins. Os frutos possuem polpa amilácea-oleosa (Figura 07). Conhecida como uxi, frutifica nos meses de agosto a novembro e o fruto amadurece de janeiro a março. (Lorenzi, *et al.*, 2006, Revilla, 2001).





**Figura 07. Frutos de *Endopleura uchi***

#### **1.4.4.1 Usos de uxi**

A polpa dos frutos é consumida “in natura”, em sorvetes, licores e doces e é muito apreciada; isso explica o fato de ser amplamente comercializado nas feiras locais. O chá da casca é utilizado em distúrbios menstruais e inflamações uterinas. (Lorenzi, *et al.*, 2006, Revilla, 2001)

### **1.5 COMPONENTES QUÍMICOS DOS FRUTOS**

Os relatos sobre a química dos frutos de *Leopoldinia piassaba* são escassos e muito antigos e se resumem a teor de proteínas, carboidratos e lipídios e não esclarecem muito sobre a química deste fruto.

Foram encontrados alguns trabalhos sobre a química dos outros frutos que estão descritos a seguir.

### 1.5.1 *Oenocarpus bataua*

O gênero *Oenocarpus* e principalmente a espécie *Oenocarpus bataua* têm sido descrita como uma promissora palmeira da região Amazônica devido ao conteúdo de óleo de seus frutos. (Montúfar *et al.*, 2010)

Aguiar *et al.* (1980) relataram que a cada 100 g de polpa o patauá possui 35,6 % de umidade, 3,3 g de proteína, 12,8g de gordura, 47,2 g de carboidratos, 1,1 g de cinzas e 31,5 g de fibras. Cada 100 g de fruto correspondem a 317,2 Kcal de energia consumida. Neste mesmo trabalho, Aguiar aponta para cada 100 g de fruto 1300 µg de carotenóides totais e 0,41 mg de zinco.

Em estudos mais antigos, 1946, Chaves e Pechnik encontraram a seguinte composição de ácidos graxos para o patauá: 6,0% de ácido esteárico, 6,0% de ácido palmítico, 79,2% de ácido oléico e 8,8% de ácido linoléico. Lubrano *et al.*, (1994) descreve o óleo de patauá com 21% de ácido palmítico, 1% de ácido palmitoléico, 1,5% de ácido esteárico, 70% de ácido oléico, 4% de ácido linoléico, traços de ácido linolênico e 2% de ácido esteárico. Lubrano também apresenta a composição de esteróis com 36% de β-sitosterol e 33% de Δ<sup>5</sup> avenasterol, 1,5% de colesterol, 7% de campsterol, e 20% de estigmasterol. Foram relatados também os valores de 94% de α-tocoferol, 0,8% de δ-tocoferol, e 5,7% de γ-tocotrienol.

De acordo com Revilla (2001) o patauá possui em sua composição de ácidos graxos: óleo palmítico, linoléico, esteárico, linolênico e palmitoléico (77 a 82% de ácidos graxos não saturados e 2 a 4% saturados). Possui em sua composição de aminoácidos: ácido glutâmico, arginina, alaina, ácido aspártico,

cistina, fenil-alanina, glicina, tirosina, lisina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, lisina, cisteína, triptofano, serina, quirosina, metionina, treonina, valina e flavonóides.

O mesocarpo (polpa) de *Oenocarpus bataua* é rico em lipídios com 51,6 % de peso seco. No trabalho de Montúfar *et al.*, (2010), eles descrevem 15 ácidos graxos identificados em amostras de diversas localidades, sendo que para o óleo de patauá amazônico ele descreve: ácido oléico (77,7%), seguido por ácido palmítico (13,2%) que são os componentes majoritários e juntos perfazem aproximadamente 90% do conteúdo total de ácidos graxos. Outros componentes em quantidades menores são o ácido linoléico (2,7%), ácido esteárico (3,6%), ácido palmitoléico (0,6%) e ácido alfa-linolênico (0,6%). O ácido cis-vacênico não relatado em outros trabalhos é apontado como o terceiro mais predominante na espécie em amostras de óleo de patauá provenientes do Peru e Guiana Francesa. Devido ao alto conteúdo de ácido oléico, os frutos de patauá são uma ótima fonte de óleo monoinsaturado, o conteúdo de ácido oléico presente no patauá é comparável ao do azeite de oliva. De acordo com este mesmo trabalho, o óleo de patauá apresenta 368 mg de esteróides por Kg de óleo, sendo 34,2 % de  $\beta$ -sitosterol, 27,8% de  $\Delta$ 5 avenasterol, 19,2% de estigmasterol, 7,2 % de campesterol, 6,0% de campestanol e 3,4% de colesterol.

A atividade antioxidante do  $\Delta$ 5 avenasterol já foi comprovada. O óleo de patauá ainda possui 2,4 mg de carotenóides ( $\beta$ -caroteno) por kg de óleo, e 1700 mg de tocoferóis por kg de óleo. (Montafúr *et al.*, 2010)

Em outro trabalho Rodrigues *et al.*, (2010) descrevem para o patauá amazônico a seguinte composição de ácidos graxos: 0,1% de ácido mirístico,

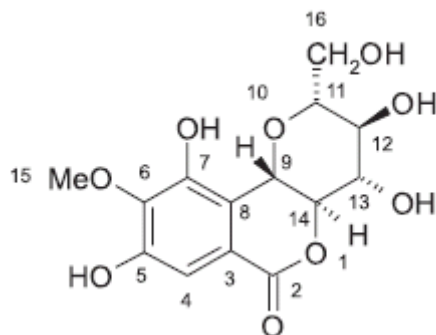
0,3% de ácido pentadecanóico (C15:0), 13,3% de ácido palmítico, 0,7% de ácido palmitoleico, 0,1% de ácido margárico (C17:0), 4,1% de ácido esteárico, 76,7% de ácido oléico, 3,9% de ácido linoléico, 0,1% de ácido  $\alpha$ -linolênico, e 0,6% de ácido araquidônico. Apresenta ainda a composição de tocoferóis de 56,5% de  $\alpha$ -tocoferol, 7,8% da mistura de  $\beta$  e  $\gamma$ -tocoferol e 7,7% de  $\delta$ -tocoferol.

### 1.5.2 *Endopleura uchi*

De acordo com Marx *et al.*, (2002), a polpa de uchi possui 14,81% de lipídios, dentre os quais 7,38% é de ácido oléico, seguido por 3,78% de ácido palmítico e 0,97% de ácido esteárico e ainda 0,66% de ácido linoléico, 0,46% de ácido linolênico, e traços de ácido mirístico e eicosanoico. Possui 87,6 mg de esqualeno, 33,75 mg de campesterol, 82,5 mg de estigmasterol e 736 mg de sitosterol a cada 100g de óleo. Foram identificadas as vitaminas C (ácido ascórbico) 22,2 mg e  $\alpha$ -tocoferol 1mg a cada 100 g de polpa.

Os frutos de uxi-amarelo apresentam uma boa atividade antioxidante de acordo com Gonçalves *et al.*, 2010. O extrato aquoso das cascas de uchi apresentam uma boa quantidade de bergenina (Figura 08), que possui atividade antiinflamatória pela inibição seletiva de ciclooxigenases (COX-2). A bergenina também possui atividade antimicrobiana segundo Nunomura *et al.*, 2009 e Silva *et al.*, 2009.

De acordo com Magalhães *et al.*, 2007, a bergenina é também encontrada nos frutos de uchi bem como os carotenóides  $\alpha$ -caroteno (traços) e  $\beta$ -caroteno (16,57  $\mu\text{g/g}$ ). Em trabalho recente, Costa *et al.*, (2010) identificaram 167,7  $\mu\text{g/g} \pm 94,96$  de  $\alpha$ -tocoferol e 337,7  $\mu\text{g/g} \pm 23,31$  de  $\gamma$ -tocoferol por g de fruto.



**Figura 08. Estrutura da bergenina**

### 1.5.3 *Oenocarpus bacaba*

Existem algumas descrições da composição da cadeia graxa de *Oenocarpus bacaba* na literatura. Segundo Lubrano *et al.*, (1994) o óleo de bacaba possui 18% de ácido palmítico, 0,5% de ácido palmitoléico, 3,0% de ácido esteárico, 39% de ácido oléico, 38% de ácido linoléico, traços de ácido linolênico. Pinto, (1955) descreve o óleo com 11,2% de ácido palmítico, 9,1% de ácido esteárico, 61,7% de ácido oléico, e 13,2% de ácido linoléico. Rodrigues *et al.*, (2010) verificou a presença de 13 ácidos graxos, traços de ácido láurico e ácido eicosenóico, 0,26% de ácido tridecanóico, 0,59% de ácido mirístico, 0,63% de ácido pentadecanóico, 32,27% de ácido palmítico, 1,32% de ácido palmitoleico, 2,75% de ácido esteárico, 40,82% de ácido oléico, 2,01% de ácido cis-vacênico, 9,78% de ácido linoléico, 1,93% de ácido  $\alpha$ -linolênico, e 0,48% de ácido araquídico. De acordo com Lubrano *et al.*, (1994) o óleo também possui 2% de colesterol, 8,5% de campsterol, 11% de estigmasterol, 72% de  $\beta$ -sitosterol, e 3,5% de  $\Delta^5$  avenasterol, possui 97% de  $\alpha$ -tocoferol, 1,9% de  $\beta$ -tocotrienol, e 0,8% de  $\gamma$ -tocotrienol.

Em trabalho recente foi identificado um bom teor de flavonoides e antocianinas em bacaba, através de análises por CLAE-EM foi possível

identificar no extrato de bacaba em acetona / água a presença de rutina, quercetina, orientina, vicenina, entre outros, mostrando-se um fruto rico em fenólicos. (Finco *et al.*, 2012)

## 2. Objetivos

Objetivo geral:

Caracterizar a composição química de frutos de quatro espécies oleaginosas amazônicas por cromatografia gasosa de alta resolução e cromatografia líquida de alta eficiência.

Objetivos específicos:

1. Comparar teores de extração de óleo de sementes / polpa de frutos de *Oenocarpus bacaba*, *Oenocarpus bataua*, *Endopleura uchi* e *Leopoldinia piassaba*.
2. Caracterizar da composição de cadeia graxa destes extratos por cromatografia gasosa de alta resolução;
3. Identificar de fitoesteróides por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas;
4. Quantificar de fitoesteróides por cromatografia gasosa de alta resolução utilizando-se detector por ionização de chama.
5. Quantificar de tocoferóis por cromatografia líquida de alta eficiência; (CLAE)
6. Estimar a atividade antioxidante, larvicida, e inibição de lipoxidase e acetil-colinesterase dos frutos estudados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cromatografia

- *Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)*: foram utilizadas cromatoplasmas comparativas prontas em fase normal de sílica gel 60, com indicador de fluorescência F<sub>254</sub> da Merck;
- *Cromatografia em coluna (CC)*: para separação inicial de constituintes químicos de extratos brutos e frações primárias em coluna, utilizou-se sílica gel 60 (0,063 – 0,200 micras) da Merck; e para separação de constituintes químicos em frações e sub-frações, utilizou-se também sílica gel 60 (0,040 – 0,55 micras) *flash* da Merck, utilizou-se também Sephadex LH-20.
- *Revelação / iluminação de placas em CCDC*: para visualização das substâncias nas placas foram utilizados: irradiação de luz UV (254 nm e 366 nm); vapor de iodo a temperatura ambiente; solução de anisaldeído aquecido a 110 °C; solução de FeCl<sub>3</sub> alcoólico a 1 %.
- *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE*: O cromatógrafo utilizado na análise de tocoferóis foi o SHIMADZU Prominence LC-20A, equipado com



um injetor automático SIL-20A, detector UV-Vis-DAD SPD-M20A, bomba quaternária LC-10AT Vp e software LC Solutions.

- *Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas*– CG / DIC: Foi utilizado para análise de ácidos graxos e análise e quantificação de esteroides. Cromatógrafo gasoso de alta resolução da marca Agilent, modelo HP 6890 Plus, equipado com sistema de injeção automática de amostras, modelo HP 7683B. O software utilizado foi o Chemstation.
- Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas: CG-EM utilizado foi um cromatógrafo gasoso (Trace CG Ultra, Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas (DSQ II, Thermo Scientific) com analisador quadrupolo simples e um auto-injetor (AI 3000, Thermo Scientific). Foi utilizado o software Xcalibur 1.4 para aquisição e processamento de dados. Este equipamento foi utilizado para análise e identificação de esteroides.

## **3.2 Espectroscopia**

### *3.2.1 RMN*

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e DEPT 125 foram registrados no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), utilizando-se espectrômetro Inova-500 da Varian (500 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm ( $\delta$ ).

### 3.2.2 EM de alta resolução

O espectro de massa, obtido na USP-Ribeirão Preto, foi registrado utilizando-se o aparelho micrOTOF II da marca Bruker Daltonics, em modo positivo, utilizando-se NaTFA como calibrante, com um erro de 3,7 ppm.

## 3.3 Equipamentos e acessórios de laboratório

Os seguintes equipamentos foram utilizados no decorrer do trabalho:

- Balanças analíticas e semi-analíticas:
  - Explorer – Ohaus, modelo E01140, com limite de peso de 110 g.
- Moinho de facas de pequeno porte tipo Wiley da Tecnal.
- Lâmpada de UV, marca Helfont, modelo CS-0616 lâmpada fluorescente (254 nm e 365 nm).
- Rotoevaporadores marca Fisatom, modelo 802 A.
- Bateria extratora de solventes da marca Fisatom;
- Banho de Ultrassom Cleaner Unique marca Merse, Modelo USC 1400, com frequência ultrasônica 40 kHz e potência 120 Watts.

## 3.4 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados no decorrer do trabalho foram em geral previamente purificados por destilação fracionada.

Solventes como hexano, acetato de etila, clorofórmio e diclorometano foram ainda tratados com sais anidros ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$ ), para retirar resíduos de umidade, após a destilação.

Solventes utilizados em CG e CLAE eram de pureza elevada e ultra-filtrados pelo fabricante (grau cromatográfico).

### **3.5 Levantamento bibliográfico**

Foi realizado o levantamento bibliográfico das espécies, *Oenocarpus bataua* (patauá), *Endopleura uchi* (uchi), *Oenocarpus bacaba* (bacaba), *Leopoldinia piassaba* (piaçava) e *Astrocaryum aculeatum* (tucumã). Utilizando-se de bibliografia específica e ferramentas de busca disponíveis no Portal Periodicos da CAPES (Scifinder Scholar, Scopus, Web of Science, Medline pub, Biological, Scirus e CAB Abstracts). Foi utilizado também o sistema COMUT para obtenção de algumas referências de interesse.

### **3.6 Coleta dos frutos e triagem do material vegetal**

Todos os frutos são provenientes de espécies bem conhecidas na região, comercializadas e utilizadas pela população.

#### **3.6.1 Coleta de patauá**

A coleta dos frutos de patauá (*Oenocarpus batauá*) foi realizada em dois períodos: em outubro de 2007 e posteriormente foi necessária nova coleta para término do trabalho em agosto de 2010, na Reserva Florestal Adolpho Ducke - Am. A árvore do patauá foi encontrada em um terreno arenoso. Os frutos coletados, num total de 500 frutos, foram selecionados e acondicionados em freezer e posteriormente foram descascados e despulpados manualmente separando-se as cascas, a polpa e as sementes.

### 3.6.2 *Coleta de piaçava*

A coleta dos frutos de piaçava foi realizada no rio Curuduri, em março de 2008, afluente araçá, próximo a Barcelos. Cerca de 200 frutos fornecidos pela fundação Vitória Amazônica. Os frutos foram acondicionados em freezer e a seguir despoldados separando-se as cascas, a polpa e as sementes. O “vinho” dos frutos também foi adquirido na cidade de Barcelos para estudo do teor de óleo consumido nesta bebida. Este vinho é preparado por extração com água em liquidificador e posterior filtração.

### 3.6.3 *Coleta de bacaba*

A coleta dos frutos de bacaba foi realizada em agosto de 2008, no Km 12 da BR-174, em propriedade particular, sob um clima quente. Foram coletados cerca de 900 frutos que foram acondicionados em freezers.

### 3.6.4 *Aquisição de uxi*

O *uxi* foi adquirido no comércio local, num total de 30 frutos de *uxi*. Os frutos foram despoldados e descascados manualmente.

## **3.7 Estudo ponderal dos frutos e cálculo do teor percentual de água**

Foi medido o percentual em massa de casca, polpa e semente para cada fruto. Em seguida, para a determinação do teor de água, cada parte do fruto foi separada, pesada e colocada para secar em estufa a 60 °C por 72 horas ou até peso constante. Medindo-se então o teor percentual de água presente nas sementes e nas polpas.

### 3.8 Preparação de extratos orgânicos.

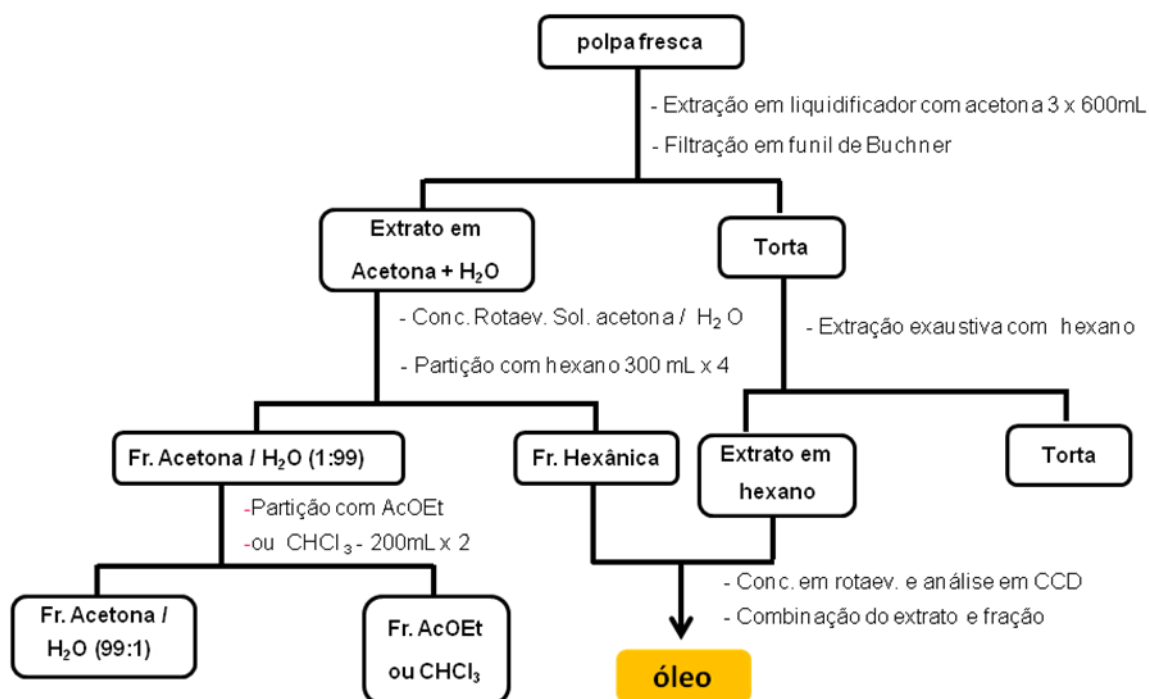
Foram preparados três diferentes extratos. O material fresco (polpa) foi extraído a frio com acetona (a frio para evitar perda de material termo-sensível e com acetona por ser solúvel em água facilitando a extração dos constituintes, já que a polpa era fresca), hexano e os materiais secos foram extraídos com hexano e metanol em soxhlet, para comparação de teor de extrativos.

#### 3.8.1 *Extração do óleo a frio*

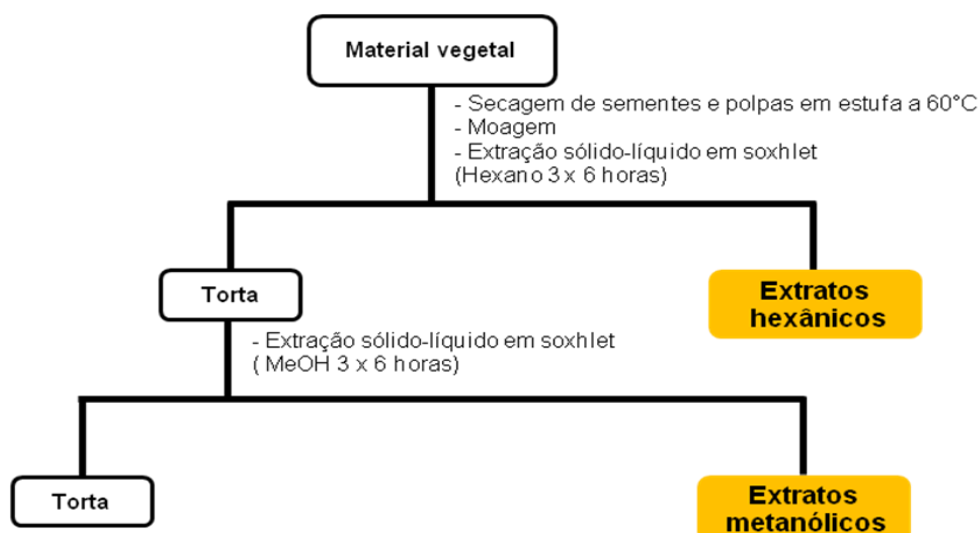
A polpa de cada um dos frutos foi extraída em liquidificador com acetona (3 x 600 mL) e a seguir a polpa foi extraída exaustivamente com hexano até completa extinção de óleo. O extrato em acetona foi então concentrado em rotaevaporador e a seguir acrescentou-se água até obter a proporção de Acetona: água (7:3), essa solução foi então submetida à partição com hexano (4 x 300mL) para exaurir o óleo presente nesta fração, e posteriormente particionou-se o extrato em acetona também com AcOEt (4 x 300 mL), as emulsões formadas foram quebradas em centrífuga a 20°C, a 15.000 g e tempo de 10 min (Fluxograma 01). Todas as frações e extratos foram concentrados em rotaevaporador e medidos a massa e teor de extração. Os óleos obtidos do extrato hexânico e fração hexânica foram então avaliados em CCD, para verificar se tinham composição semelhante, foram então combinados e reservados em frasco âmbar em freezer para análises posteriores.

### 3.8.2 Extração em Soxhlet

Tanto a polpa quanto a semente de cada um dos frutos foram secas em estufa a 60°C e o teor percentual de água foi medido. A polpa e semente (separadamente) foram extraídas por extração sólido-líquido contínua em Soxhlet com hexano (3 x 6 h) e a seguir extraídas com metanol (3 x 6 h). Os extratos foram concentrados em rotaevaporador e suas massas foram determinadas para cálculo de teor de extrativos (Fluxograma 02).



**Fluxograma 01 – Extração de óleo à frio**



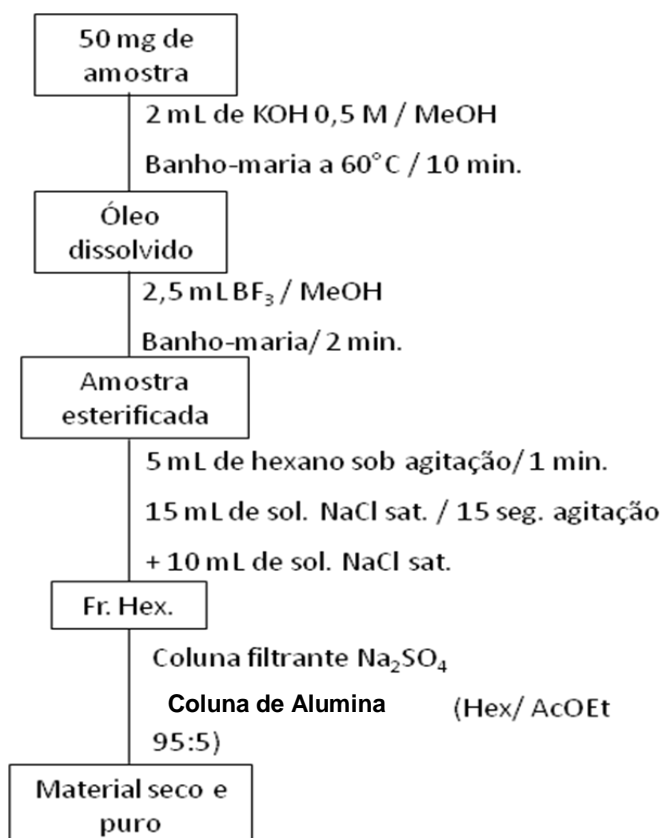
**Fluxograma 02 – Preparação de extratos hexânicos (óleo extraído à quente) e metanólicos**

### 3.9 Análise de ácidos graxos através de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR – DIC)

O óleo extraído a frio foi derivatizado segundo o método oficial AOAC 969.33 modificado. Foram colocados em tubos de ensaio 50 mg de cada óleo. Após a adição de 2 mL de hidróxido de potássio 0,5 N metanólico, os tubos foram tampados e levados a aquecimento em banho maria por 10 min a uma temperatura de 50°C. A seguir, foi adicionado 2,5mL de trifluoreto de boro metanólico (BF<sub>3</sub>/ MeOH) a cada tubo e levado novamente ao banho-maria por 2 min. Em seguida, adicionou-se 5 mL de hexano e agitou-se por um minuto, logo após foram acrescentados 15 mL de solução saturada de NaCl e agitou-se por mais 15 segundos, adicionando-se mais 10mL de solução saturada de NaCl, logo em seguida. A fração hexânica foi retirada e filtrada em uma pequena coluna de sulfato de sódio anidro, para remoção de água. Para remoção de impurezas a fração hexânica foi eluída em pequena coluna contendo alumina (óxido de alumínio 90, 0,063-0,200 mm), utilizando-se como

fase móvel Hex/ AcOEt (95:5). A fração foi seca em banho de areia a 50°C. De acordo com fluxograma 03.

A conversão em ésteres metílicos foi monitorada através de CCD, com o sistema de eluição Hex/ Et<sub>2</sub>O/ AcOEt (80:16:4) e revelada com solução etanólica 20% de ácido fosfomolibdico a 200°C.



### Fluxograma 03. Reação de esterificação e transesterificação dos óleos

O aparelho de CG-DIC foi configurado com duas colunas cromatográficas idênticas, em paralelo, uma coluna polar (HP INNOWAX-20) e outra apolar (HP-5) com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 µm cada, com detectores de ionização de chama (DIC).

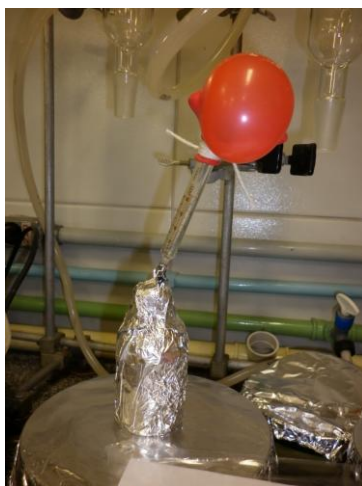


O modo de injeção utilizado foi o modo split, (2:1), 250 °C. Gás de arraste utilizado H<sub>2</sub>, com 1 µL de amostra injetada na concentração de 1 mg/mL, mantendo-se um fluxo de 2,8 mL/min. A uma temperatura de 270 °C. Programação do forno: 107 °C, subindo 7 °C/min até 149 °C, isoterma por 54 min, subindo 6 °C/min até 260 °C, isoterma por 1,5 min. Os ésteres metílicos das amostras foram identificados com auxílio de padrões comerciais de ésteres metílicos (Sigma-Aldrich e Carlo-Elba), que foram injetados nas mesmas condições do método descrito para as amostras. A quantificação foi realizada pelo método de normalização de área, considerando apenas as áreas dos picos identificados.

### **3.10 Obtenção do material insaponificável**

O óleo extraído a frio da polpa de cada um dos frutos foi submetido inicialmente à reação de saponificação. Em frascos de 150 mL, mediu-se 1 g de óleo e adicionou-se 20 mL de hexano 0,1% BHT (Butil- hidroxi-tolueno), e a seguir 20 mL de KOH 10% em MeOH, e deixou-se sob agitação durante 16 horas, no escuro, sob nitrogênio, em temperatura ambiente (Figura 09). Após o término da reação acrescentou-se 20 mL de H<sub>2</sub>O milli-Q e o conteúdo do frasco foi transferido para um funil de separação, foram obtidas uma fase hexânica e outra fase metanólica. A fase metanólica foi concentrada em rotaevaporador e seca em banho de areia em temperatura não excedente a 50°C. Já a fase hexânica foi lavada várias vezes com H<sub>2</sub>O tipo Milli-Q na proporção 1:1 (v:v), até completa extração do excesso de KOH, o que foi comprovado através de indicador fenolftaleína. A seguir, a fração hexânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada em rotaevaporador a 60°C, foi transferida para frascos

previamente pesados e o material insaponificável foi seco na presença de gás nitrogênio para determinação de massa. Realizou-se CCDC para analisar e comparar o perfil cromatográfico, que foi revelada com ácido fosfomolibdico a 150°C.



**Figura 09.** Reação de saponificação em presença de nitrogênio em condições brandas.

### **3.11 Identificação e Quantificação de tocoferóis**

#### *3.11.1 Identificação de tocoferóis*

As análises de identificação e quantificação de tocoferóis foram realizadas em um cromatógrafo líquido SHIMADZU Prominence LC-20A, equipado com um injetor automático SIL-20A, detector UV-Vis-DAD SPD-M20A, bomba quaternária LC-10AT Vp e software LC Solutions. O método de análise foi desenvolvido a partir da eluição dos padrões comerciais de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$  - tocoferóis em mistura, modificando alguns parâmetros, como a fase móvel, a fase estacionária e tempo de análise, visando o aumento da eficiência, resolução e seletividade. As colunas C18 utilizadas não apresentaram resolução dos isômeros  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol em nenhuma das fases móveis

testadas, já as colunas de fase normal apresentaram uma melhor separação. O método escolhido, com melhor resolução e tempo de análise, foi em modo isocrático utilizando-se como fase estacionária uma coluna Suphespher Si-60, com tamanho de partícula de 5  $\mu\text{M}$  e dimensões de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno. A fase móvel utilizada foi Hexano com 0,1% HOAc e i-PrOH (99,5:0,5), com um fluxo de 2 ml/min e tempo de análise de 45 min. Com o detector UV-vis-DAD nos seguintes comprimentos de onda 220 e 295 nm.

O preparo das amostras consistiu em solubilizar o material insaponificável em hexano grau HPLC na concentração de 10 mg / mL.

Para identificação de tocoferóis, os padrões foram injetados individualmente, em triplicata, no método de análise desenvolvido. O tempo de retenção médio obtido para os padrões de tocoferol foi comparado com o tempo retenção de possíveis tocoferóis observados nas amostras eluídas no mesmo método. Posteriormente os padrões foram co-injetados com as amostras para confirmação da identificação dos tocoferóis, pelo método do padrão externo.

### *3.11.2 Quantificação de tocoferóis*

Os padrões de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$  - tocoferóis foram injetados no volume de 50  $\mu\text{L}$ , em triplicata, em concentrações variáveis para construção das curvas de calibração em análises realizadas no mesmo dia. As amostras foram injetadas em duplicata no volume de 50  $\mu\text{L}$ . A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo. O cálculo da concentração de tocoferol é dado pela interpolação dos dados de área dos tocoferóis nas amostras, na equação da

reta obtida para cada um dos padrões. A concentração de tocoferol determinada (cd) é então relacionada à concentração total de amostra injetada de material insaponificável, e a 1g de óleo (quantidade de óleo submetida a reação de saponificação).

### **3.12 Análise de fitoesteróides**

#### *3.12.1 Instrumentos cromatográficos*

Foi utilizado um CG-EM para identificação de fitoesteróides e um CG-DIC para quantificação. Os componentes foram identificados em comparação com as bibliotecas ADAMS e NIST. O equipamento de CG-DIC é o mesmo utilizado na quantificação de ácidos graxos.

#### *3.12.2 Método de análise e quantificação*

O material insaponificável (10 mg) foi previamente purificado para análise de esteróides através de tratamento em coluna SEP-PAK de fase normal utilizando-se como eluentes: hexano 100%, hexano : AcOEt 8:2 e AcOEt 100%. A fração rica em esteróides, hexano:AcOEt (8:2), foi derivatizada e analisada de acordo com o método descrito em Bowden *et al.*, 2009 com algumas modificações. Foi submetida a uma derivatização com reagente de sililação utilizando-se BSTFA/TMCS (1%) + Piridina (1:1) (100 µL de BSTFA / TMCS, 100 µL de piridina e 3 mg de fração esteroídica) a 70-90 °C, por 30 min, em banho ultrassônico.

A identificação dos esteroides presentes foi realizada em coluna capilar Zebron ZB-5MS (Phenomenex) de 20 m de comprimento e pré-coluna de 5 m, ambos de 0,18 mm de diâmetro interno com um filme de espessura de 0,18

$\mu\text{m}$ . A temperatura da linha de transferência foi de  $300^{\circ}\text{C}$ . O injetor utilizado foi em modo split razão igual a 17 à  $280^{\circ}\text{C}$  com fluxo de  $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperatura do forno foi programada para começar em  $120^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, com aquecimento de  $15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $250^{\circ}\text{C}$  e finalmente aumentada a  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $300^{\circ}\text{C}$ , que foi mantida por 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com fluxo de  $0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperatura da fonte de íons do espectrômetro de massas foi ajustada a  $200^{\circ}\text{C}$  e a ionização realizada por impacto eletrônico a 70 eV. A faixa de varredura foi de 50 a 650 m/z.

A quantificação foi realizada no equipamento de CG-DIC utilizando-se o mesmo método com a única diferença de que o modo split do injetor foi utilizado a 2:1. O método de quantificação foi o de padrão interno. Utilizando-se colesterol como padrão. A concentração determinada foi relacionada à quantidade de material saponificável por grama de óleo (quantidade de óleo submetida a reação de saponificação).

### **3.13 Isolamento de substância antioxidante PPP1**

O extrato metanólico de patauá (14,0 g) foi solubilizado em MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  (3:7), e a seguir foi particionado com (3 x 200 mL) de hexano, logo a seguir foi particionado com (3 x 200 mL) de clorofórmio e por último (3 x 200 mL) de acetato de etila. Cada fração foi concentrada em rotaevaporador e determinada a massa.

Todas as frações foram analisadas através de placas de CCD, quanto a atividade antioxidante, utilizando-se DPPH como reagente revelador, cuja atividade é demonstrada pela formação de cor amarela em amostras ativas. As frações também foram reveladas com reagente  $\text{FeCl}_3$ , (reagente específico

para fenólicos) e a presença de fenólicos foi confirmada através da coloração cinza escuro formada em amostras nas placas de CCD.

A fração AcOEt apresentou a maior quantidade de componentes antioxidantes em placas de CCD, bem como a maior quantidade de compostos fenólicos de acordo com reagente  $\text{FeCl}_3$ , por isso a fração AcOEt (1,7522g) foi submetida a uma coluna com 50 cm de altura e 3 cm de diâmetro. Utilizando-se Sephadex LH-20 como fase estacionária (separação por exclusão em gel), e metanol como fase móvel. Foram obtidas 08 frações de 150 mL. A fração 05 (123,2 mg) foi submetida a uma coluna de sílica flash com uma altura de 13 cm e diâmetro de 1,5 cm. Obtendo-se 30 frações de 10 mL, que foram reunidas em 8 frações codificadas de 111A1 a 111A8. A fração 111A6 obtinha a substância pura, sólido amorfo de cor marrom clara com massa de 7,0 mg, que foi codificado como PPP1 (Figura 10). A substância isolada PPP1 foi enviada ao CBA para obtenção de dados espectroscópicos.



**Figura 10. Substância isolada PPP1 ( $R_f = 0,39$  em  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (8:2) em fase normal)**

### 3.14 Ensaios biológicos

#### 3.14.1 Análise com reveladores químicos em CCD

Todos os extratos metanólicos foram analisados por CCD usando quercetina como padrão positivo de comparação. As cromatoplacas foram eluídas em  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (8:2) e após secagem, foram nebulizadas com reveladores específicos. Para indicação de fenólicos foi utilizado o  $\text{FeCl}_3$  como revelador, observando-se a coloração azul esverdeada indicando a presença de fenólicos em todos os extratos. Para indicação de atividade antioxidante foi utilizado DPPH como revelador na concentração de 1 mg/mL, observando-se o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura após 15 segundos indicando a atividade antioxidante em todos os extratos.

#### 3.14.2 Análise de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (Velioglu et al., 1998) utilizando ácido gálico como padrão de referência.

- Preparo da curva de calibração com ácido gálico: Foi preparada uma solução de ácido gálico na concentração de 1,0 mg/mL e a partir desta solução foram feitas diluições nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,125; e 0,0625 mg/mL por uma série de diluições.
- Preparo das amostras: Foram preparadas soluções de cada extrato na concentração de 1,0 mg/mL em metanol grau HPLC.

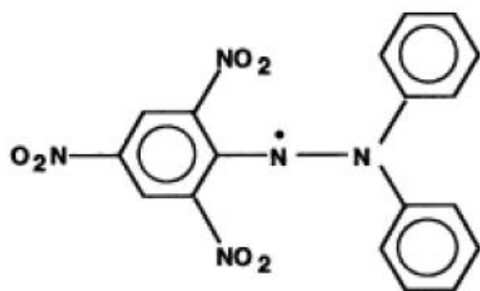
- Preparo dos reagentes: Foi preparada uma solução de bicarbonato de sódio 6,0 % em água Milli-Q e uma solução de reagente Folin-Ciocalteu (10,0 % v/v) em água Milli-Q.
- Metodologia: Foram transferidos 200 µL da amostra a ser analisada, em triplicata, para frascos âmbar e adicionou-se 1,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu recém preparado (10,0 % m/v, em água purificada) para cada frasco, após cinco minutos foram adicionados 1,5 mL de solução tampão de bicarbonato de sódio (6,0 %). As amostras foram incubadas durante 90 minutos em ausência de luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/Visível Femto 800XI a 725 nm. Como branco utilizou-se água Milli-Q.
- Cálculo do teor de fenólicos totais: Uma curva de calibração foi construída a partir dos dados de absorbância obtidos das soluções padrão de ácido gálico. Através da interpolação dos valores de absorbância dos extratos na curva de calibração, calcula-se o teor de fenólicos totais expressos em gramas (g) de ácido gálico por mL de solução (AG g/mL).

#### *3.14.3. Teste da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH.*

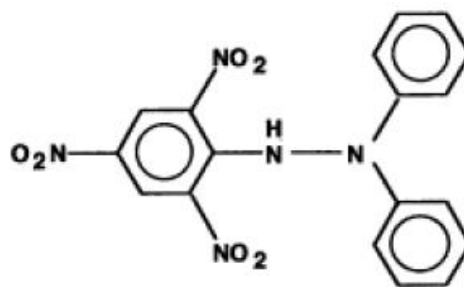
A análise da capacidade de sequestro de radicais livres foi feita utilizando o método de Blois (1958) modificado por Brand-Williams (1995) que utiliza o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH·). O radical DPPH·apresenta coloração púrpura e máximo de absorção em 517 nm. Quando a solução de DPPH·reage com uma substância que pode doar um



átomo de hidrogênio (redutor ou substância antioxidante) passa à forma reduzida e perde a coloração característica (Figura 11). Diferentes classes de produtos químicos tem apresentado estreita correlação entre as atividades sequestradora de DPPH e antioxidante determinada em modelos biológicos e outros não biológicos. Logo, o ensaio de atividade sequestradora do radical DPPH se apresenta como um teste de predição de potencial atividade antioxidante. Os resultados são apresentados comumente como a concentração (massa) de substrato que sequestra 50 % do radical DPPH, (%  $CS_{50}$ , em  $\mu\text{g/mL}$ ), (Molineux, 2004; Brand-Williams et al., 1995).



2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
(Radical livre)



2,2-difenil-1-picril-hidrazina  
(Não Radical)

**Figura 11. Estruturas das formas radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e sua forma reduzida.**

#### *Ensaio preliminar*

Foi feito um ensaio preliminar para determinação da faixa de concentração de cada extrato na qual se tem uma resposta linear da concentração em função da absorbância e que por tanto, permite estimar a %  $CS_{50}$ . Para isso aplicou-se a metodologia indicada:

- Preparo das amostras: Os extratos foram preparados na concentração de 1,0 mg / mL em metanol grau HPLC. A partir desta solução de 1,0 mg / mL foram feitas duas diluições, uma de 0,1 e outra de 0,01 mg / mL, para cada extrato.
- Preparo da solução de DPPH: Foi preparada uma solução de DPPH em metanol grau HPLC na concentração de 0,2 mg / mL. A solução foi preparada no momento da análise.
- Metodologia: 2,5 mL de cada amostra foram adicionados a 1,0 mL da solução de DPPH. A absorbância de cada solução foi lida em 518 nm em espectrofotômetro Femto 800 XI após 30 minutos de incubação em ausência de luz. Com os valores da absorbância estimou-se a faixa de trabalho, que consistiu em uma série de diluições (pelo menos cinco diluições) para cada extrato.

#### *Determinação da atividade antioxidante*

- Preparo de amostras: Os extratos metanólicos de cada fruto foram diluídos em cinco concentrações em triplicata, que variaram de 1,000 a 0,0125 mg / mL, dependendo da faixa de concentração obtida no ensaio preliminar.
- Preparo do branco: como branco utilizou-se 2,5 mL da solução mais concentrada de cada sequência de diluição.
- Controle positivo: Utilizou-se a quercetina como padrão de referência da atividade antioxidante. Para isso foram preparadas soluções metanólicas de quercetina de 20; 10; 5,0; 2,5 e 1,25 µg / mL por diluições sucessivas a partir de uma solução-mãe de 1,0 mg / mL.

- Controle negativo: como controle negativo foi utilizado 2,5 mL de metanol grau HPLC.
- Solução de DPPH: Foi preparada uma solução de DPPH· em metanol na concentração de 0,2 mg / mL. A solução foi preparada no momento da análise.
- Metodologia: 2,5 mL de cada amostra e controles foram adicionados a 1,0 mL da solução de DPPH·. A absorvância de cada solução foi lida em 518 nm em espectrofotômetro Femto 800 XI após 30 minutos de incubação em ausência de luz.
- Cálculo da atividade antioxidante: As absorvâncias em 517 nm foram convertidas em porcentagem da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH· (%CS) usando a seguinte fórmula (Eq. 01).

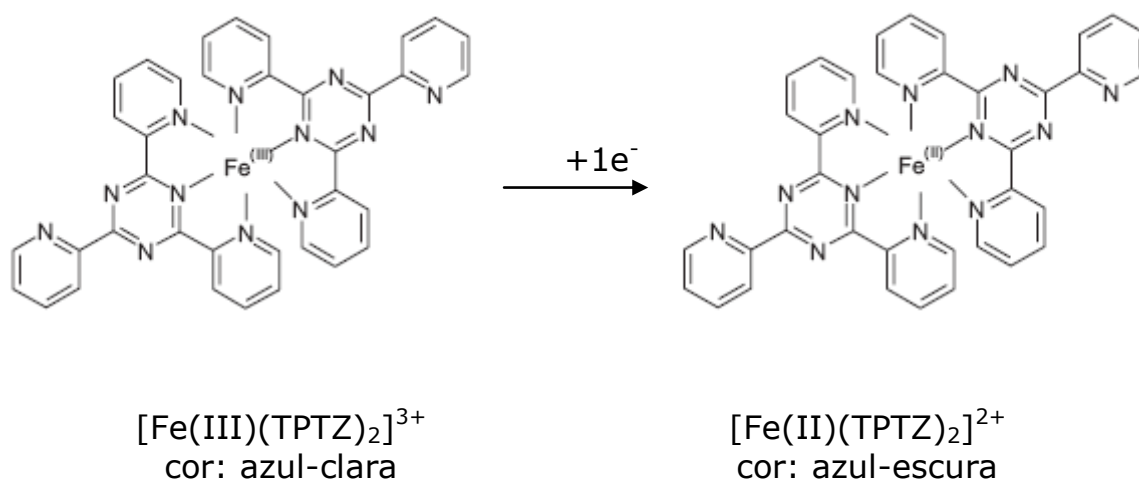
$$\%CS = 100 - \left( \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100}{A_{\text{controle}}} \right) \quad (01)$$

Com os valores de % CS calculados foram construídos gráficos da %CS para cada série em função da concentração e dessa forma obteve-se a equação da reta para o cálculo da %CS<sub>50</sub> (µg / mL).

#### 3.14.4. Teste da atividade antioxidante pela capacidade redutora do Ferro - Fe<sup>3+</sup>- (FRAP)

O método FRAP (“ferric reducing/antioxidant power assay”), determina a capacidade redutora de Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup> das substâncias antioxidantes, via avaliação da redução do complexo [Fe<sup>3+</sup>(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> (ferritripiridiltriazina) a ferroso-tripiridiltriazina [(Fe<sup>2+</sup>-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (Figura 12). A reação é observada pela coloração azul do complexo [Fe<sup>2+</sup>-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> com um máximo de absorção em

595 nm (Benzi, et al., 1996; Luximon-Ramman, 2002). Os valores são expressos em mM de  $\text{Fe}^{2+}$  por g de peso seco.



**Figura 12. Estruturas do TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe (II) e Fe (III).**

- Preparo da curva de calibração de sulfato ferroso ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): A partir de uma solução de sulfato ferroso na concentração 2 mM foram preparadas soluções de 1000, 500, 250 e 125  $\mu\text{M}$ .
- Preparo das amostras: Foram preparadas soluções de cada extrato em MeOH grau HPLC na concentração de 1,0 mg/mL.
- Preparo dos reagentes: O reagente FRAP consiste na mistura de uma solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM, uma solução de TPTZ [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] 10 mM e uma solução de tampão de HOAc/ NaOAc 0,3 M pH 3,6 na proporção 1:1:10.
- Metodologia: 100  $\mu\text{L}$  da amostra, em triplicata, foram transferidos para um frasco, depois adicionados 300  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q seguido de 3,0 mL do reagente complexante FRAP. Após 4 minutos de incubação à temperatura

ambiente foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro Femto 800 XI em 593 nm.

➤ Cálculo da concentração de  $\text{Fe}^{2+}$ : Os valores da concentração em  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  foram obtidos por interpolação dos valores de absorbância dos extratos na curva de calibração de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Os valores de capacidade de redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  são expressos em  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  extrato seco.

### 3.14.5 Teste de atividade larvicida

O teste de atividade larvicida foi realizado no Laboratório de Malária CPCS / INPA, pela Dra. Ana Cristina Pinto, sob responsabilidade do Dr. Wanderli Pedro Tadei, com objetivo de avaliar a letalidade das larvas dos mosquitos de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, quando expostos a extratos metanólicos dos frutos e frações provenientes de partições desses extratos.

#### 3.14.5.1 Teste de letalidade para as larvas de *Aedes aegypti*

Os ovos de *A. aegypti* são colocados em água para incubar por 3-4 dias. A seguir, 10 larvas (3º estágio) são separadas em copinhos descartáveis com alimento (composto de farinha de peixe com pó de fígado) e 10 mL de água de torneira, em triplicata.

As amostras são então dissolvidas em DMSO ou Tween-80 (dependendo da polaridade das substâncias) numa concentração de 50 mg / mL. Desta solução, 100  $\mu\text{L}$  (concentração de DMSO 1%) são transferidos para os copos descartáveis, alcançando um volume final de 10 mL e concentração final de 500  $\mu\text{g}$  / mL. O controle negativo é preparado analogamente com água

de torneira e DMSO na concentração final de 1 %, como controle positivo utiliza-se padrão de temefós. Cada experimento é preparado em triplicata e comparado com o controle negativo após 24 h e 48 h de incubação a 26–27 °C. (Pohlit *et al.*, 2004) Os valores de DL<sub>50</sub> são calculados a partir das diluições sucessivas de 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL, e análise de Probit usando POLOPC.

#### 3.14.5.2 *Teste de letalidade para as larvas de Culex quinquefasciatus*

A metodologia para determinação da letalidade das larvas de *Culex*, é a mesma utilizada para *Aedes aegypti*, apenas utilizando-se as larvas de *Culex quinquefasciatus*.

#### 3.14.6 *Testes de inibição enzimática*

##### 3.14.6.1 *Teste de inibição da enzima lipoxigenase*

Lipoxigenase é uma enzima que catalisa a régio- e estereo-específica oxigenação de ácidos graxos poli-insaturados contendo um sistema pentadienico 1 (Z), 4 (Z), tal como ácido linoleico e ácido araquidônico, em seu 1-hidroperoxi-1(E), 4(Z)-pentadieno. O metabolismo do ácido araquidônico através da rota da lipoxigenase gera vários lipídios biologicamente ativos que tem importante papel na inflamação. A busca por novos inibidores da enzima lipoxigenase são benéficos não apenas no tratamento da inflamação, mas também no combate a várias outras doenças relacionadas tal como trombose, artrite, asma brônquica e progressão de tumores. (Ngoc *et al.*, 2008)

Torna-se importante verificar a inibição dessa enzima já que o patauá e bacaba são apontados como frutos utilizados no tratamento de inflamações brônquicas e asma.

Para o teste foi utilizada a metodologia descrita em Aziz *et al.*, 2004, com as modificações descritas em Ngoc *et al.*, 2008. A mistura reacional foi preparada adicionando-se 470 µL de 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH = 8,0), 10 µL da amostra a ser testada na concentração de 10 mg/mL para extrato e 1 mg/mL para substância isolada, 10 µL da solução de ácido linoleico (conc. Final 40µM), 10 µL de lipoxigenase (100.000 U/mL). A mistura foi homogeneizada e incubada por 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a absorção foi medida num espectrofotômetro de ultravioleta no comprimento de onda de 234 nm no período de 0 a 5 min. Anotando-se a absorbância no tempo 0 min e no tempo 5 min. calculando-se a variação de absorbância. Como branco foi utilizado o meio reacional sem enzima, como controle negativo foi utilizado o meio reacional, 10 µL de DMSO sem composto teste, e como controle positivo utilizou-se o meio reacional e 10 µL de quercetina.

O percentual de inibição foi medido utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\Delta A \text{ controle} - \Delta A \text{ amostra}}{\Delta A \text{ controle}} \times 100$$

$\Delta A$  controle

Foram testados os extratos metanólicos de *Oenocarpus bataua*, *Endopleura uchi*, *Oenocarpus bacaba* e *Leopoldinia piassaba*.

### 3.14.6.2 Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase

O ensaio da inibição enzimática da enzima acetilcolinesterase foi avaliada segundo a metodologia descrita por Elmann *et al.* (1961), adaptada por Rhee *et al.*, (2001). O ensaio foi realizado para os extratos metanólicos dos frutos e a substância isolada piceatanol.

As amostras foram eluídas em CCD utilizando-se  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (8:2) (em duplicata). A seguir uma das placas foram reveladas com anisaldeído e a outra foi pulverizada com a mistura (1:1) do reagente de Ellman (ácido 5,5' – ditiobis-2-nitrobenzóico, DTNB) 1mM em tampão Tris – HCl 50Mm, pH = 8,0 e uma solução de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mM em tampão de Tris – HCl 50Mm, pH = 8,0. Após 5 min, pulverizou-se a placa de CCD com a solução de enzima acetilcolinesterase 1000 U/mL no mesmo tampão. Após 10 min, a inibição foi constatada pela ausência de cor amarela e surgimento de halo branco. Como padrão positivo foi usado a eserina (também conhecida como fisostigmina, alcaloide utilizado comercialmente como inibidor desta enzima).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudos ponderais dos frutos

Os frutos foram despulpados e o percentual de casca, polpa e sementes foi medido, este percentual é importante para verificar qual das partes do fruto é mais promissora para uma produção de óleo em larga escala. Este estudo encontra-se na tabela 02.

**Tabela. 02 Estudo ponderal dos frutos**

Fruto	Partes do fruto	Massa (g)	(%)
Bacaba 269 frutos	Inteiro	290,8	-
	Polpa e casca	212,1	72,89
	Sementes	78,64	27,01
Uxi 26 frutos	Inteiro	1.236	-
	Polpa e casca	906,3	73,30
	Semente	326,9	26,44
Piaçava 90 frutos	Inteiro	4.292	-
	Polpa	1.280	29,83
	Casca	519,2	12,09
	Semente	2.492	58,06
Patauá 20 frutos	Inteiro	264,6	-
	Polpa	31,35	13,15
	Casca	46,22	17,46
	Semente	169,1	63,87

Neste estudo observa-se que a bacaba e uxi quando considerados os pesos de casca e polpa obtiveram os maiores percentuais de 72,9 e 73,3%, enquanto que os outros frutos apresentaram maior percentual de sementes. Sendo que os resultados encontrados para o patauá são semelhantes aos descritos por Cavalcante (1991), que mostra um percentual de casca de 17,2%, polpa 18,1% e semente 64,6%.

## 4.2 Teor percentual de água

Foi medido o teor percentual de água nas polpas e sementes dos frutos, dado que é importante para verificar o quanto o fruto é promissor na produção de óleo e outras vitaminas. Verifica-se que a quantidade de água em todas as polpas é maior que a quantidade de óleo nos frutos (tabela 03). O teor de óleo extraído do material fresco foi calculado com base no óleo extraído a frio e em liquidificador, este tipo de extração foi realizado para evitar a perda de substâncias termo- e foto-sensíveis. Essas extrações foram processadas levando-se em consideração a quantidade de água presente na polpa, a acetona foi utilizada como primeiro solvente na extração por ser a acetona um solvente de média polaridade e miscível em água. Por esse motivo, ocorre uma maior facilidade da interação da acetona com as fibras da polpa para extração de componentes. O hexano foi utilizado logo a seguir para extração do óleo, já que a acetona sendo miscível com hexano facilita a extração de lipídeos da célula vegetal. O extrato acetônico foi particionado com hexano, para extração de óleo presente nesse extrato. Os valores de percentual obtidos para o óleo de bacaba, patauá, e uxi-amarelo não se relacionam com os valores apresentados pela literatura. Por exemplo, Rodrigues *et al.*, (2010) mostram um teor percentual de óleo para patauá de 41,8% em peso fresco, Montúfar (2010) aponta 51,6% em peso seco. Sendo que Rodrigues não fala sobre o processo de extração do óleo, e Montúfar usa  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e  $\text{CHCl}_3$  para extração de óleo, podendo extrair outros componentes além dos lipídicos. Lubrano e Robin (1994) mencionam 5,4% em peso seco, utilizando-se uma única extração com hexano em Soxhlet por duas horas, enquanto nesta análise obtivemos 14,2%

de teor em peso seco. Para bacaba, Lubrano e Robin (1994) apontam 6,6% em peso seco, Montúfar (2010) 3,16% em peso seco e Pinto (1955) um percentual de 33%, enquanto para esta análise obtivemos 38,6% de teor percentual de óleo em peso seco. Marx *et al.*, (2002) aponta 14,81% de óleo no uxi, em nossa análise obtivemos 22,6% em peso seco (tabela 04).

**Tabela. 03 Teor percentual de água**

Fruto	Parte do fruto	Material fresco (g)	Material seco (g)	Teor (%) água
Patauá	Polpa	104,7	86,52	17,40
	Semente	6.173	4642	24,80
Bacaba	Polpa	85,41	51,93	39,20
	Semente	59,14	36,70	37,94
Uxi	Polpa	206,1	141,0	31,59
	Semente	225,4	161,3	28,44
Piaçava	Polpa	58,09	19,79	65,93
	Semente	96,04	44,58	46,41

**Tabela. 04 Teor percentual de óleo extraído de material fresco e seco**

Fruto	Parte do fruto	Material fresco (g)	Material seco (g)	Teor (%) óleo peso fresco	Teor (%) óleo peso seco
Patauá	Polpa	104,7	86,52	15,41%	14,21%
Bacaba	Polpa	85,41	51,93	12,35%	38,62%
Uxi	Polpa	206,1	141,0	16,98%	22,60%
Piaçava	Polpa	58,09	19,79	8,693%	16,24%

### 4.3 Preparação de Extratos

Os frutos foram despulpados e armazenados em freezer. A polpa fresca dos frutos foi extraída a frio com acetona e posteriormente particionada com hexano, AcOEt e  $\text{CHCl}_3$  à frio para conservação de substâncias termo sensíveis como os carotenóides. O teor de extrativos, em relação à polpa fresca, e frações encontram-se na tabela 05:

**Tabela 05. Teor de extrativos das extrações e partições**

<b>Fruto</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Teor (%)</b>
Patauá (468,2g)	Ext. Hex. Liquid.	69,90	14,93
	Part. Fr. aquosa	48,97	10,46
	Part. Fr. AcOEt	1,191	0,2544
Uxi (326,8g)	Ext. Hex. Liquid.	55,47	16,98
	Part. Fr. aquosa	7,432	2,274
	Part. Fr. CHCl <sub>3</sub>	0,3234	0,09897
Bacaba polpa (212,1g)	Ext. hex. Liquid.	26,20	12,35
	Part. Fr. Aquosa	7,481	3,527
	Part. Fr. CHCl <sub>3</sub>	0,1562	0,07365
Piaçava fruto (200,0g)	Ext. Hex. Liquid.	17,47	8,735
	Part. Fr. aquosa	2,371	1,185
	Part. Fr. CHCl <sub>3</sub>	0,08234	0,04117
Piaçava vinho (200 mL)	Ext. Hex. Liquid.	24,40	12,20
	Part. Fr. Aquosa	3,281	1,641

Verificou-se que a polpa de uxi foi a que apresentou maior percentual de óleo extraído de 16%, seguida por patauá com 14,6% de óleo extraído. Verificou-se também que 200 mL de vinho de piaçava apresentam 24,4g e 12,2 % de óleo, um alto teor para o consumo na forma de vinho.

#### 4.3.1 Extrações por Soxhlet

A polpa e semente dos frutos foram extraídas em aparelhagem do tipo Soxhlet para os testes de atividade biológica e comparação de componentes químicos. O teor de extrativos foi calculado tanto para os extratos hexânicos, quanto para os extratos metanólicos. (Tabela 06)

**Tabela 06. Teores de extração em Soxhlet**

<b>Fruto</b>	<b>Parte do fruto</b>	<b>Massa de serragem (g)</b>	<b>Extrato Hex (g)</b>	<b>Extrato MeOH (g)</b>	<b>Teor (%) Hex</b>	<b>Teor (%) MeOH</b>
<b>Patauá</b>	Polpa	235,1	33,40	46,85	14,2	19,9
	Semente	443,8	0,81	43,80	0,18	9,87
<b>Bacaba</b>	Polpa	120,5	46,51	5,660	38,6	4,69
	Semente	50,01	4,83	3,771	9,66	7,54
<b>Uxi</b>	Polpa	141,0	31,94	2,450	22,6	1,74
	Semente	1,415	0,053	0,370	3,74	26,6
<b>Piaçava</b>	Polpa	70,73	11,44	4,391	16,2	6,22
	Semente	242,5	15,26	5,141	6,29	2,12

Verificou-se que a polpa de bacaba foi a que apresentou maior percentual de óleo extraído de 38,6%, seguida pela polpa de uxi com 22,6%. Quanto ao extrato metanólico as sementes de uxi apresentam maior percentual de componentes extraídos com 26,6%, seguida pela polpa de patauá com 19,9%.

#### **4.4 Análises da composição de ácidos graxos**

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo foi realizada através da comparação com os tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), obtidos em duas colunas: apolar e polar. Tabela 07.

**Tabela 07 – Tempos de retenção dos padrões de FAME analisados por CG-FID**

Ácidos graxos	Cadeia	t <sub>R</sub> (min)	
		Col. Apolar	Col. Polar
Laúrico	C 12:0	6,79	5,56
Mirístico	C 14:0	11,98	8,64
Miristoléico	C 14:1 cis-9	11,52	9,49
Palmítico	C 16:0	24,74	15,08
Palmitoléico	C 16:1 cis-9	22,64	16,26
Esteárico	C 18:0	57,16	27,49
Cis-vaccênico	C 18:1 cis-11	51,33	31,93
Oleico	C 18:1 cis-9	50,80	31,61
Eláídico	C 18:1 cis-12	53,51	33,42
Linoleico	C 18:2 cis-9, 12	49,13	36,98
α-linolênico	C 18:3 cis-9,12,15	49,51	45,80
γ-linolênico	C 18:3 cis-6,9,12	44,75	40,49
Araquídico	C 20:0	70,59	61,55
Eicosenóico	C 20:1 cis-11	69,76	62,98
Nervônico	C 24:1	77,09	74,55

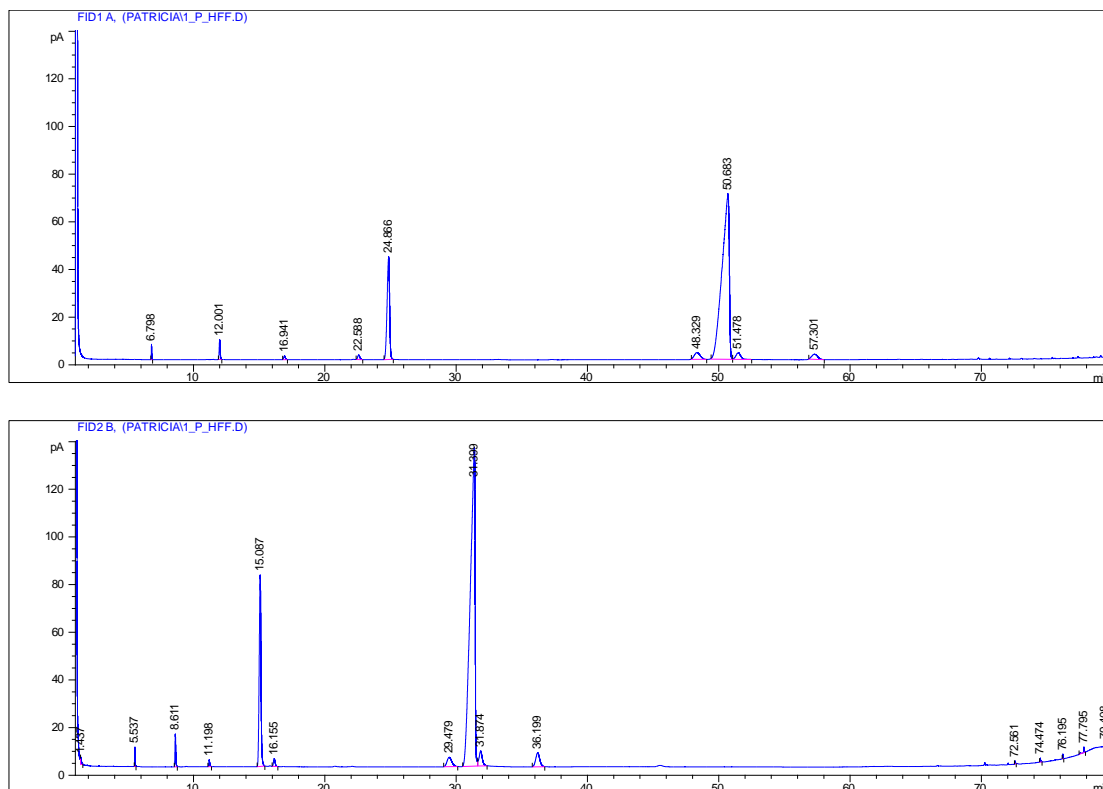
#### 4.4.1 Cadeia graxa de Patauá

Foi possível identificar 98,3% dos picos de ésteres metílicos. Os percentuais de cadeia graxa nas tabelas são o valor médio das áreas dos picos identificados nos cromatogramas obtidos nas duas colunas. Tabela 08.

**Tabela 08 – Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados**

<b>Ácidos graxos identificados</b>	<b>t<sub>R</sub> (min) Coluna apolar</b>	<b>t<sub>R</sub> (min) Coluna polar</b>	<b>% Área média</b>
Ácido oleico (C18:1 cis-9)	50,683	31,399	74,8
Ácido palmítico (C16:0)	24,866	15,087	16,2
Ácido cis-vaccênico (C18:1 cis-11)	51,478	31,874	1,98
Ácido esteárico (C18:0)	57,301	29,479	1,92
Ácido linoleico (C18:2 cis-9,12)	48,329	36,199	1,25
Ácido mirístico (C14:0)	12,001	8,611	1,22
Ácido palmitoléico (C16:1 cis-9)	22,588	16,155	0,61
Ácido láurico (C12:0)	6,798	5,537	0,40
Total			98,4

O óleo de patauá apresentou em sua composição de cadeia graxa um alto índice de ácido oléico de acordo com a literatura, 74,8% de ácido oleico (C18:1 cis-9) e 16,2% de ácido palmítico (C16:0), 1,98% de ácido cis-vaccênico (C18:1 cis 11), 1,92% de ácido esteárico (C18:0), 1,25% de ácido linoleico (C18:2 cis-9,12) 1,22% de ácido mirístico (C14:0) e 0,61% de ácido palmitoléico (C16:1 cis-9) e 0,40% de ácido láurico (C12:0). O ácido cis-vaccênico é o terceiro mais abundante com 1,98%, e foi identificado apenas uma vez na literatura em amostras de óleo de patauá do Peru e Guiana Francesa (Montúfar, 2010), sendo esta a primeira vez que é identificado no óleo do patauá amazônico. O ácido láurico foi identificado também pela primeira vez no óleo de patauá amazônico, sendo que a literatura relata a presença dele apenas uma única vez em amostra de óleo de patauá proveniente da Colômbia. Em contrapartida o ácido  $\alpha$ -linolênico já identificado na literatura, não foi identificado nesta análise. Figura 13.



**Figura 13. Cromatogramas obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de patauá.**

#### 4.4.2 Cadeia graxa de Bacaba

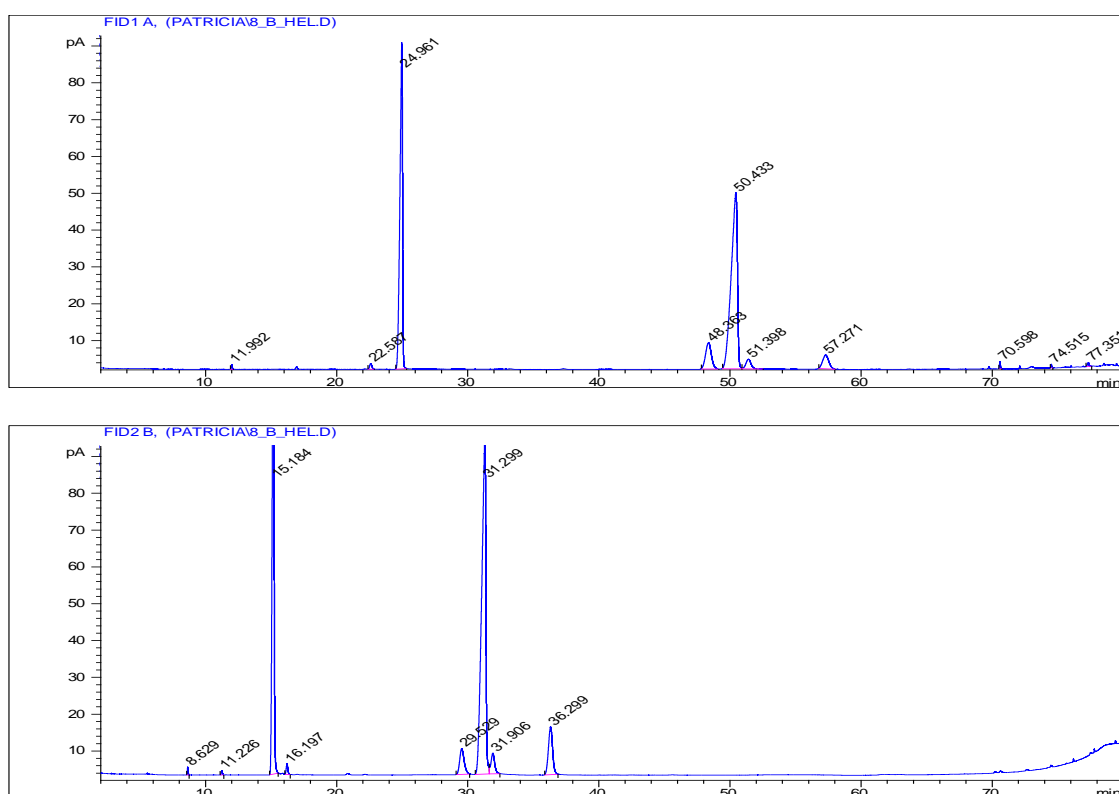
Foram identificados 99,1% dos picos de ésteres metílicos. Tabela 09.

**Tabela 09 – Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados**

Ácidos graxos identificados	$t_R$ (min) Coluna apolar	$t_R$ (min) Coluna polar	% Área média
Ácido oleico (C18:1 cis-9)	50,433	31,299	47,9
Ácido palmítico (C16:0)	24,961	15,184	37,9
Ácido linoléico (C18:2 cis-9,12)	48,363	36,299	6,65
Ácido esteárico (C18:0)	57,271	29,529	3,68
Ácido cis-vaccênico (C18:1 cis-11)	51,398	31,906	2,21
Ácido palmitoléico (C16:1 cis-9)	22,587	16,197	0,54
Ácido mirístico (C14:0)	11,992	8,629	0,20
Total			99,1



O óleo de bacaba apresentou a seguinte composição 47,9% de ácido oléico (C18:1 cis-9), 37,9% de ácido palmítico (C16:0), 6,65% de ácido linoléico (C 18:2 cis 9,12), 3,68% de ácido esteárico (C18:0), 2,21% de ácido cis-vaccênico (C18:1 cis-11), 0,54% de ácido palmitoléico (C16:1 cis-9) e 0,20% de ácido mirístico (14:0). Figura 14.



**Figura 14. Cromatogramas obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de Bacaba**

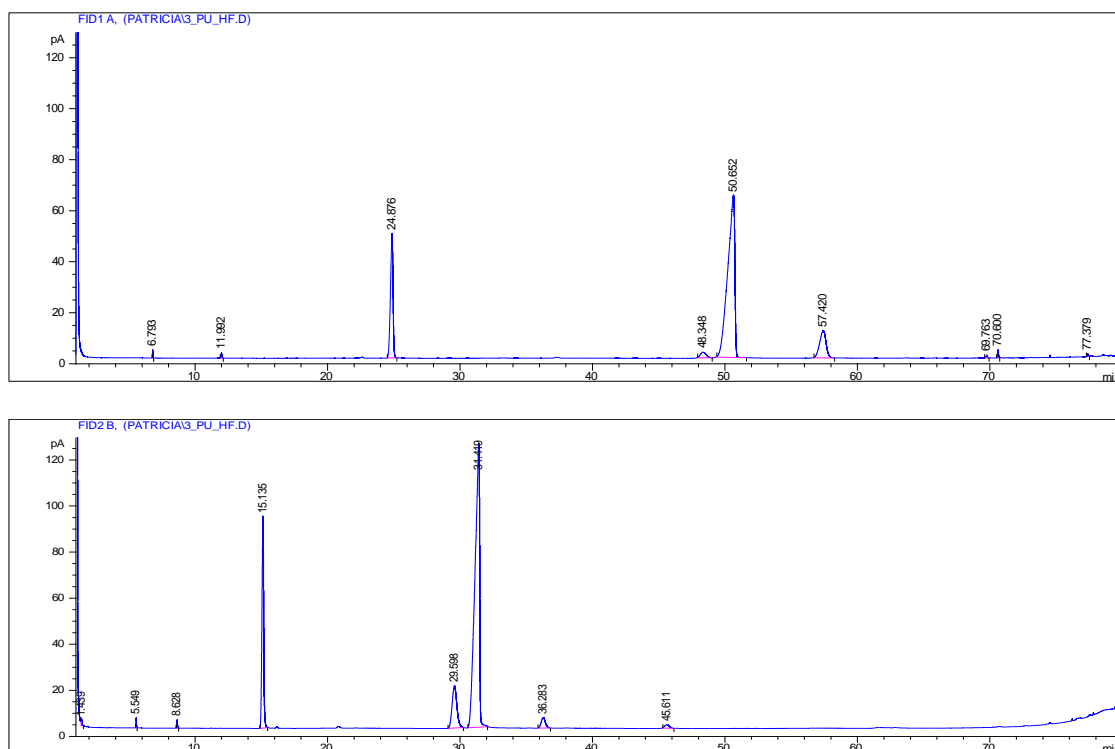
#### 4.4.3 Cadeia graxa de uxi

Foram identificados 99,4% dos picos de ésteres metílicos. (Tabela 10)

**Tabela 10 – Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados**

Ácido graxo identificado	t <sub>R</sub> (min) Coluna apolar	t <sub>R</sub> (min) Coluna polar	% Área média
Ácido oleico (C18:1 cis-9)	50,652	31,419	67,6
Ácido palmítico (C16:0)	24,876	15,135	18,9
Ácido esteárico (C18:0)	57,420	29,598	10,3
Ácido linoléico (C18:2 cis-9,12)	48,348	36,283	2,05
Ácido mirístico (C14:0)	11,992	8,628	0,31
Ácido láurico (C12:0)	6,793	5,549	0,21
Total			99,4

O óleo de uchi apresentou 67,6% de ácido oléico (C18:1-cis 9), 18,9% de ácido palmítico (C16:0), 10,3% de ácido esteárico (C18:0) e 2,05% de ácido linoléico (C18:2 cis 9,12) como majoritários, verifica-se que mesmo com um bom percentual de ácido insaturado, o nível de gordura saturada também é elevado. Apresentou ainda traços de mirístico (C14:0) e laurico (C12:0). Os ácidos linolênico e eicosanoico previstos na literatura, não foram identificados. Porém a análise mostrou a presença de ácido láurico identificado pela primeira vez no óleo de uxi. Figura 15.



**Figura 15. Cromatogramas obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de Uxi**

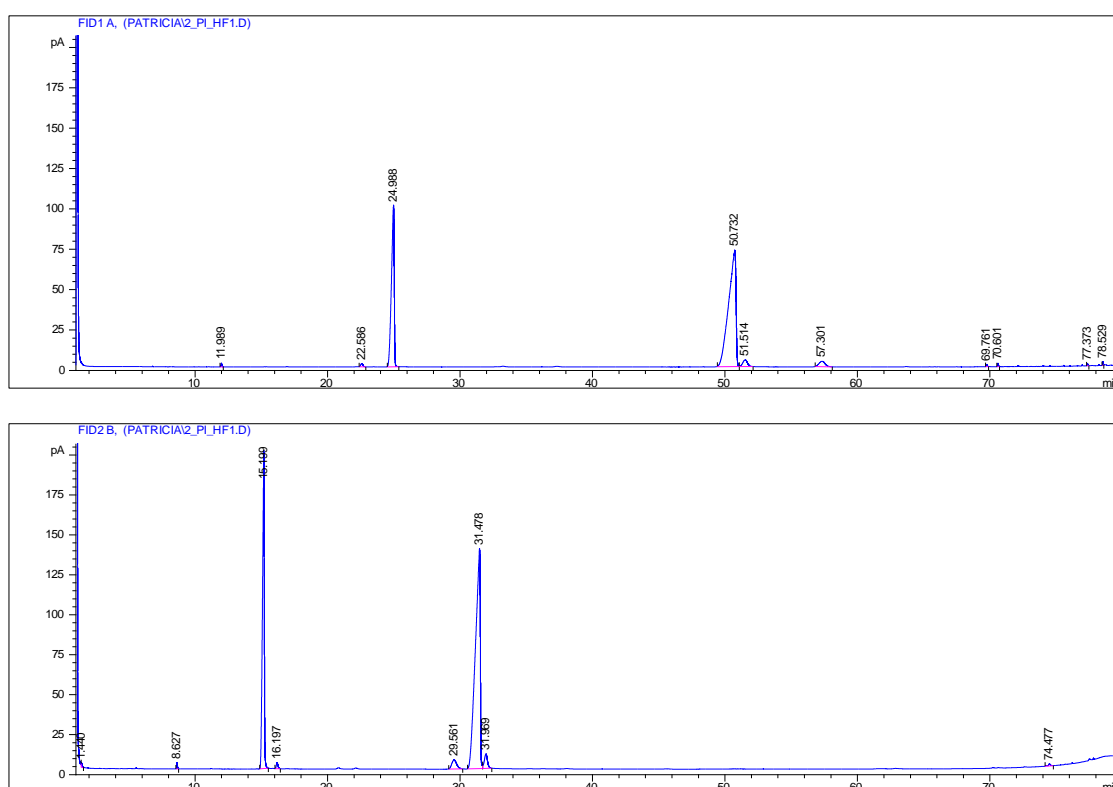
#### 4.4.4 Cadeia graxa de piaçaba

Foram identificados 99,5% dos picos de ésteres metílicos. (Tabela 11)

**Tabela 11 – Tempos de retenção observados para os ácidos graxos identificados**

Ácido graxo identificado	t <sub>R</sub> (min) Coluna apolar	t <sub>R</sub> (min) Coluna polar	% Área média
Ácido oleico (C18:1 cis-9)	50,732	31,478	61,5
Ácido palmítico (C16:0)	24,988	15,199	32,3
Ácido esteárico (C18:0)	57,301	29,561	2,4
Ácido cis-vaccênico (C18:1 cis-11)	51,514	31,969	2,3
Ácido palmitoléico (C16:1 cis-9)	22,586	16,197	0,54
Ácido mirístico (C14:0)	11,989	8,627	0,28
Ácido nervônico (C24:1)	77,373	74,477	0,25
Total			99,5

E identificou-se os seguintes ácidos graxos no óleo de piaçava: 61,5% de ácido oléico (C18:1 cis-9), 32,3% de ácido palmítico (C16:0), 2,4% de ácido esteárico (C18:0), 2,3% de ácido cis-vaccenico (C18:1 cis-11), e traços de ácido palmitoléico (C16:1 cis-9), mirístico (C14:0), ácido nervônico (C24:1), e ácido eicosenóico (C20:1 cis-11). A composição de ácidos graxos de piaçava é descrita na literatura pela primeira vez neste trabalho. Figura 16.



**Figura 16. Cromatogramas obtidos em coluna apolar e polar (FID A e FID B, respectivamente) da cadeia graxa de Piaçava.**

Em resumo a composição da cadeia graxa demonstrou um alto teor de ácido oléico no óleo de patauá, seguidos por uchi e piaçava (74, 67 e 61 % respectivamente). O ácido palmítico também apresenta um grande teor em bacaba e piassaba (37 e 32 % respectivamente). O ácido esteárico apresenta 10, 2% em uchi. A seguir a tabela 12 mostra os resultados comparativos da

composição de cadeia graxa, demonstrando que o óleo de patauá é uma potente fonte de ácido oléico e ainda um óleo que apresenta um pequeno teor de gordura saturada, confirmando a literatura que o indica como um óleo saudável comparável ao azeite de oliva.

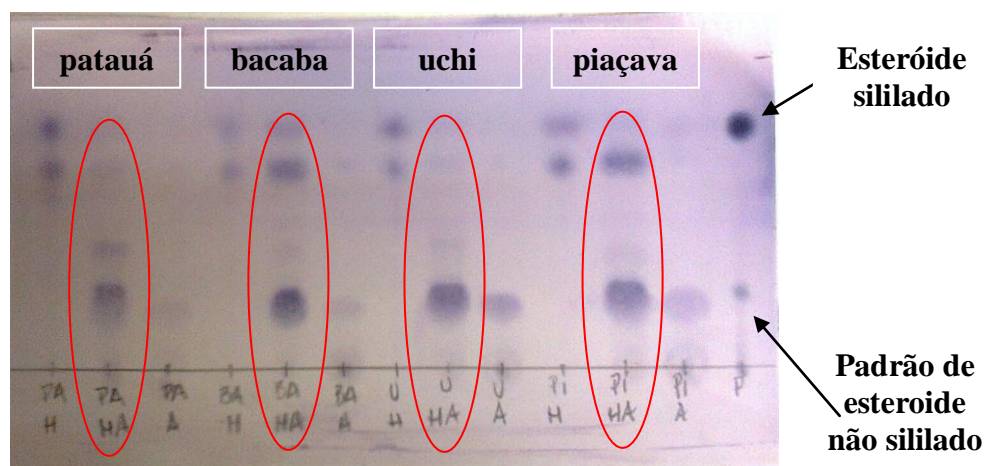
**Tabela 12. Resultado comparativo da composição da cadeia graxa dos frutos**

<b>Ácido graxo identificado</b>	<b><i>Oenocarpus Bataua</i></b>	<b><i>Oenocarpus Bacaba</i></b>	<b><i>Leopoldinia piassaba</i></b>	<b><i>Endopleura uchi</i></b>
<b>C12:0</b>	*	-	-	*
<b>C14:0</b>	1,2	*	*	*
<b>C16:0</b>	16,2	37,9	32,5	18,9
<b>C16:1</b>	*	*	*	-
<b>Cis-9</b>				
<b>C18:0</b>	2,0	3,7	2,5	10,2
<b>C18:1</b>	74,0	48,0	61,5	67,3
<b>Cis-9</b>				
<b>C18:1</b>	2,0	2,3	2,3	-
<b>Cis-11</b>				
<b>C18:2 cis9,12</b>	1,25	6,65	-	2,05
<b>C20:1</b>	-	-	*	-
<b>Cis-11</b>				
<b>C24:1</b>	-	-	*	-
<b>Somatório</b>	97,1	99,2	99,5	97,3

\* traços

#### 4.5 Composição de esteróides nos óleos das polpas

Para identificação e quantificação de esteróides o material insaponificável contendo os esteróides e triterpenos foi purificado a partir de cartucho de SEP-PAK, utilizando-se como gradiente de eluição os solventes Hex 100%, Hex/AcOEt (8:2) e AcOEt 100%. Estas frações foram analisadas por CCD utilizando-se Hex/AcOEt (8:2) como eluente. (Figura 17)



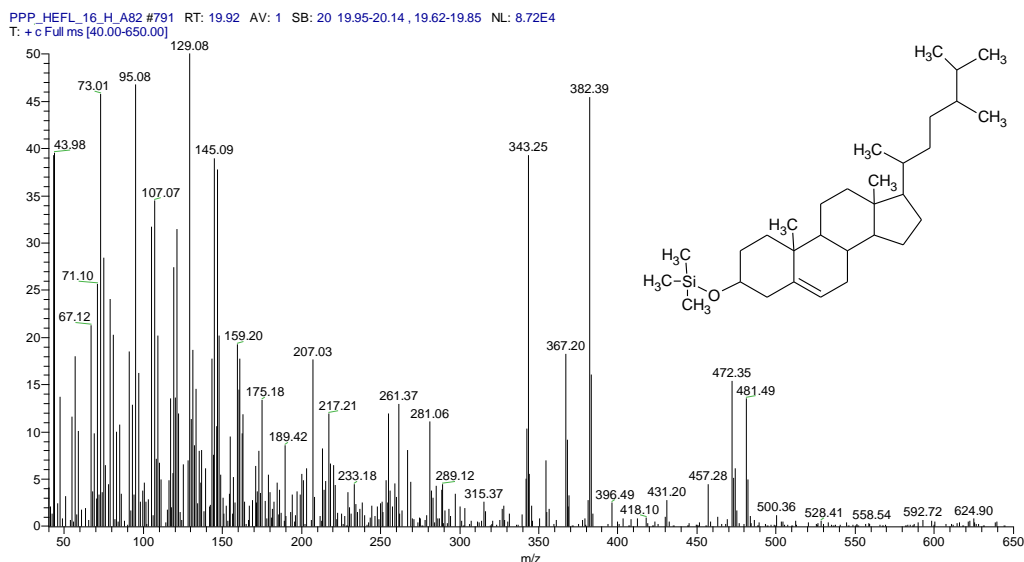
**Figura 17. Placa de CCD com frações obtidas na purificação via SEP-PAK antes da derivatização e padrão de esteroide.**

Todas estas frações foram então submetidas à derivatização com BSTFA/TMCS (1%) + Piridina (1:1), e posteriormente analisadas em CG-EM se verificando que os esteroides e triterpenos estavam presentes apenas na fração HEX: AcOEt 8:2. Os fitoesteróides e triterpenos foram então identificados observando-se o perfil de fragmentação e comparando-os com os dados das bibliotecas NIST e Adams.

#### 4.5.1 Identificação de fitoesteroides

Sete fitoesteróides foram identificados nos óleos, sendo quatro classificados como 4,4-desmetil-esteróis (com os tempos de retenção médios  $t_{R \text{ medio}}$  = 19,88; 20,15; 20,80; 20,97 min), e três como 4,4-dimetil-esteróis ( $t_{R \text{ medio}}$  = 21,61; 22,27; 21,57 min).

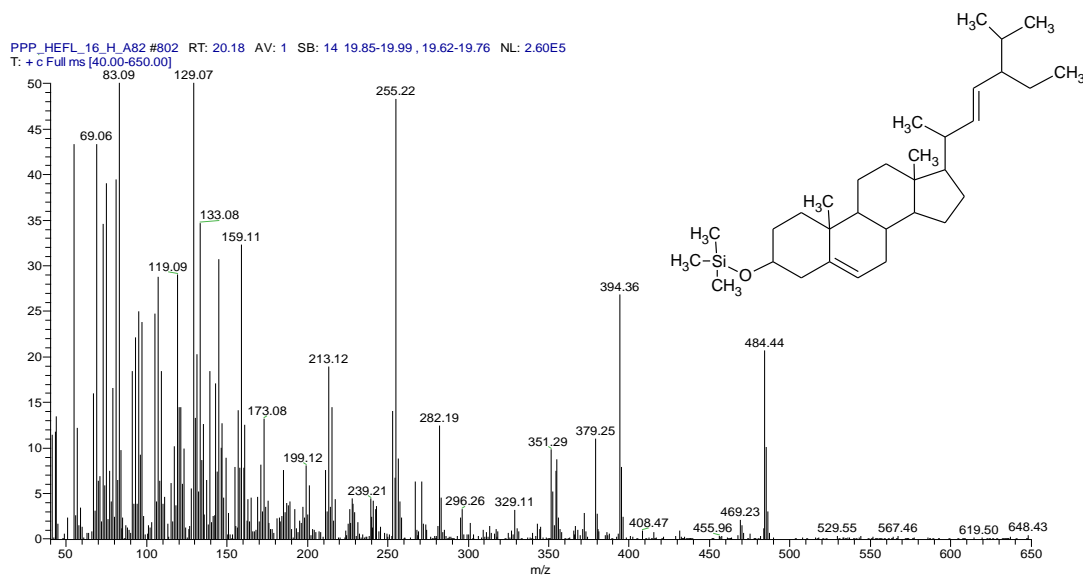
O pico em  $t_{R \text{ medio}}$  19,88 min foi identificado como campsterol, através da comparação com os dados da biblioteca digital com 83% de probabilidade e foi confirmado pelo perfil de fragmentação disposto na Figura 18.



**Figura 18 – Espectro de massas de campsterol**

Verificou-se a presença do íon molecular em  $m/z$  472,35 e também de fragmentações características em  $m/z$  457,28 pela perda de uma metila  $[M - CH_3]^+$ , em  $m/z$  382,39 pela perda do grupo trimetilsililoxil protonado  $[M - TMSOH]^+$ , em  $m/z$  343,25 pela perda referente as quebras em C1-C2 e C4-C5  $[M - TMSO - C_3H_4]^+$ , em  $m/z$  367,20 pela perda da metila C19 favorecida pela dupla em C5 e perda do grupo TMSOH  $[M - TMSOH - CH_3]^+$ .

O pico em  $t_{R \text{ medio}}$  20,15 min foi identificado como estigmasterol através de comparação com a biblioteca com uma média de 84% de probabilidade e foi confirmado pelo perfil de fragmentação apresentado na Figura 19.

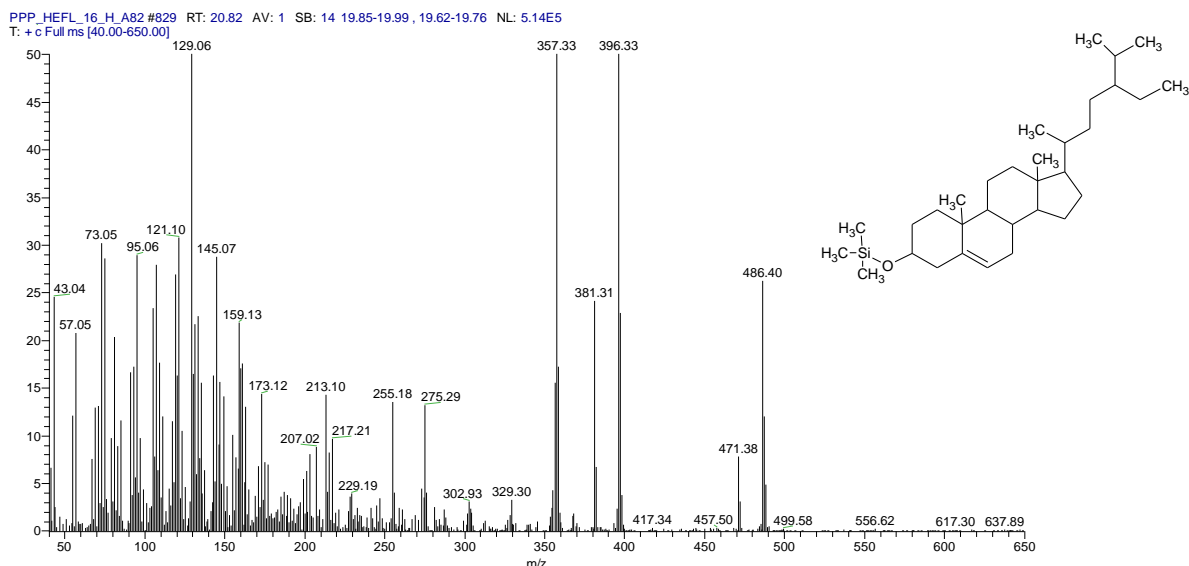


**Figura 19 – Espectro de massas de estigmasterol**

O pico do íon molecular em  $m/z$  484,44, seguido pelo  $m/z$  469,23  $[M - CH_3]^+$ ,  $m/z$  394,36  $[M - TMSOH]^+$ ,  $m/z$  379,25  $[M - TMSOH - CH_3]^+$ ,  $m/z$  255 pela perda da cadeia alquílica lateral e perda do grupo TMSOH,  $[M - C_{10}H_{19} - TMSOH]^+$  e  $m/z$  129  $[M - C_{26}H_{43}]$  pela quebra em C1-C2 e C4-C5. Os íons em  $m/z$  394, 379, 255 e 129 são apresentados por András *et al.*, (2011) como característicos de estigmasterol.

O pico em  $t_{R \text{ medio}}$  20,80 min foi identificado em comparação com a biblioteca como sendo  $\beta$ -sitosterol com uma média de 95% de probabilidade. O que foi confirmado pelo perfil de fragmentação no espectro da Figura 20.





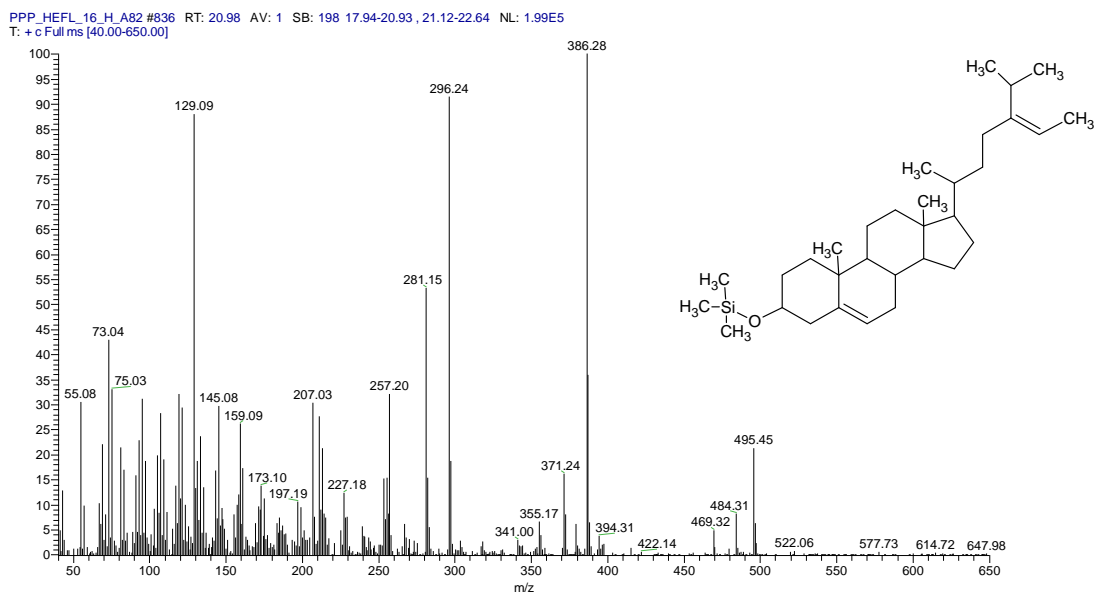
**Figura 20 – Espectro de massas de  $\beta$ -sitosterol**

O pico do íon molecular em  $m/z$  486,40 seguido pela perda de uma metila  $m/z$  471,38  $[M - CH_3]^+$ , e  $m/z$  396,33  $[M - TMSOH]^+$ ,  $m/z$  381,31  $[M - CH_3 - TMSOH]^+$ ,  $m/z$  357,33  $[M - C_3H_4 - TMSO]^+$ , pela quebra em C1 – C2 e C4 – C5,  $m/z$  255,16 pela perda da cadeia lateral e perda do grupo TMSOH e  $m/z$  213,10 pela perda da cadeia lateral com quebras em C13 – C17 e C14 – C15 e perda do grupo TMSOH,  $[M - C_{13}H_{27} - TMSOH]^+$  e  $m/z$  129  $[M - C_{26}H_{44}]^+$  pela quebra em C1-C2 e C4-C5.

Os picos em  $m/z$  396, 381, 255 e 129 também são apresentados por Andrási *et al.*, (2011), como sendo característicos de  $\beta$  – sitosterol.

O pico em  $t_{R\text{ médio}}$  20,98 min foi identificado em comparação com a biblioteca como sendo o  $\Delta^5$  – avenasterol com 63% de probabilidade em média.

O que foi confirmado pelo perfil de fragmentação no espectro da Figura 21.

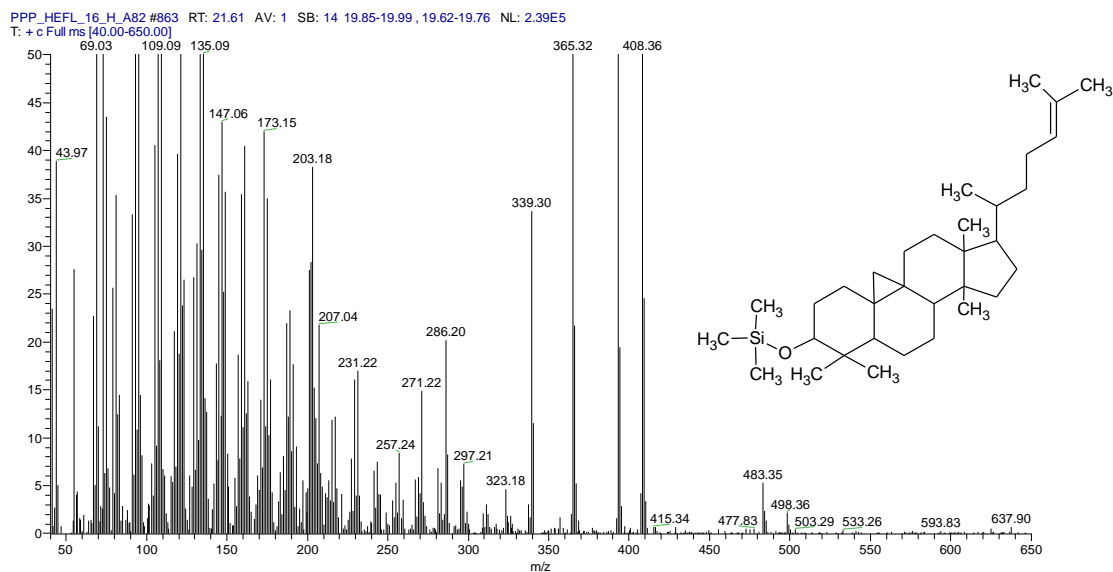


**Figura 21 – Espectro de massas de  $\Delta 5$  – avenasterol**

O pico do íon molecular em  $m/z$  484,31, seguido pela perda de metila em  $m/z$  469,32  $[M - CH_3]^+$ ,  $m/z$  394,31  $[M - TMSOH]^+$ ,  $m/z$  386,29 pela perda da cadeia lateral pela quebra C22-C23 favorecida pela dupla em C24-C28 que estabiliza o radical formado,  $[M - C_7H_{14}]^+$ . Também em  $m/z$  296,24 pela quebra da cadeia lateral em C22-C23 e perda do grupo TMSOH  $[M - C_7H_{14} - TMSOH]^+$ , em  $m/z$  281,15  $[M - C_7H_{14} - CH_3 - TMSOH]^+$ .

O pico em  $t_R$  médio 21,61 min foi identificado como cicloartenol em com a biblioteca digital com uma média de 73% de probabilidade.

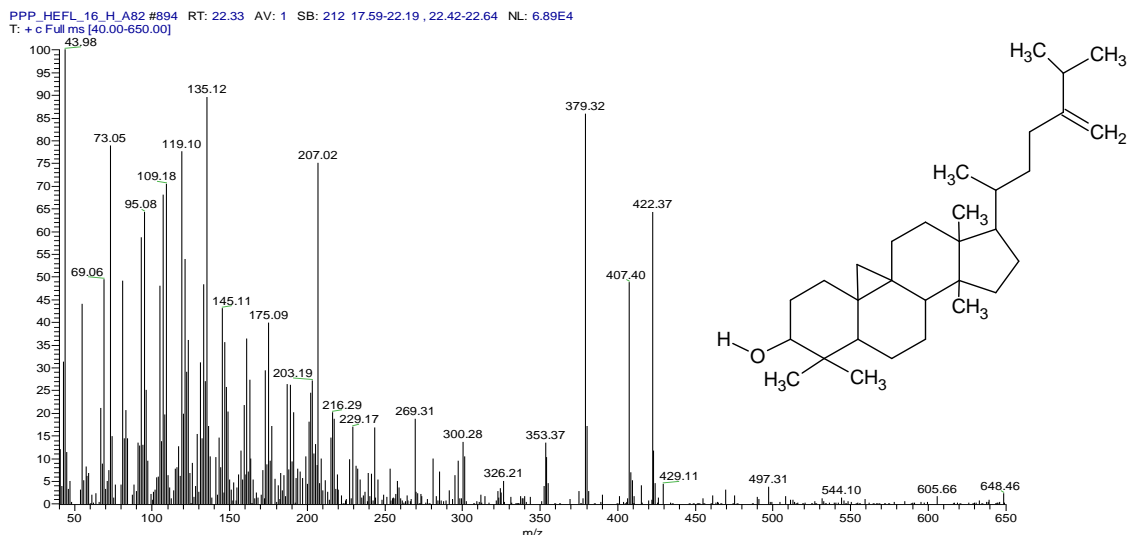
O espectro (Figura 22) com o perfil de fragmentação encontra-se abaixo:



**Figura 22 – Espectro de massas de cicloartenol**

O pico do íon molecular em  $m/z$  498,36 seguido pela perda de metila em  $m/z$  483,35  $[M - CH_3]^+$ ,  $m/z$  408,36  $[M - TMSOH]^+$ ,  $m/z$  365, pela perda dos carbonos C1, C2 e C3 junto ao grupo TMSOH pela quebra em C3-C4 e C1-C10.  $[M - C_6H_{17}SiO]^+$ ,  $m/z$  339,30 pela perda da cadeia lateral com quebra em C22-C23 e perda do grupo TMSOH,  $[M - C_5H_9 - TMSOH]^+$ .

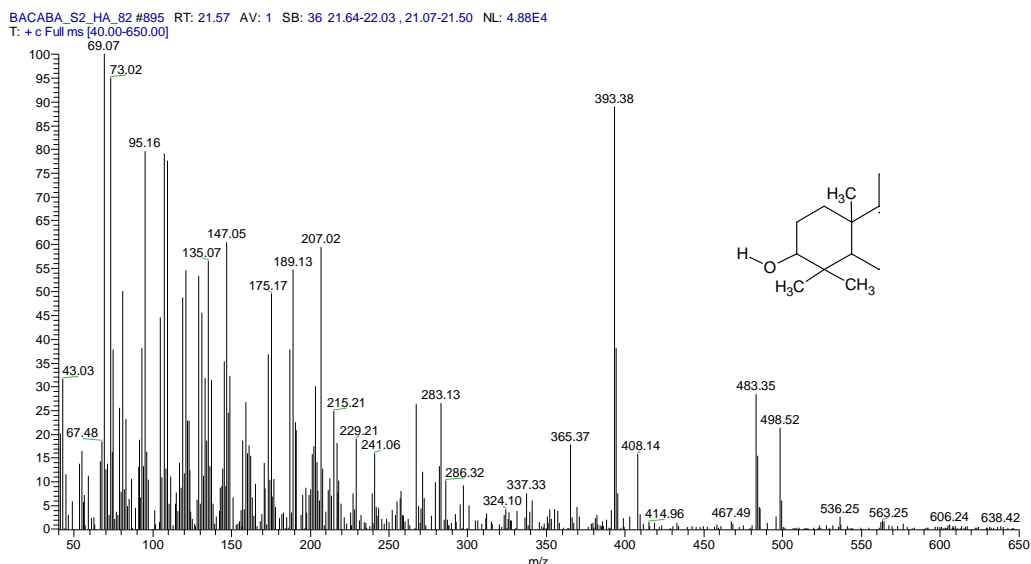
O pico em  $t_R$  medio 22,33 min foi identificado como 24-metileno-cicloartenol em comparação com a biblioteca com uma média de 50% de probabilidade. O perfil de fragmentação encontra-se na Figura 23.



**Figura 23 – Espectro de massas de 24 – metileno – cicloartenol**

O pico  $m/z$  440 é o pico do íon molecular não sililado que não aparece no espectro, no entanto, verifica-se o pico em  $m/z$  422,37 referente a perda de  $H_2O$   $[M-H_2O]^+$ , ou seja a didroxila protonada. Também possui  $m/z$  407,40 referente a perda de  $H_2O$  e um  $CH_3$   $[M-H_2O-CH_3]^+$  e  $m/z$  379,32 pela quebra de C24-C25 e perda de TMSOH  $[M-C_3H_7-TMSOH]^+$ .

Finalmente o pico com  $t_{R\text{ médio}}$  21,57 min que foi identificado pela biblioteca como eufadienol identificado apenas no óleo de bacaba com uma probabilidade de 52,5%. O perfil de fragmentação está na Figura 24.



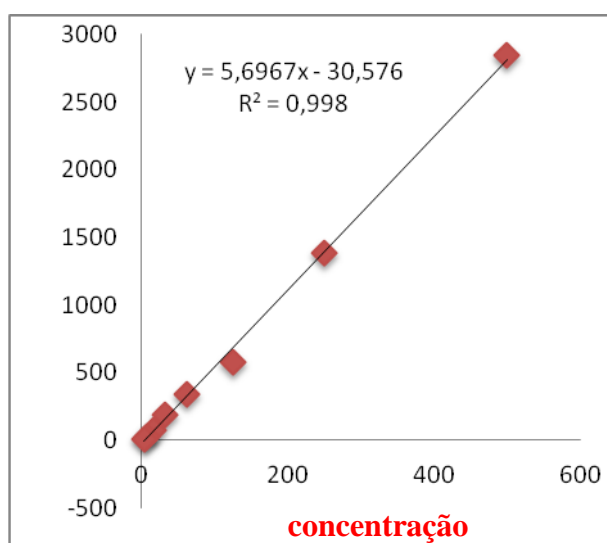
**Figura 24 – Espectro de massas de eufadienol**

O pico do íon molecular é m/z 498,52 seguido pela perda de metila em m/z 483,35, [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> e m/z 408,14, [M – TMSOH]<sup>+</sup>, m/z 398,38 [M – CH<sub>3</sub> – TMSOH]<sup>+</sup> pela perda de metila favorecida pela dupla no anel C em C9-C8. E m/z 365 pela quebra em C1-C10 e C3-C4, [M – C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> – TMSOH]<sup>+</sup>.

#### 4.5.2 Quantificação de fitoesteróides

A quantificação de fitoesteróides foi realizada utilizando-se o método do padrão interno, utilizando-se colesterol como padrão já que a presença deste não foi identificada nas amostras por ser de origem animal.

Foi construída uma curva de calibração utilizando-se concentrações de 0,5 a 0,004 µg / mL. Como pode ser visto na coluna de calibração de colesterol sililado. (Figura 25). A equação da reta desta curva foi utilizada para calcular a concentração real de colesterol injetada concomitantemente com cada amostra.

**Área do pico**

**Figura 25 – Coluna de calibração do padrão interno, o colesterol**

O esteróide majoritário em todos os frutos foi o  $\beta$ -sitosterol (41-86%).

Tabela 13.

**Tabela 13. Composição % de esteróides nos óleos dos frutos**

<b>Esteróides</b>	<b>Pataua</b>	<b>Bacaba</b>	<b>Uchi</b>	<b>Piaçava</b>
<b>campesterol</b>	5,87	6,94	5,05	9,66
<b>estigmasterol</b>	14,93	4,17	10,68	10,15
<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	31,27	71,80	53,69	63,91
<b><math>\Delta</math>5-avenasterol</b>	23,18	-	7,84	12,67
<b>eufadienol</b>	-	3,61	-	-
<b>24-metileno-cicloartenol</b>	6,12	13,46	13,17	3,59
<b>cicloartenol</b>	18,63	-	9,56	-

E a composição de esteroides foi calculada em mg por Kg de óleo. De acordo com a Tabela 14.

**Tabela 14 – Composição de esteróides nos óleos dos frutos (mg / kg óleo)<sup>a</sup>**

<b>Esteróides</b>	<b>Pataua</b>	<b>Bacaba</b>	<b>Uchi</b>	<b>Piaçava</b>
<b>Campesterol</b>	11,41 ± 0,00	10,38 ± 0,14	9,29 ± 0,00	15,36 ± 0,15
<b>Stigmasterol</b>	29,03 ± 0,01	6,24 ± 0,05	19,64 ± 1,4 x 10 <sup>-2</sup>	16,14 ± 0,31
<b>β-sitosterol</b>	60,79 ± 0,11	107,30 ± 0,01	98,78 ± 0,41	101,6 ± 0,53
<b>Δ5-avenasterol</b>	45,06 ± 1,0	-	14,43 ± 0,03	20,15 ± 0,01
<b>Eufadienol</b>	-	5,40 ± 0,00	-	-
<b>24-metileno-cicloartenol</b>	11,90 ± 0,01	20,12 ± 0,00	24,22 ± 0,30	5,71 ± 0,00
<b>Cicloartenol</b>	36,21 ± 0,01	-	17,59 ± 0,00	-

<sup>a</sup>O resultado foi expresso como valor médio de duas determinações ± desvio padrão

Observou-se que patauá apresentou o maior nível de esteroides com 194,4 mg / Kg o que equivale a 0,02% de esteroides identificados no material insaponificável, um valor inferior ao observado por Montúfar *et al.*, (2010) em estudos com o patauá coletado no Peru de 0,03% de esteróides. Para Uchi o teor de esteroides identificados é de 0,02% ou seja, 183,95 mg / Kg. No entanto, estes valores para uchi são bem contraditórios uma vez que Marx *et al.*, (2002) aponta 1378 mg / 100 g de óleo de Uchi do Pará e Costa *et al.*, (2010) aponta de 108 a 360 mg / 100g de óleo de Uchi coletado no Norte do Brasil.

Observa-se que bacaba é a que apresenta o maior nível de  $\beta$ -sitosterol com 107,3 mg por Kg de óleo, de 71,8% um dado semelhante ao exposto por Lubrano *et al.* (1994) de 72%. O mesmo ocorre para patauá com 31% de  $\beta$ -sitosterol enquanto Lubrano descreve 36% nesse fruto. O segundo fruto com maior índice de  $\beta$ -sitosterol é a piaçava com 101,6 mg por Kg de óleo o que corresponde a 63,9% do percentual de esteróides identificados no óleo do fruto. O fitoesteróide minoritário foi o campesterol sendo que para bacaba o fitoesteróide de menor composição foi o eufadienol com 3% identificado pela primeira vez nesse fruto. A composição esteroídica para piaçava é descrita pela primeira vez. Sendo que o óleo de piaçava apresenta um bom índice de  $\beta$ -sitosterol e avenasterol.

#### **4.6 Identificação e Quantificação de tocoferóis**

##### *4.6.1 Identificação de tocoferóis*

Os tocoferóis foram identificados através de comparação do tempo de retenção de padrões de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, e  $\delta$ -tocoferol com o tempo de retenção de tocoferóis identificados nas amostras eluídas no mesmo método de análise. Posteriormente foi confirmado por co-injeção das amostras com os padrões.

Tanto a injeção de padrões, quanto a injeção de amostras foram realizadas no mesmo dia. (Tabela 15)

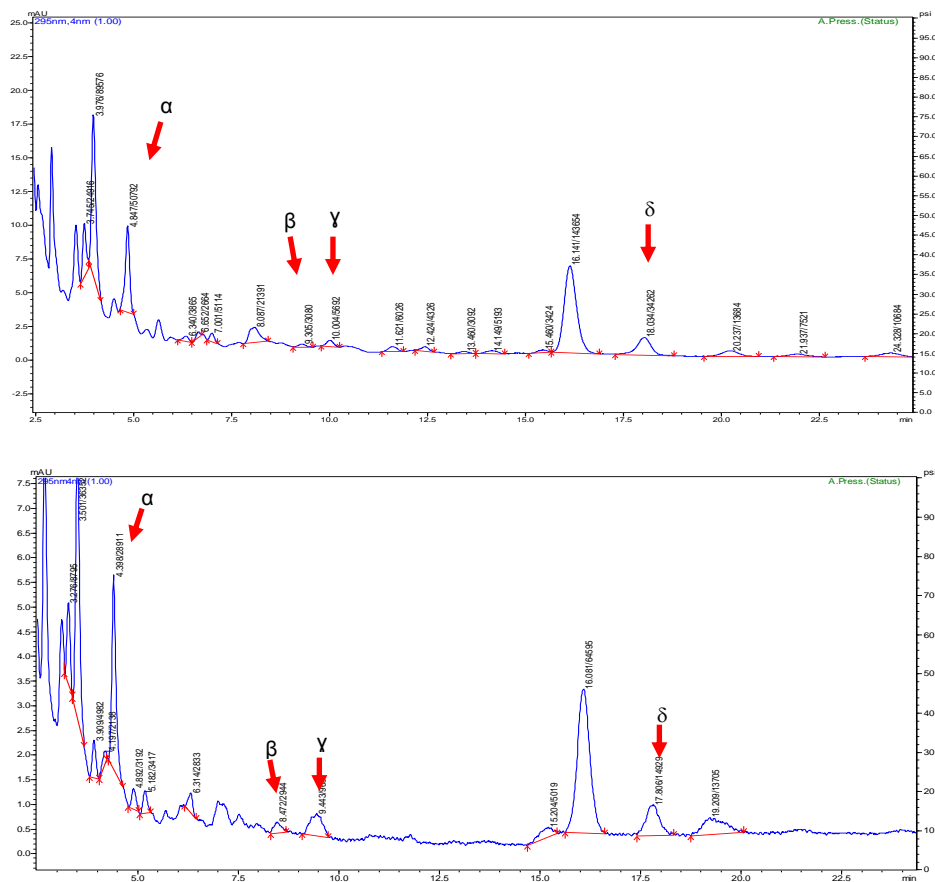


**Tabela 15. Comparação dos tempos de retenção médios obtidos para padrões de tocoferol nas amostras**

Amostras	$t_R$ médio (min)			
	$\alpha$ -tocoferol	$\beta$ -tocoferol	$\gamma$ -tocoferol	$\delta$ -tocoferol
<b>Padrões</b>	<b>6,19</b>	<b>7,94</b>	<b>8,85</b>	<b>18,32</b>
<b>Patauá</b>	<b>4,85</b>	<b>9,32</b>	<b>10,08</b>	<b>18,53</b>
<b>Uchi</b>	<b>nd</b>	<b>9,47</b>	<b>10,05</b>	<b>17,02</b>
<b>Piaçava</b>	<b>nd</b>	<b>9,56</b>	<b>10,37</b>	<b>19,93</b>
<b>Bacaba</b>	<b>6,51</b>	<b>9,59</b>	<b>10,41</b>	<b>20,00</b>

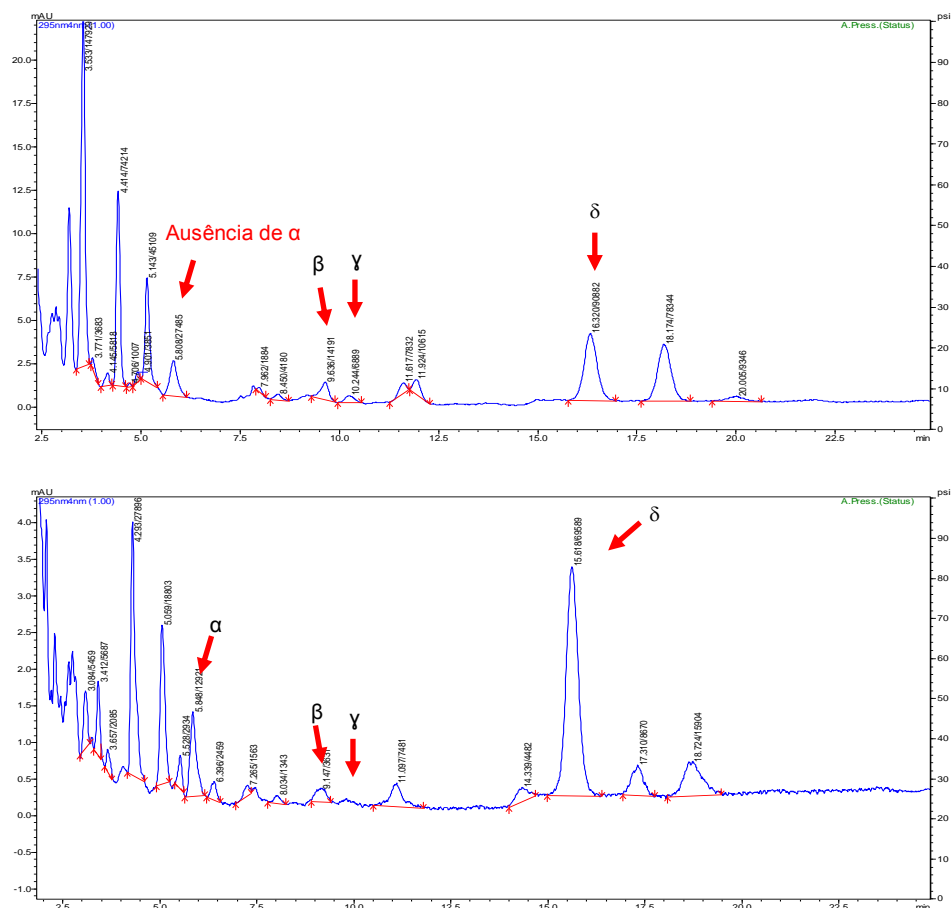
Os tempos de retenção apresentados na tabela 09 são o valor médio obtido de triplicatas de injeções dos padrões e duplicatas das amostras. Verifica-se uma variação de 4 a 6 min. nos tempos de retenção obtidos para  $\alpha$ -tocoferol nas amostras, uma variação que pode ser explicada pelo efeito da matriz. Para  $\beta$ -tocoferol houve uma variação de 7- 9 min, para  $\gamma$ -tocoferol de 8-10 min, e  $\delta$ -tocoferol de 17 a 20 min. Os cromatogramas obtidos com a co-injeção de amostras e padrões encontram-se nas figuras a seguir.

Verifica-se na figura 26 com o cromatograma obtido para amostra de material insaponificável de patauá, que foi identificada a presença de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol. Verifica-se o mesmo comportamento de absorbância obtido para os padrões, em que o  $\alpha$ -tocoferol apresenta uma absorção forte em 295nm, diferentemente dos outros padrões que apresentam uma absorção menos intensa neste comprimento de onda.



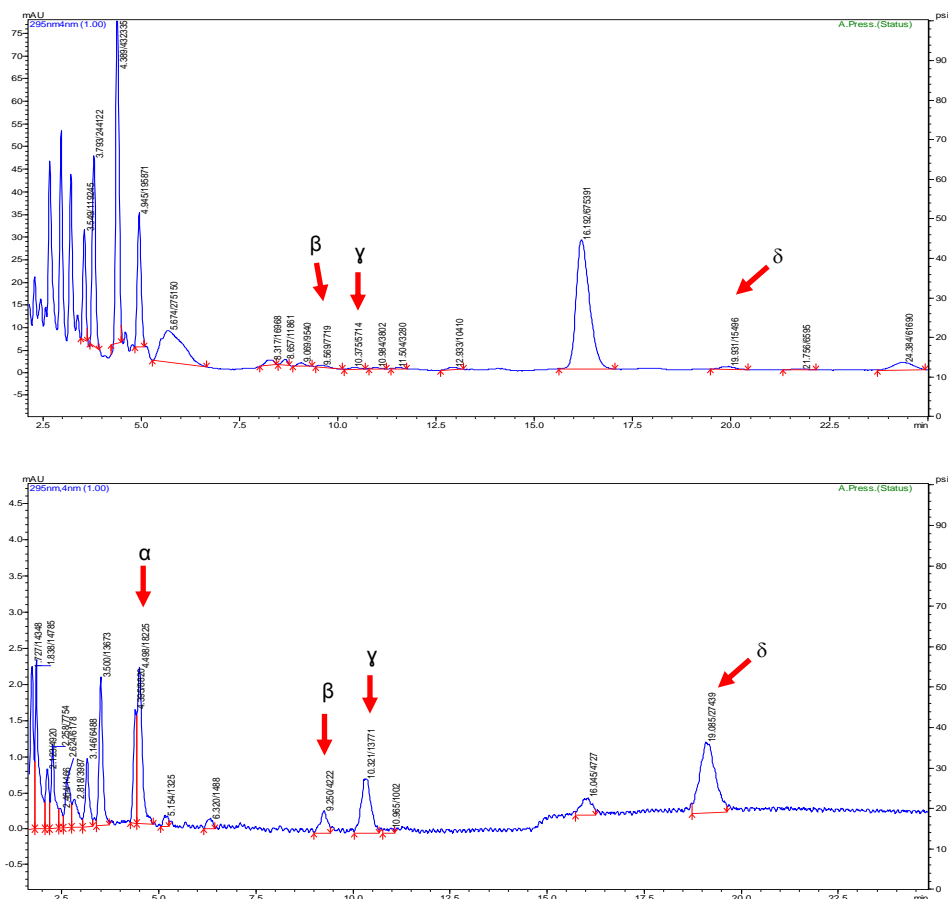
**Figura 26 - Cromatograma de material insaponificável de patauí e material insaponificável de patauí + padrões. Método: coluna Superspher Si-60 (5 µM, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno), fase móvel: (Hexano com 0,1% HOAc e i-PrOH (99,5:0,5)), fluxo: 2 ml/min, 45 min. Detector: UV-vis-DAD (220 e 295 nm).**

Na figura 27, verifica-se que não foi identificada a presença de  $\alpha$ -tocoferol na amostra de uchi. Sendo que na eluição com os padrões nota-se a presença do pico referente a  $\alpha$ -tocoferol que não existia no cromatograma da amostra.



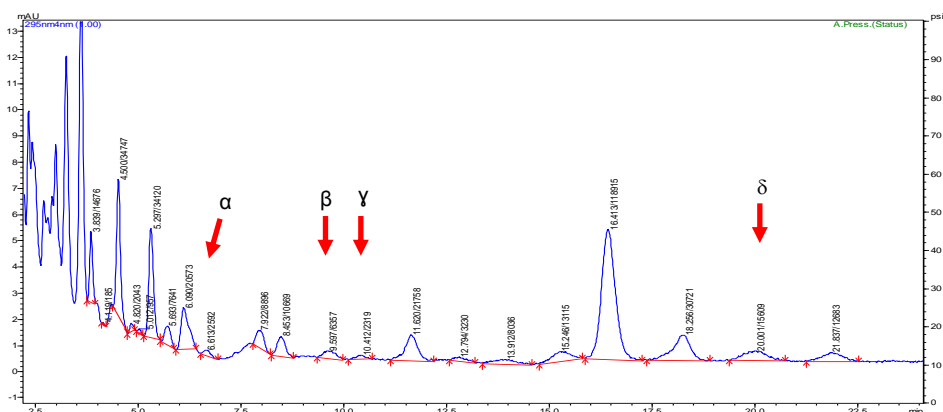
**Figura 27 - Cromatograma de material insaponificável de uchi e material insaponificável de uchi + padrões. Método: coluna Superspher Si-60 (5  $\mu$ m, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno), fase móvel: (Hexano com 0,1% HOAc e i-PrOH (99,5:0,5)), fluxo: 2 ml/min, 45 min. Detector: UV-vis-DAD (220 e 295 nm).**

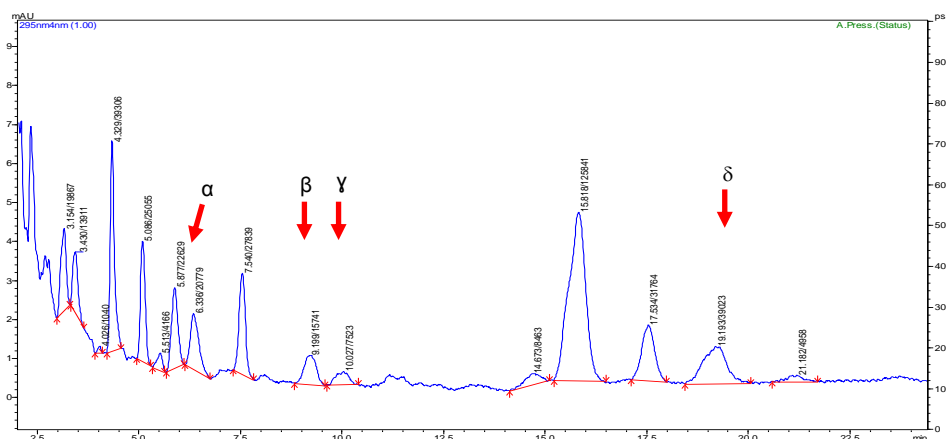
Em piaçava foram identificados  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol apenas, o  $\alpha$ -tocoferol não foi identificado. Ver figura 28.



**Figura 28 - Cromatograma de material insaponificável de piaçava e material insaponificável de piaçava + padrões. Método: coluna Superspher Si-60 (5  $\mu$ M, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno), fase móvel: (Hexano com 0,1% HOAc e i-PrOH (99,5:0,5)), fluxo: 2 ml/min, 45 min. Detector: UV-vis-DAD (220 e 295 nm).**

Para bacaba foram identificados os 4 tocoferóis  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol, como está apresentado na figura 29.





**Figura 29 - Cromatograma de material insaponificável de bacaba e material insaponificável de bacaba + padrões. Método: coluna Superspher Si-60 (5  $\mu$ M, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno), fase móvel: (Hexano com 0,1% HOAc e i-PrOH (99,5:0,5)), fluxo: 2 ml/min, 45 min. Detector: UV-vis-DAD (220 e 295 nm).**

#### 4.6.2 Quantificação de tocoferóis

Os tocoferóis foram quantificados pelo método do padrão externo. Foram construídas curvas analíticas para cada um dos padrões utilizando-se as seguintes concentrações, em triplicatas e detectados a 220 e 295 nm :

$\alpha$ -tocoferol: 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 ug/mL (Fig.30)

$\beta$ -tocoferol: 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 ug/mL (Fig. 31)

$\gamma$ -tocoferol: 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 ug/mL (Fig. 32)

d-tocoferol: 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 ug/mL (Fig. 33)

Obtendo-se as seguintes curvas de calibração:

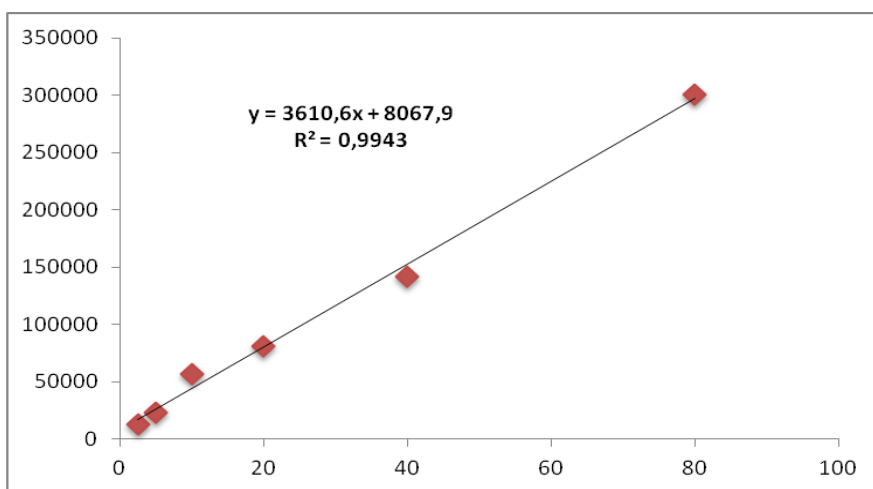


Figura 30. Curva de calibração de  $\alpha$ -tocoferol

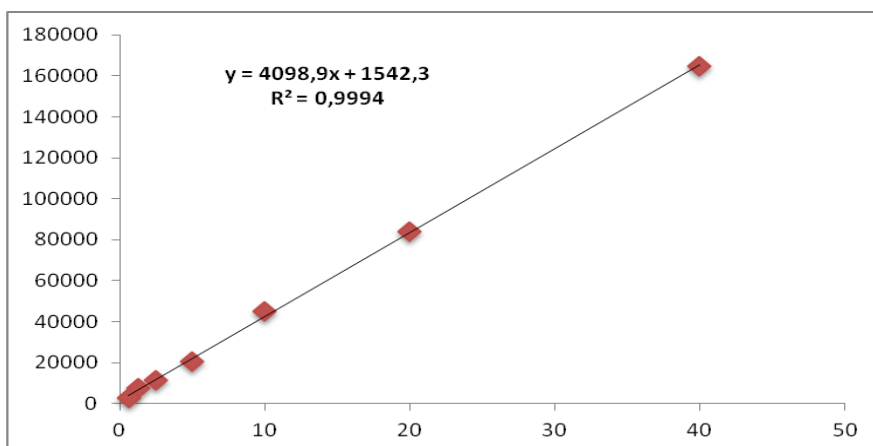


Figura 31. Curva de calibração de  $\beta$ -tocoferol

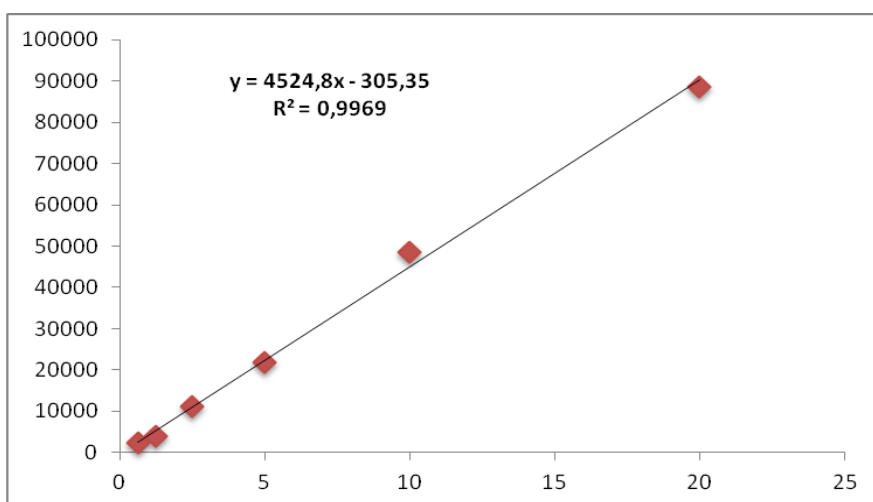
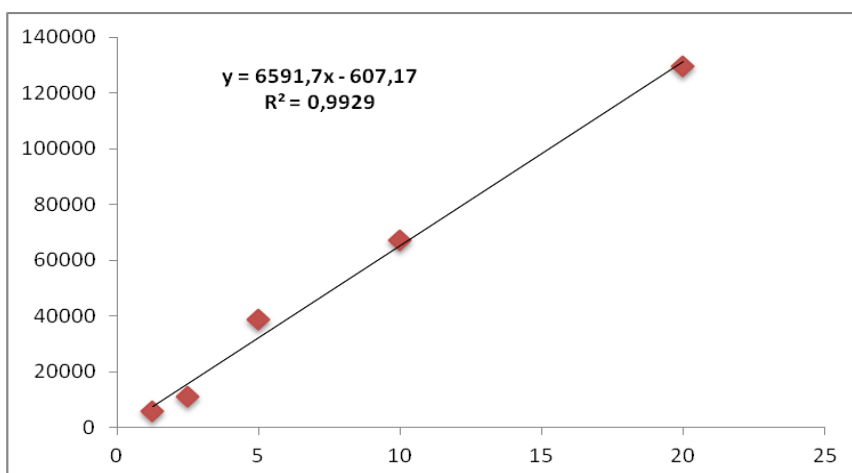


Figura 32. Curva de calibração de  $\gamma$ -tocoferol



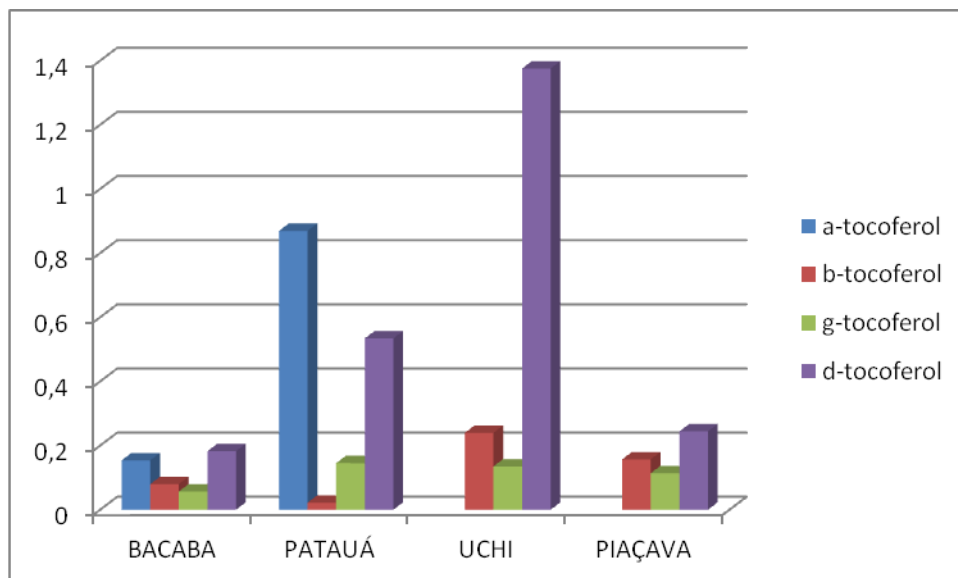
**Figura 33. Curva de calibração de d-tocoferol**

Os tocoferóis foram quantificados utilizando-se a equação linear gerada pela regressão linear da curva, calculando-se para cada área do respectivo tocoferol na amostra, injetada em triplicata, a concentração correspondente. Dessas concentrações foi calculado um valor médio e em seguida a concentração foi calculada para 1 g de óleo do fruto. (De acordo com tabela 16)

**Tabela 16. Conteúdo de tocoferóis no óleo (mg / g óleo)**

	$\alpha$ - Tocoferol	$\beta$ - Tocoferol	$\gamma$ - Tocoferol	$\delta$ - Tocoferol
<b>Patauá</b>	0,869 $\pm$ 0,015	0,022 $\pm$ 0,001	0,145 $\pm$ 0,004	0,534 $\pm$ 0,007
<b>Uchi</b>	ND	0,240 $\pm$ 0,001	0,135 $\pm$ 0,003	1,375 $\pm$ 0,018
<b>Bacaba</b>	0,154 $\pm$ 0,003	0,080 $\pm$ 0,003	0,057 $\pm$ 0,002	0,182 $\pm$ 0,003
<b>Piaçava</b>	ND	0,157 $\pm$ 0,009	0,114 $\pm$ 0,001	0,244 $\pm$ 0,000

**ND = não detectado**



**Figura 34 – Comparação do teor de tocoferol entre os frutos.**

Como pode ser visualizado na Figura 34, o óleo de patauá apresentou o maior teor de  $\alpha$ -tocopherol de acordo com Lubrano *et al.*, (1994) e Montúfar *et al.*, (2010)], no entanto, o teor de  $\beta$ -tocopherol é descrito pela primeira vez na literatura, já que Rodrigues *et al.*, (2010) descreve  $\gamma$ -tocopherol e  $\beta$ -tocopherol juntamente. O uxi-amarelo apresenta maior índice de  $\delta$ -tocopherol diferentemente de Costa *et al.*, (2010) que não identifica  $\delta$ -tocopherol em sua amostra. Piaçava apresentou  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ -tocopherol, apresentando 0,52 mg de tocoferóis por grama de óleo. Em resumo o óleo que apresentou maior teor de tocoferóis foi o uxi-amarelo com um total de 1,75 mg de tocoferóis por g de óleo, ainda que não tenha apresentado  $\alpha$ -tocopherol, um índice bem maior do que o apresentado por Costa *et al.*, (2010) de apenas 0,504 mg / g de óleo.



## 4.7 Caracterização espectroscópica e identificação de PPP1

### 4.7.1 Identificação de PPP1

A substância isolada PPP1 apresentou reação com  $\text{FeCl}_3$  indicativo de substância fenólica e reação com DPPH indicativo de substância antioxidante em CCD. Utilizando-se os dados de espectros de RMN e outros obtidos de PPP1, foi possível identificar PPP1 como o piceatanol, ou 3,3',4,5'-tetrahidroxiestilbeno. (Figura 35)

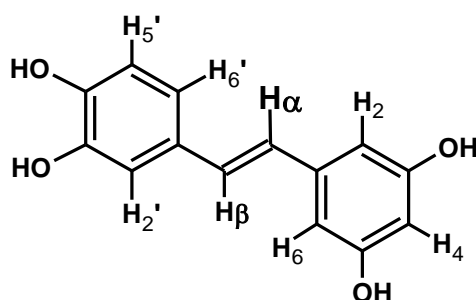


Figura 35. Estrutura do Piceatanol

Piceatanol é a primeira substância isolada de *Oenocarpus bataua* já que não foram encontrados trabalhos científicos sobre isolamento de substâncias desta espécie. O piceatanol apresenta várias atividades biológicas importantes como propriedades anti-câncer, anti-inflamatória e anti-oxidante, o que torna esta biomolécula de potencial utilidade farmacológica. (Piotrowska et al., 2012)

### 4.7.2 Análise do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PPP1

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PPP1 (anexo 01) apresenta sinais característicos de hidrogênios aromáticos e olefínicos. Os dados de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos para PPP1 são comparados aos dados encontrados na literatura para o piceatanol. Tabela 17.

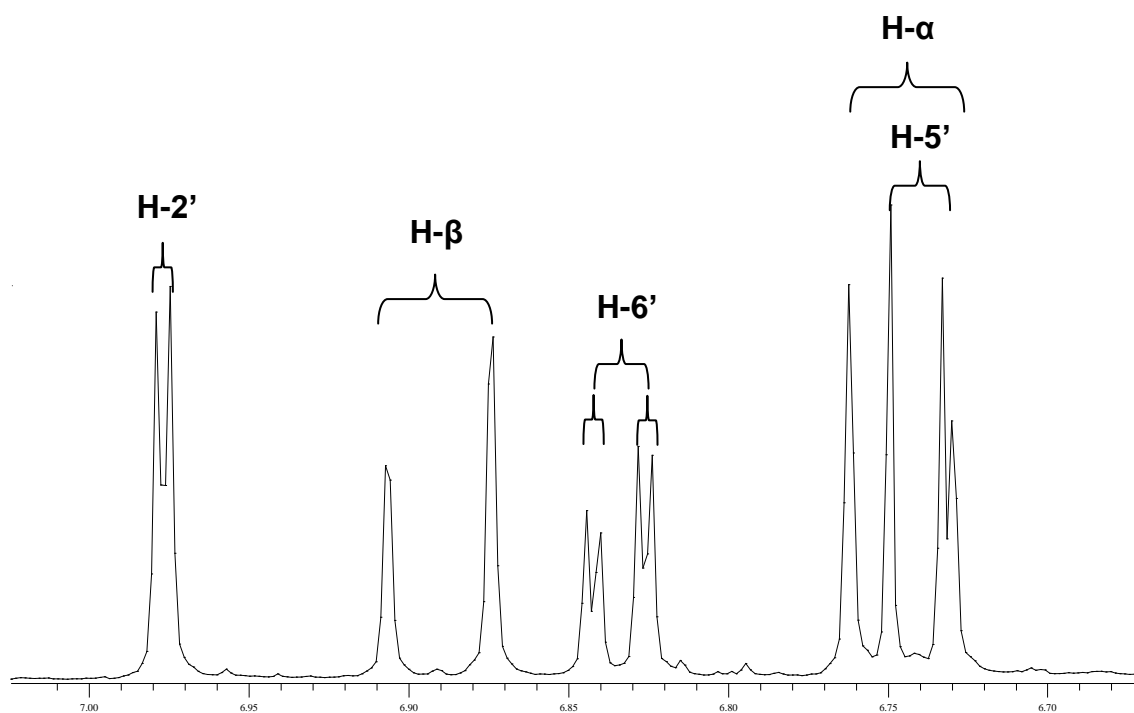
**Tabela 17. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para PPP1 e dados da literatura para piceatanol**

N° de H	PPP1 <sup>1</sup>		Piceatanol <sup>2</sup>	
	$\delta$	M (J, Hz)	$\delta$	M (J, Hz)
<b>H-2, H-6</b>	6,43	d (2,0)	6,43	d (2,0)
<b>H-4</b>	6,16	t (2,0)	6,15	t (2,0)
<b>H-<math>\beta</math></b>	6,89	d (16,0)	6,89	d (16,0)
<b>H-<math>\alpha</math></b>	6,74	d (16,0)	6,73	d (16,0)
<b>H-2'</b>	6,97	d (2,0)	6,97	d (2,0)
<b>H-5'</b>	6,73	d (8,0)	6,73	d (8,0)
<b>H-6'</b>	6,83	dd (2,0; 8,0)	6,83	dd (2,0; 8,0)

<sup>1</sup> 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD; <sup>2</sup> Brinker et al. (1991); CD<sub>3</sub>OD

Na ampliação do espectro de RMN na região de hidrogênios aromáticos e vinílicos observa-se um dubleto em  $\delta$  6,97 que foi atribuído ao H-2', que apresenta constante de acoplamento igual a 2,0 Hz concernente ao acoplamento em meta com H-6'. O duplo dubleto em  $\delta$  6,83 foi atribuído ao H-6', que possui constantes de acoplamento de 2,0 Hz e 8,0 Hz, referente ao acoplamento em meta com H-2' e em orto com H-5', respectivamente. Em  $\delta$  6,73, têm-se um dubleto que foi atribuído ao H-5 com  $J_{5,6'}$  igual a 8,0 Hz. O hidrogênio H $\beta$  apresenta um dubleto em  $\delta$  6,89 com constante de acoplamento  $J_{\alpha\beta}$  igual a 16,0 Hz. H $\alpha$  apresenta um deslocamento químico em  $\delta$  6,74. (Figura 36)

Em  $\delta$  6,43 um dubleto referente aos hidrogênios H-2 e H-6, homotópicos devido à simetria desse anel no eixo C1-C4, com constantes de acoplamento de 2,0 Hz pelo acoplamento em meta com H-4. O H-4 é um triplete em  $\delta$  6,16 com constante de acoplamento de 2,0 Hz. (Figura 36)



**Figura 36 – Expansão aromática do espectro de RMN  $^1\text{H}$**

#### 4.7.3 Análise do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PPP1

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  encontram-se tabelados na tabela 18 e são comparados aos dados de  $^{13}\text{C}$  para o piceatanol encontrados na literatura (Lee *et al.*, 2012).

**Tabela 18. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT obtidos para PPP1 comparados aos dados de piceatanol na literatura**

N° de C	$\delta$ PPP1 <sup>1</sup>	$\delta$ Piceatanol <sup>2</sup>
C-1	141,3	141,4
C-2, C-6	105,8	105,9
C-3, C-5	159,6	159,8
C-4	102,6	102,8
C- $\beta$	129,7	129,8
C- $\alpha$	127,0	127,1
C-1'	131,3	131,2
C-2'	113,8	114,0
C-3'	146,5	146,6
C-4'	146,4	146,5
C-5'	116,4	116,6
C-6'	120,2	120,3

<sup>1</sup> 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , <sup>2</sup> 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$

Os dados de COSY estão apresentados na tabela 19 e na tabela 20 as correlações observadas nos espectros de HSQC e HMBC.

**Tabela 19. Correlações no espectro de COSY de PPP1**

$\delta\text{H} - \delta\text{H}$	PPP1
H-2 – H-4	6,43 – 6,16
H-2' – H-6'	6,97 – 6,83
H-6' – H- $\alpha$	6,83 – 6,74
H-5' – H-6'	6,73 – 6,83
H- $\alpha$ – H- $\beta$	6,88 – 6,74

Tabela 20. Correlações no HSQC e HMBC de PPP1

C - H	HSQC	C - H	HMBC
	$\delta C - \delta H$		$\delta C - \delta H$
H2' - C2'	6,97-113,8	H $\beta$ - C2'	6,88-113,8
H $\beta$ - C $\beta$	6,88-129,7	H6' - C2'	6,83-113,8
H5' - C5'	6,73-116,4	H2 - C3	6,43-159,6
H6' - C6'	6,83-120,1	H2 - C $\alpha$	6,43-127,0
H $\alpha$ - C $\alpha$	6,74-127,0	H2 - C2	6,43-105,8
H2, H6 - C2,C6	6,43-105,8	H2 - C4	6,43-102,6
H4 - C4	6,15-102,6	H $\beta$ - C6'	6,88-120,2
		H2' - C6'	6,97-120,2
		H2' - C3'	6,97-146,5
		H6' - C4'	6,83-146,5
		H5' - C4'	6,74-146,5
		H $\beta$ - C1'	6,88-141,1
		H5' - C1'	6,74-131,1
		H5' - C $\beta$	6,74-129,7
		H6' - C $\beta$	6,83-129,7
		H2' - C $\beta$	6,97-129,7
		H $\alpha$ -C2,C6	6,74-105,7

#### 4.7.4 Análise do espectro de massas de PPP1

O espectro de massas de PPP1 apresentou um pico em m/z 245,0817 referente ao aduto formado [M-H<sup>+</sup>], ou seja, C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> de 244 g/mol mais a massa do hidrogênio. Verificou-se também a presença do pico em m/z 267,0624 referente ao aduto formado [M-Na<sup>+</sup>].

## 4.8 Atividades biológicas

### 4.8.1 Atividade antioxidante

#### 4.8.1.1 Estudo da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH

Cada extrato foi diluído em cinco concentrações, utilizando-se diluições sucessivas. De cada concentração em triplicata foi medida a absorbância no espectro de ultravioleta e calculado o %CS (percentual da capacidade de sequestro do radical livre DPPH). Para cada extrato construiu-se uma curva do %CS em função da concentração. A partir da equação da reta deste gráfico foi estimado o parâmetro %CS<sub>50</sub> em µg / mL, que expressa a concentração (massa) de substrato que causa 50 % de perda da atividade (cor) do radical DPPH. Da mesma forma foi feito para o controle positivo, quercetina.

Cálculo da %CS<sub>50</sub> de quercetina (Controle Positivo): Com os valores calculados de % CS em função da concentração de quercetina (µg / mL) foi construído o gráfico da Figura 37.

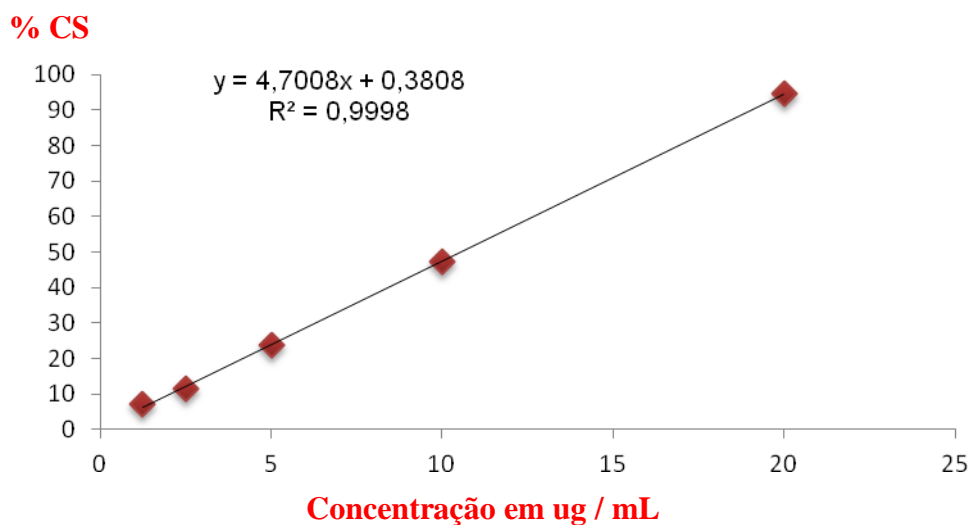


Figura 37. Curva de calibração da quercetina

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) da Equação da reta apresentou um valor próximo a 1 indicando uma excelente correlação linear.

O valor calculado de %CS<sub>50</sub> para a quercetina a partir da equação da reta foi de 10,5 µg / mL. Esse dado constitui uma referência da atividade antioxidante de uma substância de caráter polifenólico com reconhecidas propriedades antioxidantes como é a quercetina.

A atividade antioxidante pela medida da capacidade de seqüestro de 50% dos radicais de DPPH (CS<sub>50</sub>) para as sementes de patauá e bacaba foram consideradas bastante ativas CS<sub>50</sub> = 7,00 µg / mL ± 0,10 e 23,24 µg / mL ± 0,16, considerando-se a quercetina como padrão, que apresentou CS<sub>50</sub> = 10,5 µg / mL ± 0,6. Como mostra a tabela 21. As polpas de patauá, bacaba e piaçava se mostraram pouco ativas, sendo que os extratos de polpa mais ativos seriam os extratos metanólicos da polpa de bacaba e patauá com 108,00 µg / mL ± 0,12 e 115,00 µg / mL ± 0,11, respectivamente. O extrato da polpa de uchi se mostrou inativo.

**Tabela 21. Resultado da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH dos extratos metanólicos de polpas e sementes dos frutos**

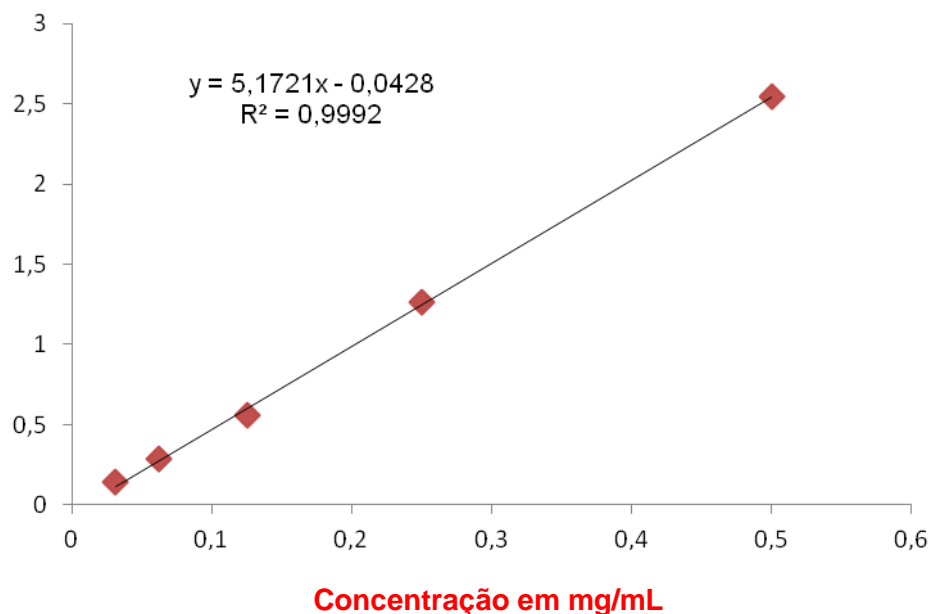
Amostras	DPPH (µg/ mL)
Pataua semente	7,00 ± 0,10
Pataua polpa	115,00 ± 0,11
Piaçava semente	604,00 ± 0,04
Piaçava polpa	295,00 ± 0,04
Bacaba semente	23,24 ± 0,16
Bacaba polpa	108,00 ± 0,12
Uchi polpa	Inativo *

\* os extratos de tucumã e uchi foram considerados inativos por apresentarem % CS menor que 50 na maior concentração testada de 1 mg/mL

#### 4.8.1.2 Teor de fenólicos totais

Curva de calibração com ácido gálico: A partir dos dados de absorvância em função da concentração de ácido gálico (mg/mL) foi construída uma curva de calibração (Figura 38).

**ABS**



**Figura 38. Curva de calibração de ácido gálico**

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) apresentou um valor próximo a 1 indicando uma boa correlação linear.

O teor de fenólicos totais foi estimado por interpolação dos dados de absorvância dos extratos na reta de regressão da curva de calibração de ácido gálico. Os resultados são expressos como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico/mg de solução, (Tabela 22).



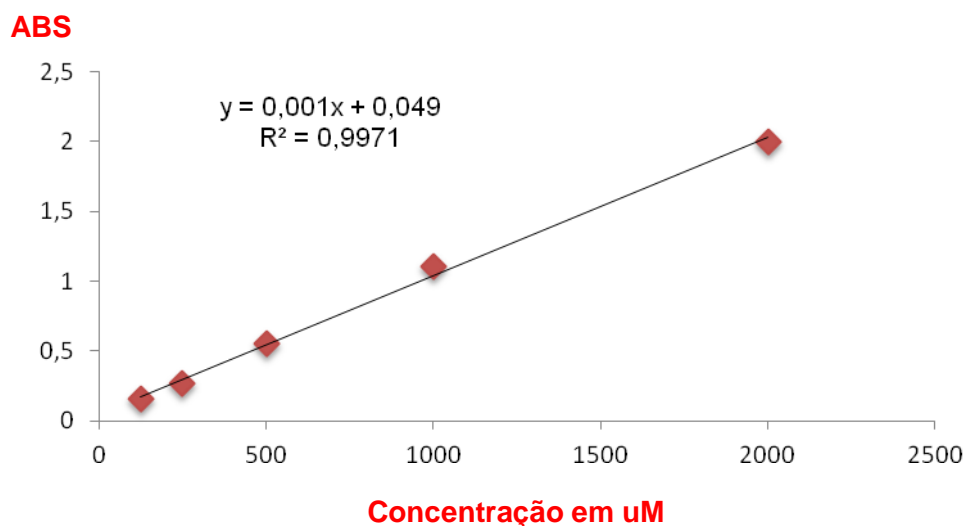
**Tabela 22. Resultados do teor de fenólicos totais para extratos metanólicos dos frutos**

<b>Amostras</b>	<b>Fenólicos totais (<math>\mu\text{g. mg}^{-1}</math>)</b>
Pataua semente	245,000 $\pm$ 0,005
Pataua polpa	72,200 $\pm$ 0,004
Piaçava semente	19,500 $\pm$ 0,001
Piaçava polpa	39,100 $\pm$ 0,006
Bacaba semente	150,000 $\pm$ 0,002
Bacaba polpa	62,700 $\pm$ 0,007 <sup>3</sup>
Uchi polpa	22,100 $\pm$ 0,007

As sementes de patauá e bacaba apresentaram alto teor de fenólicos com: 245,000  $\mu\text{g. mg}^{-1} \pm 0,005 \times 10^{-3}$  e 150,7  $\mu\text{g. mg}^{-1} \pm 0,002$  em equivalentes de ácido gálico. Resultado que condiz com a boa capacidade de seqüestro de radicais de DPPH para estas amostras. Dos extratos metanólicos das polpas o extrato de patauá apresentou o maior teor de fenólicos totais com 72,2  $\mu\text{g. mg}^{-1} \pm 0,004$ .

#### 4.8.1.3 Estudo da capacidade de redução de ferro (FRAP)

A partir dos dados de absorvância em função da concentração de  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\mu\text{M}$ ) foi construída uma curva de calibração (Figura 39).



**Figura 39. Curva de calibração de  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$**

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) da Equação da curva apresentou um valor próximo a 1 indicando uma boa correlação linear.

Os valores de absorvância para cada extrato/fração foram interpolados na curva de calibração com  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e os resultados da capacidade redutora de Fe (III) foram expressos como  $\mu\text{M}$  de Fe(II)/g de extrato seco.

A tabela 23 apresenta os resultados da variação na capacidade de redução de Fe (III) dos extratos metanólicos dos frutos.

**Tabela 23. Resultado da capacidade de redução do Fe (III) dos extratos metanólicos dos frutos**

<b>Amostras</b>	<b>FRAP (uM)</b>
Pataua semente	1791,4 ± 3,2
Pataua polpa	584,9 ± 5,3
Piaçava semente	187,8 ± 2,3
Piaçava polpa	298,3 ± 1,7
Bacaba semente	1564,5 ± 1,2
Bacaba polpa	697,3 ± 2,3
Uchi polpa	163,6 ± 1,2

Novamente, os extratos mais ativos foram os de semente de patauá com 1791,4 uM ± 3,2 e de bacaba com 1564,5 uM ± 1,2 demonstrando a capacidade redutora de Fe (III) da amostra. Os extratos obtidos das polpas dos frutos apresentaram baixa capacidade redutora, sendo que uchi foi considerado inativo.

A partir dos resultados pode-se dizer que houve uma correlação positiva entre os teores de fenólicos totais dos extratos metanólicos e a atividade antioxidante determinada pelo método de seqüestro do radical livre DPPH e pelo método da capacidade de redução do Fe (III), tal como pode ser visualizado na Tabela 24. Verifica-se que as amostras que tiveram as maiores concentrações de fenólicos totais, foram as que apresentam menores concentrações de extrato necessárias para o sequestro de 50% do radical DPPH, o que demonstra uma boa atividade antioxidante que pode estar relacionada ao conteúdo de fenólicos presentes na amostra, já que substâncias fenólicas possuem propriedades oxidáveis. Ao mesmo tempo em que apresentam boa capacidade redutora de Fe (III), o que pode ser observado nas amostras de sementes de patauá e bacaba. No entanto, o oposto também é observado. Em amostras como polpa de uchi e semente de piaçava em que o

teor de fenólicos foi baixo, observa-se também a baixa ou nenhuma atividade antioxidante nas concentrações altas necessárias para sequestrar 50% do radical DPPH e também baixíssimas concentrações de Fe (III) reduzido.

**Tabela 24. Correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante**

Amostras	DPPH $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Fenólicos totais * $\mu\text{g. mg}^{-1}$	FRAP**
Pataua semente	7,0 $\pm$ 0,1	245,000 $\pm$ 0,005	1791,4 $\pm$ 3,2
Pataua polpa	115,0 $\pm$ 1,1	72,200 $\pm$ 0,004	584,9 $\pm$ 5,3
Piaçava semente	604,00 $\pm$ 0,04	19,500 $\pm$ 0,001	187,8 $\pm$ 2,3
Piaçava polpa	295,00 $\pm$ 0,04	39,100 $\pm$ 0,006	298,2 $\pm$ 1,7
Bacaba semente	23,20 $\pm$ 0,16	150,000 $\pm$ 0,002	1564,5 $\pm$ 1,2
Bacaba polpa	108,0 $\pm$ 1,2	62,700 $\pm$ 0,007	697,3 $\pm$ 2,3
Uchi polpa	Inativo *	22,100 $\pm$ 0,001	163,6 $\pm$ 1,2

#### 4.8.2 Atividade larvicida

##### 4.8.2.1 Atividade larvicida para *Aedes aegypti*

Verificou-se uma baixa letalidade das larvas de *Aedes aegypti* quando em contato com os extratos e frações dos frutos após 24 h. Apenas o extrato metanólico das sementes de bacaba apresentou no screening letalidade de 80% das larvas na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  de extrato. Essa é considerada uma atividade moderada. A segunda fração mais ativa foi a fração clorofórmica do extrato metanólico de piaçava. (Tabela 25).

**Tabela 25. Letalidade das larvas após 24 h de exposição aos extratos/frações dos frutos**

<b>Amostras</b>	<b>% Mort. 500 µg/mL</b>	<b>DL50 (IC<sub>0,90</sub> ou 0,95) µg/mL</b>	<b>Desvio padrão</b>
Ext. MeOH tucumã	50	500,00 (430-651,8)	4,3
Ext. MeOH semente bacaba	80	408,5 (346,3-460,6)	9,8
Ext. MeOH bacaba	17	NA	
Fr. AcOEt Ext. MeOH bacaba	27	>500	
Fr. Hidroalc. Ext MeOH bacaba	20	NA	
Fr. CHCl <sub>3</sub> Ext. MeOH bacaba	33	>500	
Ext. MeOH piaçava	27	>500	
Fr. CHCl <sub>3</sub> Ext. MeOH piaçava	63	357,9 (274,4-523,4)	1,0
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH piaçava	37	>500	
Ext. MeOH semente piaçava	13	NA	
Ext. MeOH patauá	20	NA	
Fr. AcOEt Ext. MeOH patauá	13	NA	
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH patauá	27	NA	
Ext. MeOH semente patauá	0	NA	
Ext. MeOH uchi	0	NA	
Fr. Aquosa vinho piaçava	3	NA	

Após 48 h de contato todos os extratos demonstraram uma boa atividade com exceção do extrato metanólico de bacaba, que não se mostrou ativo, mesmo após o período de 48 h. A DL<sub>50</sub> foi calculada mostrando que a amostra mais ativa para *Aedes aegypti* foi a fração clorofórmica do extrato metanólico de piaçava com DL<sub>50</sub> de 198,9 µg/mL. (Tabela 26)

**Tabela 26. Letalidade das larvas após 48h de exposição aos extratos/frações dos frutos**

<b>Amostras</b>	<b>% Mort. 500 µg/mL</b>	<b>DL50 (IC 0,90 ou 0,95) µg/mL</b>	<b>Desvio padrão</b>
Ext. MeOH tucumã	97	341,5 (304,5-387,1)	4,7
Ext. MeOH semente bacaba	100	309,3 (159,7-458,9)	2,9
Ext. MeOH bacaba	23	NA	
Fr. AcOEt Ext. MeOH bacaba	100	297,1 (147,5-446,7)	1,6
Fr. Hidroalc. Ext MeOH bacaba	100	263,1 (181,7-370,1)	2,7
Fr. CHCl <sub>3</sub> Ext. MeOH bacaba	80	402,0 (352,8-452,3)	4,5
Ext. MeOH piaçava	100	288,7 (141,1-438,3)	2,8
Fr. CHCl <sub>3</sub> Ext. MeOH piaçava	100	198,9 (108,6-388,5)	1,3
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH piaçava	93	366,0 (332,9-410,5)	4,8
Ext. MeOH semente piaçava	83	393,6 (345,7-441,5)	4,5
Ext. MeOH patauá	93	353,5 (313,8-398,3)	4,2
Fr. AcOEt Ext. MeOH patauá	100	291,3 (144,1-439,1)	2,1
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH patauá	100	312,5 (163,5-462,2)	1,7
Ext. MeOH semente patauá	90	375,9 (331,1-420,9)	4,7
Ext. MeOH uchi	93	365,9 (322,9-410,5)	4,8
Fr. Aquosa vinho piaçava	77	410,6 (360,1-463,9)	4,4

#### 4.8.2.2 Atividade larvicida para *Culex quinquefasciatus*

Verificou-se uma boa atividade de alguns extratos metanólicos após o período de 24h, por exemplo a fração clorofórmica do extrato metanólico da polpa de bacaba demonstrou um percentual de 100% de letalidade das larvas após o período de 24 h, bem como a fração clorofórmica do extrato metanólico da polpa de piaçava, obteve um percentual de 93% de letalidade, seguidos pelo extrato metanólico de tucumã com 63% e fração hidroalcoólica do extrato metanólico de patauá também com 63%, que apresentou a melhor DL50 de 172,7µg/mL. De acordo com tabela 27.

**Tabela 27. Letalidade das larvas após 24h de exposição aos extratos/frações dos frutos**

Amostras	% Mort. 500 µg/mL	DL50 (IC <sub>0,90</sub> ou 0,95) µg/mL	Desvio padrão
Ext. MeOH tucumã	63	484,1 (450,4-517,7)	1,3
Ext. MeOH semente bacaba	53	>500	1,5
Ext. MeOH bacaba	43	>500	0,7
Fr. AcOEt Ext. MeOH bacaba	37	>500	0,6
Fr. Hidroalc. Ext MeOH bacaba	43	>500	1,0
Fr. CHCl <sub>3</sub> Ext. MeOH bacaba	100	277,9 (245,9-310,1)	1,6
Ext. MeOH piaçava	37	>500	1,7
Fr. CHCl <sub>3</sub> Ext. MeOH piaçava	93	316,7 (169,3-463,7)	0,8
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH piaçava	50	>500	0,6
Ext. MeOH semente piaçava	40	>500	0,5
Ext. MeOH patauá	60	428,8 (264,2-1074,7)	0,6
Fr. AcOEt Ext. MeOH patauá	47	>500	0,5
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH patauá	63	172,7 (150,6-219,7)	0,5
Ext. MeOH semente patauá	30	>500	0,5
Ext. MeOH uchi	50	>500	0,6
Fr. Aquosa vinho piaçava	47	>500	0,6

Após o período de 48h todos os extratos se apresentaram ativos com letalidade de 100% sendo que a fração clorofórmica de piaçava apresentou melhor DL50 de 29,7  $\mu\text{g/mL}$ , seguido da fração acetato de etila do extrato metanólico da polpa de bacaba com DL50 de 31,9  $\mu\text{g/mL}$ . De acordo com tabela 28.

**Tabela 28. Letalidade das larvas após 48h de exposição aos extratos/frações dos frutos**

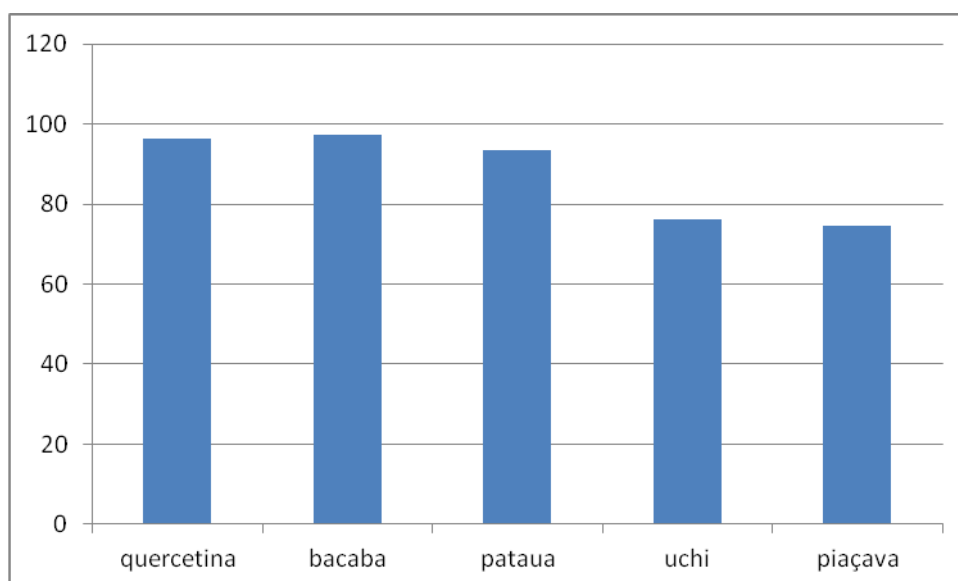
Amostras	% Mort. 500 $\mu\text{g/mL}$	DL50 (IC 0,90 ou 0,95) $\mu\text{g/mL}$	Desvio padrão
Ext. MeOH tucumã	100	37,8 (12,8-62,1)	1,3
Ext. MeOH semente bacaba	100	41,6 (21,4-63,3)	1,5
Ext. MeOH bacaba	100	36,5 (30,5-42,9)	0,7
Fr. AcOEt Ext. MeOH bacaba	100	31,9 (18,9-43,4)	0,6
Fr. Hidroalc. Ext MeOH bacaba	100	32,5 (28,9-36,9)	1,0
Fr. $\text{CHCl}_3$ Ext. MeOH bacaba	100	38,5 (23,3-55,4)	1,6
Ext. MeOH piaçava	100	45,1 (1,8-92,2)	1,7
Fr. $\text{CHCl}_3$ Ext. MeOH piaçava	100	29,7 (17,3-73,7)	0,8
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH piaçava	100	70,9 (53,3-91,8)	0,6
Ext. MeOH semente piaçava	100	48,2 (13,4-89,2)	0,5
Ext. MeOH patauí	100	47,1 (22,1-71,9)	0,6
Fr. AcOEt Ext. MeOH patauí	100	61,2 (23,5-116,3)	0,5
Fr. Hidroalc. Ext. MeOH patauí	100	40,9 (23,1-72,8)	0,5
Ext. MeOH semente patauí	100	99,8 (52,8-190,8)	0,5
Ext. MeOH uchi	100	139,3 (47,0-231,6)	0,6
Fr. Aquosa vinho piaçava	100	157,2 (99,8-211,6)	0,6



### 4.8.3 Atividade de inibição enzimática

#### 4.8.3.1 Atividade de inibição de lipoxigenase e acetilcolinesterase

Os extratos que demonstraram maior inibição frente a lipoxigenase na concentração de 10 mg/mL foram os extratos de bacaba e patauá com 97,4% e 93,6%, os extratos metanólicos de patauá e bacaba também apresentaram boa inibição da enzima acetilcolinesterase. Estas inibições enzimáticas podem estar relacionadas ao alto teor de fenólicos encontrados nestes extratos, principalmente para inibição da lipoxigenase já que o padrão positivo quercetina utilizado no teste como potente inibidor é um flavonoide e portanto, é um fenólico. Uxi e piaçava inibem 76,4% e 74,7% respectivamente da enzima lipoxigenase na concentração de 10 mg/mL, mas não inibem a acetilcolinesterase. Os extratos de bacaba e pataua na concentração de 10 mg/mL inibem um percentual comparado ao padrão quercetina na concentração de 1 mg/mL, como pode ser visualizado no gráfico da Figura 40.



**Figura 40. Percentual de inibição de lipoxigenase**

## 5. Conclusões

Nesse trabalho sobre a composição química do óleo de *Oenocarpus bacaba*, *Oenocarpus bataua*, *Endopleura uchi* e *Leopoldinia piassaba* foi possível quantificar o teor de tocoferóis e esteroides identificando estes óleos como boa fonte destes componentes.

Também foi quantificado o teor de ácidos graxos verificando-se que todos os óleos são boas fontes de gordura insaturada, principalmente o óleo de *Oenocarpus bataua* do qual se obteve mais de 70% de ácido oleico, e um baixo percentual de gordura saturada o que poderia justificar seu uso em substituição ao azeite de oliva.

Para *Leopoldinia piassaba* a caracterização química do óleo é realizada pela primeira vez, poucos relatos são encontrados para esta espécie demonstrando que este trabalho contribuiu para a apresentação deste óleo como boa fonte de gordura insaturada e b-sitosterol, 101,6 mg por Kg de óleo deste fruto.

Foi isolada uma substância antioxidante do extrato metanólico de patauá identificada como piceatanol que apresenta também atividade antileucêmica, dentre outras. Os testes de atividade biológica demonstraram uma boa atividade antioxidante combinada ao alto teor de fenólicos do extrato metanólico de patauá, e também uma boa inibição das enzimas lipoxigenase e acetilcolinesterase para este extrato o que pode indicar a presença de várias substâncias bioativas e estruturalmente interessantes.

A caracterização química e biológica destes frutos contribuiu para o conhecimento destas quatro oleaginosas amazônicas, constatando-se a importância destes frutos como alimentos funcionais e fontes de nutracêuticos, destacando-se bacaba e patauá como boa fonte de fenólicos.

## 6. Referências Bibliográficas

Abdi, S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils (Review). **Journal of Chromatography A**. Vol. 935, p. 174 – 201. 2001.

Aguiar, J. P. L., Marinho, H. A., Rebêlo, Y. S., Shrimpton, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**. Vol. 4, p. 755-758, 1980.

Ali, Q.; Ashraf, M.; Anwar, F. Seed Composition and seed oil antioxidant activity of maize under water stress. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 68, p. 2001.

Amaral et al. Triacylglycerol composition of walnut (*Junglans regia* L.) cultivars: characterization by HPLC-ELSD and chemometrics. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol. 52, p. 7964-7969, 2004.

AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY) **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. 5 ed., Champaign, 2002.

Arnt. Tesouro Verde. **Revista Exame**, p. 53-65, 2001.

Aziz, R., Abdul, M., Naheed, R. Nawaz, H. R., Habib, A. Lipoxygenase Inhibitory Constituents from *Periploca aphylla*. **Journal Natural Products**. v. 67, p. 1450-1454, 2004.

Barcia, M. T.; Jacques, A. C. ; Pertuzatti, P. B. ; Zambiasi, R. C. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. **Ciências de alimentos**, v. 31, n.2, p. 381-390, 2010.

Behrens, M. D. *et al.*, A Chemical Survey of Central Amazonian Leguminosae Species. II. Composition of the seed oils. **Fitos**. Vol.1, n.03, 2006.

Benzi, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239(1), p. 70-76, 1996.

Bilonski et al. Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. **Journal of the American Dietetic Association**, vol. 105, p. 1080-1086, 2005.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, 25-30, 1995.

Bray, G. T., Elliott, F. L. Some new oil-seeds derived from American palms. **Analyst**. p.298-302, 1955.

Bureau, J. L.; Bushway, R. J. Determination of carotenoids in fruits and vegetables in the united states. **Journal of food science**, v. 51, p. 128-130, 1986.

Bureau, D., Benjelloun-Mlayah, B. Banoub, J. Bravo, R. FA and unsaponifiable composition of five Amazonian palm kernel oils. **Journal of the American oil chemists' society**. V. 80, n.1, 2003.

Burton, G. W. and Ingold, K. U. Beta-carotene: an usual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, p. 569, 1984.

Cavalcante, P. B . Frutas comestíveis da Amazônia. 5. ed. Belém: CNPq / Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. 279 p.

Cavalcante, P. B . Frutas comestíveis da Amazônia. 6. ed. Belém: CNPq / Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996. 280 p.

Crane et al. Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in *Calophyllum calaba* L. oil from Guadeloupe. **Phytochemistry**, vol. 66, pag. 1825-1831, 2005.

Chaves, J. M., Pechnik, E. Contribuição ao estudo da constituição química do óleo de patauá. **Química e Indústria**. V.14, p. 2-3, 1946.

Colditz, G. A., Branch, L. G., Lipnick, R. J., Willet, W. C., Rosner, B., Posner, B. M. & Hennekens, C. H. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer death in an elderly population. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.42, p.32-36, 1985.

Costa, P. A., Ballus, C. A., Teixeira-Filho, J., Godoy, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, p. 1603-1606, 2010.

Devlin, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. Ed. Edgard Blucher LTDA. Ed.1. 1084p. 2003.

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2. Ed. John Wiley & Sons, LTD. 2001. 507p.

Emperaire e Lescure. Uma abordagem ecológica comparativa. In: A floresta em jogo. O extrativismo na Amazônia Central. Laure Emperaire (editor), editora da UNESP, São Paulo. 2000. 233p.

FGV/ISAE. Zona Franca de Manaus: potencialidades – estudo de viabilidade econômica – Plantas para uso medicinal e cosmético. ISAE/FGV, 30 pp, 2003.

Fearnside (ed.). A Floresta Amazônica nas Mudanças Globais. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, AM. 134 pp. 2003.

Finco, F. D. B. A.; Kammerer, D. R.; Carle, R.; Tseng, W-H.; Boser, S.; Graeve, L. Antioxidant Activity and Characterization of phenolic Compounds from Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) fruit by HPLC-DAD-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7665-7673, 2012.

Franco e Shibamoto. Volatile composition of some brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araça-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.

Gimeno, E. ;Castellote, A. I.; Lamuela-Raventós, R. M.; La Torre, M. C.; López-Sabater, M. C. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed



phase high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 881, p. 251-254, 2000.

Gonçalves, A. E. S. S., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. Chemical Composition and Antioxidant / Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 4666-4674, 2010.

Goulding, M., Lima, C. A. Os frutos do Tambaqui. Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá. MCT-CNPq, 1998. 186p.

Guinazi, M.; Milagres, R. C. R. M.; Pinheiro-Sant'Ana, H. M.; Chaves, J. B. P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2098-2103, 2009.

Holcapek et al. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, vol. 1010, pág. 195-215, 2003.

Holcapek, Jandera, Fischer, Prokes. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, vol. 858, pag. 13-31. 1999.

Horwitz, W. Oficial methods of Análisis of AOAC international. 17 th Edition. Vol.1. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs. 2000.

Hu, J., Zhu, X., Adhikari, P., Li, D. Kim, I., Lee, K. Determination of tocopherol contents in refined edible oils using an HPLC method. **Journal Food Science and Nutrition**. 2009.

Kitts, D. D. Na evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. **Trends in food science and technology**, Cambridge, v.8, n. 6, p. 198-203, 1997.

Lawson, H. Food Oils and Fats: Technology, Utilisation and Nutrition. Ed. Chapman & Hall, Boca Raton, 1995.

Lacerda, A. Constantes físicas e químicas de alguns óleos comestíveis do Brasil. **Revista alimentar**, pg. 7-9, 1945.

Lee, S.W., Hwang, B. S., Kim, M., Park, C., Lee, W.S., Oh, H., Rho, M. Inhibition of LFA-1/ICAM-1-mediated Cell Adhesion by Stilbene Derivatives from *Rheum undulatum*. **Archives of Pharmacal Research**. Vol. 35, n. 10, pg. 1763 – 1770, 2012.

Lubrano, C., Robin, J. R., Khaiat, A. Composición de ácidos grasos, esteroides y tocoferoles de aceites de pulpa de frutos de seis especies de palmeras de Guayana. **Oléagineux**. Vol. 49, n.02, pg. 59-65, 1994.

Luximon-Ramman, B. T.; Soobratee, M.A.; Aruoma, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 5042-5047, 2002.

Magalhães, L. A. M., Lima, M. P., Marinho, H. A., Ferreira, A. G. Identificação de bergenia e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazônica**. V. 37, p. 447-450, 2007.

Marx, F. Andrade, E. H., Zoghbi, M. G. B., Maia, J. G. Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **Eur Food Res Technol**. p. 331-334, 2002.

Mathews-Roth, M. M. Carotenoids and cancer prevention-experimental and epidemiological studies. **Pure and applied chemistry**, v.57, p. 717-722, 1985.

Mathews-Roth, M. M. Anti-tumor activity of beta-carotene, canthaxanthin and phytoene. **Oncology**, v.39, p. 33, 1982.

Mercadante, A. Z.; Rodriguez-Amaya, D. B. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian Green leafy vegetables. **International Journal of food science and technology**, v.25, p. 213-219, 1990.

Miranda, I. P. A. Rabelo, A. Bueno, C. R. Barbosa, E. M. Ribeiro, M. N. S. Frutos de Palmeiras da Amazônia. MCT-INPA, 120p. 2001.

Molyneux. P. The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazul (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science Technology**, v. 26(2), 211-219, 2004.

Montúfar, R.; Laffargue, A.; Pintaud, J-C., Avallone, S. H. S.; Dussert, S. *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae) : Rediscovering a source of high oleic vegetable oil from Amazonia. **Journal of the American oil Chemists' society**, v. 87, p. 167-172, 2010.

Moreto, E. E Fett, R. Óleos e gorduras vegetais – processamento e análises. Florianópolis, Ed. da UFSC, 2a edição. 1989. 179p.

Morón-Villarreyes, J.A. Óleos vegetais, p. 9-28 In: Faria, L.J.G.; Costa,C.M.L. (coord.). **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém:UFPA, NUMA, POEMA, 1998, 302p.: il. – (série POEMA; n 7).

Ngoc, T. M., Minh, P. T. H., Hung, T. M., Thuong, P. T., Lee, I. Lipoxygenase Inhibitory Constituents from Rhubarb. **Archives of Pharmacal Research.** v. 31 (5), p. 598-605, 2008.

Nunomura, R. C. S., Oliveira, V. G., Silva, S. L., Nunomura, S. M. Characterization of Bergenin in *Endopleura uchi* Bark and its Anti-Inflammatory Activity. **Journal Brazilian Chemistry Society.** v. 20 (6), p. 1060 – 1064, 2009.

N. tili et al. seed oil of Tunisian caper capparid spinosa.

Pallet, D. **Perspectivas de valorização dos frutos amazônicos obtidos porextrativismo** – colóquio SYAL – Montpellier, outubro de 2002. Cirad Fihor-SãoPaulo – Brasil, 2002.

Penteado, M. V. C. Vitaminas. Aspectos Nutricionais, Bioquímicos, Clínicos e Analíticos. Editora Manole, Barueri, pag. 3-52, 2003.

Pinto, G. P . O óleo de Uxi; seu estudo químico. **Bol. Tecn. Inst. Agron. Norte,** Belém. 31: 187-94. 1956.

Pinto, G. P. Chemical study of bacaba oil. **Revista de Quimica Industrial** (Rio de Janeiro) (1955), 24: 72-5.

Piotrowska, H., Kucinska, M., Murias, M. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. (Review). *Mutation Research / Reviews in Mutation Research*. v. 750, p. 60-82, 2012.

Possolo, H. As Flacourtiáceas Antilepróticas. Ed. Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, 1945.

Revilla, J. Plantas da Amazônia. Oportunidades Econômicas e Sustentáveis. 2. edição. Manaus, 2001. 405p.

Rhee, I. K., Meent, M. V., Ingkaninan, K., Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**. v. 915, p. 217-223, 2001.

Rocha, M.; Bañuls, C.; Bellod, L.; Jover, A.; Victor, V. M.; Hernández-Mijares, A. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 4061-4075, 2011.

Rodriguez-Amaya, D. B. A guide to carotenoid análisis in foods. OMNI Research, 2001. 60p.

Rodrigues, A. M. C.; Darnet, S.; Silva, L. H. M. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*),

tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 21, n.10, p. 2000-2004, 2010.

Rosso. V. V., Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and food chemistry**. v. 55, p. 5062-5072, 2007.

Ruiz, R.R., Alencar, J. C. Comportamento fenológico da palmeira de patauá (*Oenocarpus bataua*) na reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**. V.34, p. 553-558, 2004.

Silva, S. L., Oliveira, V. G., Yano, T., Nunomura, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazônica**. v. 39(1), p. 187-192, 2009.

Solomons, T. W. G. Química Orgânica. Vol. 02. Rio de Janeiro: LTC, 541p. 2006.

TIB. Programa Prioritário de Tecnologia Industrial Básica. Subgrupo de Trabalho 2 do CAPDA, 2004.

Vallilo, M.I.; Tavares, M.; Aued-Pimentel, S.; Campos, N.C.; Moita Neto, J.M. *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v.66, p.197-200, 1999.

Vastano, B. C.; Chen, Y.; Zhu, N.; Ho C.; Zhou, Z.; Rosen, R. T. Isolation and Identification of Stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 253-256, 2000.

Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, 4113-4117, 1998.

Wildman. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press, Boca Raton, pp. 542, 2001.

Wollenweber et al. Need for multidisciplinary research towards a second green revolution. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 8, p. 337-341. 2005.

Woyengo, T. A.; Ramprasath, V. R.; Jones, P. J. H. Anticancer effects of phytosterols. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 813-820, 2009.

Yuyama et al. Chemical composition of the fruit mesocarpo f three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in Central Amazonia, Brasil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, vol. 54, pag 49-56, 2003.