



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

**ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS ATIVOS DE
BACURI (*Platonia insignis*)**

KAREN FARIAS ALVES CASTELO

MANAUS
2018

KAREN FARIAS ALVES CASTELO

**ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS ATIVOS DE
BACURI (*Platonia insignis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

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

C349e Castelo, Karen Farias Alves
Estudo químico dos extratos ativos de bacuri (*Platonia insignis*) /
Karen Farias Alves Castelo. 2018
126 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Coorientador: Anderson Cavalcante Guimarães
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. *Platonia insignis*. 2. Bacuri. 3. Fitoquímica. 4. Resíduos. I.
Veiga Júnior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

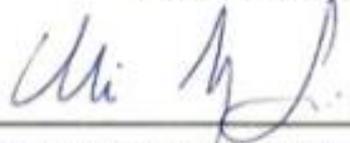
"Estudos químicos de extratos ativos de bacuri"

Karen Farias Alves Castelo

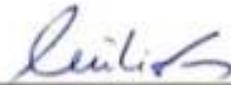
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 24 de abril de 2018.

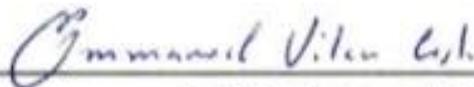
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.ª Dr.ª Cecília Verônica Nunez
Membro UFAM



Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa
Membro UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 24 de abril de 2018.

Aos meus amados pais, *José Rodrigues Alves Filho e Luíza de Marilac Farias Alves*, por todo o cuidado e dedicação que sempre tiveram comigo cumprindo o papel de pais da maneira que melhor puderam.

Ao meu esposo amado, *Makson Castelo*, o qual a vida me presenteou para compartilhar todas as aventuras e desafios que ela me proporciona.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, o ser que acredito ser o doador da vida e que por seu intermédio ainda mantém acesa a chama do altruísmo no coração humano.

À vida, que em meio a todas as alegrias e desgostos que a constituem tem me concedido oportunidades ímpares como a de ter nascido no lar com uma família dedicada e cuidadora, conquistar meus objetivos como o mestrado e por me permitir conhecer pessoas tão especiais que ajudam e facilitam essa trajetória chamada vida.

Aos meus pais que tanto se dedicaram a mim e se sentem felizes e realizados com cada uma de minhas conquistas.

Ao meu esposo, Makson Castelo, por ser essa pessoa linda, compreensível e altruísta que me apoiou em todos os momentos dessa trajetória de mestrado, desde a seleção, quando ainda éramos namorados, incentivando-me a fazê-la, até esse momento da conclusão sendo compreensível com minha ausência e dedicando-se muitas vezes a cuidar sozinho de todos os afazeres diários para que eu pudesse estar concentrada.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-graduação em Química-UFAM por todo o suporte oferecido para a realização dessa pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Jr, por ter aceitado me orientar e por toda a paciência e dedicação que dispensa a todos os seus alunos. Será um exemplo de profissional que levarei como referência.

A todo o grupo de pesquisas “Química de Produtos naturais e Biomoléculas” (Q-BiomA), em especial às amigas que conquistei nessa trajetória, Karen Maciel e Renata Duarte, que juntas sofremos e festejamos nessa caminhada.

À minha amiga de graduação e madrinha de casamento, Jésika Maria, que também me apoiou no início dessa trajetória.

À querida Milena Campelo que sempre dedicava um tempo para ajudar-me tirando as dúvidas mais básicas do funcionamento do laboratório e é sempre tão solícita a todos que precisam.

À todo o grupo de alunos que estavam na fase de PIBIC quando cheguei no Q-BiomA que, por mais engraçado que pareça, foram eles que ensinaram para o grupo de recém pós-graduandos as práticas cromatográficas da pesquisa.

À Plataforma de ensaios biológicos da Fiocruz da Amazônia, em especial, à Emily Marcele por todo suporte dado nas análises de atividade antiplasmódica do trabalho.

À Rosane Bindá e o Laboratório de físico química da UFAM, por se dispor a me auxiliar nas análises espectrofotométricas dos extratos.

À todos os colegas da Central analítica da UFAM por todo apoio e suporte dado nas análises de elucidação estrutural das substâncias isoladas.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro dedicado à pesquisa.

A todos meu muito obrigada!

RESUMO

As pesquisas voltadas para o conhecimento dos benefícios que o consumo de frutos nos proporciona têm crescido bastante e a divulgação do potencial nutricional e terapêutico destes tem intensificado essas pesquisas e reconhecido a Amazônia como um excelente campo para busca de novos compostos bioativos. Com isso, tem-se aumentado o consumo dos frutos o que gera uma quantidade de resíduos, cascas e sementes, muitas vezes bem maior que a quantidade usada para consumo. Esses resíduos são, geralmente, apenas descartados no meio ambiente tornando-se poluição. Na tentativa de diminuir a poluição gerada tem-se trabalhado em projetos que reutilizem os resíduos de frutos. Um dos frutos que tem se destacado nestes estudos é o bacuri, uma fruta amazônica produzida pelas árvores da espécie *Platonia insignis* Mart, família Clusiaceae, que, ao serem analisados seus extratos etanólico, estes apresentaram resultados relevantes nos testes para avaliação de atividades biológicas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a identificação dos principais constituintes químicos dos extratos de resíduos de bacuri por meio de técnicas cromatográficas, de espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN). Neste estudo os extratos etanólico das sementes e cascas foram particionados utilizando solventes com diferentes polaridades: hexano, diclorometano e acetato de etila. A fase hexânica dos extratos etanólicos das cascas de bacuri (EECB) foi submetida a fracionamentos cromatográficos. Desta fração foram isoladas as substâncias HB3C, HC24, HC344 e HE129. Destas substâncias apenas a HC24 foi elucidada. Esta apresentou comportamento cromatográfico típico de fenólicos, o pico do íon molecular estava em m/z 603 em APCI no modo positivo e apresentou deslocamentos químicos que, quando analisados e comparados aos dados da literatura, pôde-se identificar esta substância como sendo a Garcinielliptona FC (GFC), uma benzofenona prenilada rica em atividades biológicas. A substância HE129 foi analisada a partir dos dados cromatográficos e de espectrometria de massas e pôde-se observar comportamento semelhante ao da GFC apresentando pico do íon molecular em m/z 603 em APCI no modo positivo e as fragmentações características da presença de mais um isômero de GFC, porém, a análise dos dados de RMN não pôde ser realizada devido à pequena quantidade de massa da amostra. A fração em diclorometano do extrato etanólico das sementes de bacuri (EESB) também foi submetida a fracionamentos cromatográficos de onde foram obtidas as substâncias 6a1, 7a1 e 7c1. A substância 6a1 apresentou-se como um sólido branco. Esta substância foi submetida a análises por recristalização e, por meio dos dados cromatográficos, os dados de EM e de RMN esta pôde ser identificada como a 30-*epi*-cambogina, mais uma benzofenona prenilada, comum na família Clusiaceae, porém, ainda não relatada na espécie. A substância 7a1 e 7c1 apresentaram-se como um sólido amorfo de cor amarela. Ao ser analisada por cromatografia em camada delgada pôde-se observar que a substância 7a1 ainda estava em mistura, mas pelas análises de seus espectros de massas e comportamento cromatográfico sugere-se que esta seja classificada como um fenólico, porém não foi possível a elucidação da estrutura. A substância 7c1 identificada como um biflavonoide conhecido como fukugetin já descrito no fruto. Os extratos EECB, EESB, as fases originadas da partição e as substâncias isoladas e purificadas foram submetidas a análises de atividade antiplasmódica medindo a porcentagem de inibição do crescimento do parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum*, e estas apresentaram atividade moderada.

Palavras chave: *Platonia insignis*; Bacuri; Fitoquímica.

ABSTRACT

The researches aimed at understanding the benefits that fruit consumption gives us has grown considerably and the dissemination of the nutritional and therapeutic potential of these has intensified these researches and recognized the Amazon as an excellent field for the search for new bioactive compounds. With this, the consumption of the fruits has been increased, which generates a quantity of residues, barks and seeds, many times more than the quantity used for consumption. These wastes are usually only disposed of in the environment turning in to pollution. In an attempt to reduce the pollution generated, we have worked on projects that reuse the fruit residues. One of the fruits that stands out in these studies is bacuri, an Amazonian fruit produced by *Platonia insignis* Mart, Clusiaceae family, which, when analyzing its ethanolic extracts, presented relevant results in the tests for evaluation of biological activities. Therefore, the present work had the objective of isolating and identifying the main chemical constituents of bacuri waste extracts by methods of chromatographic, mass spectrometry (EM) and nuclear magnetic resonance (NMR) techniques. In this study the ethanolic extracts of the seeds and peels were partitioned using solvents with different polarities: hexane, dichloromethane and attila acetate. The hexane phase of the ethanolic extracts of bacuri bark (EECB) was submitted to chromatographic fractions. From this fraction, the substances HB3C, HC24, HC344 and HE129 were isolated. Of these substances only HC24 was elucidated. This showed typical phenolic chromatographic behavior, the molecular ion peak was in m/z 603 in APCI in the positive mode and presented chemical shifts that, when analyzed and compared to the literature data, this substance could be identified as being Garcinielliptona FC (GFC), a prenylated benzophenone rich in biological activities. The HE129 substance was analyzed from the chromatographic and mass spectrometry data and it was possible to observe behavior similar to that of GFC showing molecular ion peak in m/z 603 in APCI in the positive mode and the fragments characteristic of the presence of another isomer of GFC, however, the NMR data analysis could not be performed because of the small amount of mass in the sample. The dichloromethane fraction of the ethanolic extract of bacuri seeds (EESB) was also submitted to chromatographic fractions from which the substances 6a1, 7a1 and 7c1 were obtained. Substance 6a1 was shown as a white solid. This substance was subjected to recrystallization analysis and, through the chromatographic data, the MS and NMR data could be identified as 30-*epi*-cambogin, plus a prenylated benzophenone, common in the Clusiaceae family, but not yet reported in the species. The substance 7a1 and 7c1 appeared as a yellow amorphous solid. When analyzed by thin layer chromatography, it was observed that the substance 7a1 was still in a mixture, but the analysis of its mass spectrum and chromatographic behavior suggests that it is classified as a phenolic, but it was not possible to elucidate the structure. The substance 7c1 identified as a biflavonoid known as fukugetin already described in the fruit. The extracts EECB, EESB, the phases originated from the partition and the isolated and purified substances were submitted to analyzes of antiplasmódic activity measuring the percentage of inhibition of the growth of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, and these showed moderate activity.

Key words: *Platonia insignis*; Bacuri; Phytochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bacurizeiro.....	24
Figura 2 – Bacuri, o fruto do bacurizeiro.	26
Figura 3 – Percentual da atividade antimalárica dos extratos de <i>Theobroma grandiflorum</i> , <i>Euterpe precatória</i> , <i>Garcinia madruno</i> e <i>Platonia insignis</i>	28
Figura 4 – Substâncias químicas encontradas nos extratos metanólicos da polpa de bacuri. ..	29
Figura 5 - Substâncias químicas encontradas na polpa de bacuri utilizando diferentes modos de extração.....	29
Figura 6 - Substâncias voláteis isoladas dos extratos da polpa e cascas de bacuri.	30
Figura 7 - Substâncias isoladas dos extratos metanólico e etanólico das cascas de bacuri.	31
Figura 8 - Substâncias fenólicas caracterizadas por espectrometria de massas a partir dos extratos etanólicos de bacuri.	32
Figura 9 - Compostos químicos isolados da fração oleosa das sementes de bacuri.....	33
Figura 10 - Diterpenos isolados das sementes de bacuri.....	33
Figura 11 - Xantonas isoladas das frações em diclorometano e acetato de etila originadas do extrato etanólico das sementes de bacuri.	34
Figura 12 – Rota biossintética de substâncias fenólicas.....	36
Figura 13 - Componentes básicos de espectrômetro de massas.....	42
Figura 14 - Ilustração da absorção das radiações solares UVA e UVB na pele.....	44
Figura 15 - Estruturas de substâncias utilizadas como filtros solares (A) <i>p</i> -aminobenzóico (PABA), que apresenta melhor absorção da radiação UVB e, para radiação UVA, (B) 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano-1,2-diona (Butil Metoxi-dibenzoil-metano).	45
Figura 16 - <i>Anopheles</i> , o mosquito vetor da malária.....	46
Figura 17 - Fluxograma da extração sequencial de cascas e sementes de bacuri.....	49
Figura 18 - Análise por CCD de EECB, EESB e suas respectivas fases originadas da partição eluídas em Hex/AcOEt (6:4)	56
Figura 19 - Espectros de absorção dos extratos e frações de bacuri.....	58
Figura 20 - Análise das fases originadas do EECB contra o crescimento do parasita <i>Plasmodium falciparum</i> . HM = Hemácias sadias: controle negativo; PF = Parasita sem o extrato: controle de crescimento parasitário: controle positivo; DMSO = Dimetilsulfóxido: controle reagente; Quinina = droga controle.	60
Figura 21 - Análise das frações originadas do EESB contra o crescimento do parasita <i>Plasmodium falciparum</i> HM = Hemácias sadias: controle negativo; PF = Parasita sem o extrato: controle de crescimento parasitário: controle positivo; DMSO = Dimetilsulfóxido: controle negativo; Quinino = droga.	61
Figura 22 - Fluxograma geral do fracionamento e isolamento de substâncias a partir da F(Hex) do EECB.	63
Figura 23 - Análise por CCD da coluna filtrante de F(Hex) eluídas em Hex/AcOEt (6:4) sendo reveladas em vanilina sulfúrica (a) e luz UV 254 nm (b) e 366 nm (c).	64
Figura 24 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da amostra HB.....	65
Figura 25 - Análise por CCD da fração HB com sistema de eluentes DCM/AcOEt (98:02) e revelado com vanilina sulfúrica.....	66
Figura 26 - Análise por CCD da coluna de isolamento da amostra HB ₃ com sistema de eluentes DCM/AcOEt (98:02) e revelado com vanilina sulfúrica.....	67
Figura 27 - Espectros de massas da amostra HB ₃ C analisados em APCI nos modos negativo (a) e positivo (b).	67

Figura 28 - Espectros de massas de fragmentação do pico de m/z 395 da amostra HB ₃ C analisados em APCI no modo negativo.....	68
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹ H da substância HB ₃ C solubilizada em CDCl ₃ , a 500,13 MHz.....	69
Figura 30 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da amostra HC.....	70
Figura 31 - Análise por CCD da coluna de isolamento da amostra HC eluída em CHCl ₃ /AcOEt (8:2) e revelada com vanilina sulfúrica.	71
Figura 32 - Espectro de massas da amostra HC2 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).....	72
Figura 33 - Espectros de MSn da amostra HC2 referente ao pico de m/z 601 ionizado em APCI (-).	73
Figura 34 - Amostra HC24 eluída em CHCl ₃ :MeOH na proporção 20:1 e revelada em UV 254 e 366 nm.	73
Figura 35 - Amostra HC24 eluída em CHCl ₃ :MeOH na proporção 20:1 e revelada em vanilina sulfúrica.	74
Figura 36 - Espectro de RMN ¹ H da substância HC24 solubilizada em CDCl ₃ , a 500,13 MHz. Espectros ampliados no final deste item.....	74
Figura 37 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância HC24 solubilizada em CDCl ₃ , a 125,76 MHz.....	75
Figura 38 – Mapa de correlações de HSQC (a) e HMBC (b) da substância HC24 solubilizada em CDCl ₃	75
Figura 39 - Par tautomérico da Garcinielliptona FC – Substância (1) - 8,8-dimetil-1-(3,4-dihidroxibenzil)-2-hidroxi-3,5-di(d,d-dimetilalil)-7-(2-isopropenilhex-5-enil)-7a-H-trans-biciclo[3.3.1]nona-2-en-4,9diona. Substância (1A) - 8,8-dimetil-1-(3,4-dihidroxibenzil)-4-hidroxi-3,5-di(d,d-dimetilalil)-7-(2-sopropenilhex-5-enil)-7a-H-trans-biciclo [3.3.1]nona-3-en-2,9-diona.....	76
Figura 40 - Correlações entre hidrogênios e carbonos da Garcinielliptona FC.....	76
Figura 41 - Espectro de RMN de ¹ H da substância HC24 solubilizada em CDCl ₃ , a 500,13 MHz.....	78
Figura 42 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância HC24 nas regiões de 17,82 a 4,4 ppm.	79
Figura 43 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância HC24 nas regiões de 2,77 a 1,79 ppm.	80
Figura 44 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância HC24 nas regiões de 1,72 a 1,02 ppm.	81
Figura 45 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância HC24 solubilizada em CDCl ₃ , a 125,76 MHz.....	82
Figura 46 – Mapa de correlação de HSQC da substância HC24 solubilizada em CDCl ₃	83
Figura 47 - Mapa de correlação de HMBC da substância HC24 solubilizada em CDCl ₃	84
Figura 48 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da amostra HC34.....	85
Figura 49 - Análise por CCD da amostra HC34 eluída em Hex:CHCl ₃ :AcOEt (1:7:2) e revelada com vanilina sulfúrica.....	86
Figura 50 - Espectros de massas da amostra HC34-4 analisadas em APCI no modo negativo (a) e positivo (b).	86
Figura 51 - Espectro de RMN de ¹ H da substância HC34-4 solubilizada em CDCl ₃ , a 500,13 MHz.....	87

Figura 52 – Análise por CCD da amostra HC34-23-5 eluída em Hex:CHCl ₃ :AcOEt (1:7:2) e revelada com vanilina sulfúrica.....	88
Figura 53 - Fluxograma do fracionamento e isolamento da Fração HE.....	88
Figura 54 - Imagem “a”: análise por CCD da coluna da amostra HE eluída em CHCl ₃ :AcOEt (1:1); Imgem “b”: análise da amostra HE1A eluída em clorofórmio, acetona e ácido fórmico (75:16,5:8,5) e revelado com cloreto férrico, vanilina sulfúrica e NP-PEG, respectivamente.	89
Figura 55 - Espectro de massas da amostra HE129 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).....	90
Figura 56 - Fluxograma geral do fracionamento e isolamento de substâncias a partir	91
Figura 57 - Análise por CCD da coluna filtrante de F(DCM) eluídas em Hex/AcOEt (2:8) e reveladas com vanilina sulfúrica.	92
Figura 58 - Cristal formado pela substância 6a1 e placa de CCD eluída em CHCl ₃ /MeOH 20:1 e revelada em vanilina sulfúrica.	93
Figura 59- Espectro de massas da amostra 6a1 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).	93
Figura 60 - Espectro de MS2 de m/z 601 da amostra 6a1 na fonte APCI modo negativo.	94
Figura 61 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 6a1 solubilizada em CD ₃ OD a 500,13 MHz.....	94
Figura 62 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 6a1 solubilizada em CD ₃ OD a 125,76 MHz.....	95
Figura 63 – Mapas de correlação de HSQC (a) e de HMBC (b) da substância 6a1 solubilizada em CD ₃ OD.....	96
Figura 64 - Estrutura da 30-epi-cambogina, nome comum da substância, que recebe o seguinte nome oficial: 2H-4a,8-Metano-9H-cicloocta[b]piran-9,11-diona,10-(3,4-dihidroxibenzoil)-3,4,5,6,7,8-hexahidro-2,2,7,7-tetrametil-3,6,8-tris(3-metil-2-buten-1-il)-, (3R,4aS,6R,8R)-	98
Figura 65 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 6a1 solubilizada em CD ₃ OD a 500,13 MHz.....	99
Figura 66 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância 6a1 nas regiões de 7,25 a 3,00 ppm.	100
Figura 67 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância 6a1 nas regiões de 2,70 a 1,80 ppm.	100
Figura 68 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância 6a1 nas regiões de 1,70 a 0,90 ppm.	101
Figura 69 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 6a1 solubilizada em CD ₃ OD a 125,76 MHz.....	102
Figura 70 – Mapa de correlações de HSQC da substância 6a1 solubilizada em CD ₃ OD.	103
Figura 71 - Mapa de correlações de HMBC da substância 6a1 solubilizada em CD ₃ OD.....	104
Figura 72 - Espectro de massas da amostra 7a1 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).	105
Figura 73 - Espectro de MS2 de m/z 541 da amostra 7a1 na fonte APCI modo negativo.	106
Figura 74 - Proposta de fragmentação para as moreloflavonas.....	106
Figura 75 - Espectro de massas da amostra 7c1 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).	107
Figura 76 - Espectro de MS2 de m/z 555 da amostra 7c1 na fonte APCI modo negativo.	108
Figura 77 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 7c1 solubilizada em CD ₃ OD a 500,13 MHz.....	108
Figura 78 - Espectro de ¹³ C da substância 7c1 solubilizada em CD ₃ OD a 125,76 MHz.....	109

Figura 79 – Mapas de correlações de HSQC (a) e de HMBC (b) da substância 7c1 solubilizada em CD ₃ OD.	110
Figura 80 - Estrutura da morelloflavona ([3,8'-Bi-4H-1-benzopiran]-4,4'-diona, 2'-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dihidro-5,5',7,7'-tetrahidroxi-2-(4-hidroxifenil)-, (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-)	112
Figura 81 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 7c1 solubilizada em CD ₃ OD a 500,13 MHz.	113
Figura 82 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância 7c1 nas regiões de 7,35 a 6,62 ppm.	114
Figura 83 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹ H da substância 7c1 nas regiões de 6,43 a 5,61 ppm.	114
Figura 84 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 7c1 solubilizada em CD ₃ OD a 125,76 MHz.	115
Figura 85 – Mapa de correlação de HSQC da substância 7c1 solubilizada em CD ₃ OD.....	116
Figura 86 – Mapa de correlação de HMBC da substância 7c1 solubilizada em CD ₃ OD.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas e uso etnofarmacológico de bacuri..	27
Tabela 2 - Classes de compostos fenólicos em plantas.	37
Tabela 3 - Extratos obtidos por banho ultrassônico a partir das cascas e sementes de bacuri.	49
Tabela 4 - Rendimento das frações originadas do particionamento dos extratos etanólico	55
Tabela 5 - Rendimento da extração sequencial das cascas e sementes de bacuri.	55
Tabela 6 - Comprimentos de onda máximos e absorbância máxima dos extratos e frações de bacuri. (ND= não detectado)	58
Tabela 7 -Porcentagem de morte celular em linhagem celular tumoral de laringe humana (HEp-2). (-) = Não apresentaram morte celular.	62
Tabela 8 - Porcentagem de morte celular em linhagem celular sadia de rins de macaco verde (VERO). (-) = Não apresentaram morte celular.	62
Tabela 9 - Gradiente utilizado na coluna de fracionamento da F(Hex).	64
Tabela 10 - Gradiente utilizado na coluna de isolamento da amostra HB.	65
Tabela 11 - Gradiente utilizado na coluna de isolamento da amostra HB3.	66
Tabela 12 - Gradiente utilizado na coluna de isolamento da amostra HC.	70
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da Garcinielliptona FC (CDCl_3).	77
Tabela 14 - Gradiente utilizado na coluna filtrante da fração F(DCM).	91
Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) da 30- <i>epi</i> -cambogina (CD_3OD).	97
Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância 7c1 - morelloflavona (CD_3OD).	111
Tabela 17 - Valores de CI_{50} apresentados pelas substâncias isolados referentes à atividade antiplasmódica.	118

LISTA DE UNIDADES, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL - microlitro

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

AcOEt - acetato de etila

APCI - Ionização Química à Pressão Atmosférica

BAC-Ac - extratos de cascas de bacuri em acetato de etila

BAC-Hex - extratos de cascas de bacuri em hexano

BAC-Me - extratos de cascas de bacuri em metanol

BAS-Ac - extratos de sementes de bacuri em acetato de etila

BAS-Hex - extratos de sementes de bacuri em hexano

BAS-Me - extratos de sementes de bacuri em metanol

CCA - cromatografia em coluna aberta

CCAFN - cromatografia em coluna aberta de fase normal

CCD - cromatografia em camada delgada

CD₃OD – metanol deuterado

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CIM - concentração inibitória mínima

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

cm – centímetros

d - dubleto

DCM - diclorometano

DMSO - dimetilsulfóxido

δ - deslocamento químico

EECB - extrato etanólico das cascas de bacuri

EESB - extrato etanólico das sementes de bacuri

EM - espectrometria de massas

g - gramas

GC/MS - cromatografia gasosa / espectrometria de massas

GFC - Garcinielliptona FC

h - horas

Hex – hexano

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HOMO - orbital molecular preenchido de mais alta energia

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz - Hertz

IE - impacto eletrônico

IQ - ionização química

LUMO - orbital molecular vazio de mais baixa energia

m - multipletto

m/z - razão massa/carga

MeOH - metanol

mg - miligrama

MHz – megaHertz

min - minutos

mL - mililitros

mm/Hg – milímetros de mercúrio

nm - nanômetros

Q-BiomA - Química de Biomoléculas da Amazônia

Rf – índice de retenção

RMN – ressonância magnética nuclear

s - singleto

SiO₂ - sílica

t - tripleto

UV – Ultravioleta

λ – comprimento de onda

λ_{MAX} - comprimentos de onda máximo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1 Estudos sobre Resíduos de Frutos Amazônicos.....	22
3.2 <i>Platonia insignis</i> Mart. (Bacuri).....	24
3.2.1 Atividades biológicas.....	26
3.2.2 Constituintes químicos	28
3.3 Substâncias fenólicas.....	34
3.4 Métodos Cromatográficos	37
3.4.1 Cromatografia em coluna aberta de fase normal (CCAFN)	38
3.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	39
3.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	41
3.6 Espectrometria de massas (EM)	42
3.7 Avaliação das atividades biológicas	43
3.7.1 Atividade fotoprotetora	43
3.7.2 Atividade antiplasmódica	46
4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA	48
4.1 Coleta do material	48
4.2 Obtenção dos extratos brutos das cascas e sementes de bacuri	48
4.2.1 Pré-fracionamento dos extratos etanólicos	50
4.3 Métodos cromatográficos	50
4.3.1 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos etanólicos	50
4.3.2 Fracionamento cromatográfico dos extratos etanólicos de bacuri	51
4.4 Métodos espectroscópicos e espectrométricos	51
4.4.1 Análise por RMN.....	51
4.4.2 Análise por espectrometria de massas.....	52
4.5 Ensaio biológicos.....	52
4.5.1 Avaliação da atividade fotoprotetora	52
4.5.2 Avaliação da atividade antiplasmódica	53
4.5.3 Teste de citotoxicidade	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

5.1 Obtenção dos extratos.....	55
5.2 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos etanólicos de bacuri.....	56
5.3 Avaliação de atividades biológicas dos extratos.....	57
5.3.1 Atividade fotoprotetora.....	57
5.3.2 Atividade antiplasmódica.....	59
5.3.3 Avaliação do potencial citotóxico em células saudas e células tumorais.....	62
5.4 Fracionamento cromatográfico de EECB-Hex.....	63
5.5 Fracionamento da amostra HB por CCAFN.....	65
5.5.1 Fracionamento por CCAFN da amostra HB ₃	66
5.5.2 Caracterização da amostra HB ₃ C por espectrometria de massas.....	67
5.6 Fracionamento da amostra HC por CCAFN.....	70
5.6.1 Isolamento da amostra HC24.....	71
5.6.2 Identificação da amostra HC24 por RMN.....	74
5.6.3 Isolamento de substâncias a partir da amostra HC34.....	85
5.6.4 Fracionamento da amostra HE por CCAFN.....	88
5.7 Fracionamento cromatográfico do EESB-DCM.....	91
5.7.1 Isolamento da amostra 6a1.....	92
5.7.2 Identificação da substância 6a1 por EM e RMN.....	93
5.8 Isolamento da amostra 7a1.....	105
5.8.1 Caracterização da substância 7a1 por EM.....	105
5.9 Isolamento da amostra 7c1.....	107
5.9.1 Identificação da substância 7c1 por EM e RMN.....	107
5.10 Avaliação da atividade antiplasmódica das substâncias isoladas.....	118
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1. INTRODUÇÃO

A grande quantidade de resíduos agroindustriais produzidos a partir do aumento do consumo de frutos tem se tornado cada vez mais um tema preocupante para os ambientalistas devido ao prejuízo que estes podem causar ao meio ambiente. Visando a resolução desse problema, há um grande interesse de empresários e pesquisadores em investir e estudar uma forma de uso adequado para esses resíduos.

Estudos visando à caracterização física e química dos frutos e a quantificação de componentes bioativos são importantes para o conhecimento do valor nutricional e, do ponto de vista comercial, para agregar valor e qualidade ao produto final (YAHIA, 2010). A avaliação de suas propriedades bioativas reforça sua posição no mercado, atingindo tanto mercados específicos, criados pela demanda dos consumidores por novos produtos capazes de manter a saúde e prevenir doenças, bem como o crescente mercado de ingredientes funcionais (PAZ *et al.*, 2015).

O grupo de pesquisas Q-BiomA - Química de Biomoléculas da Amazônia recentemente vem intensificando os estudos dos extratos de partes de frutos, por exemplo, das espécies *Annona muricata* L. (Graviola), *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Castanha do Brasil), *Caryocar villosum* (Piquiá), *Dioscorea alata* L. (Cará roxo), *Euterpe precatoria* (Açaí), *Euterpe oleracea* (Açaí), *Garcinia madruno* (Bacurizinho), *Paullinia cupana* (Guaraná), *Platonia insignis* Mart (Bacuri), entre outros e, para esses extratos já foram demonstradas atividades antibacteriana, antifúngica e antiplasmódica (BASTOS, 2015).

Dentre os extratos de resíduos de frutos estudados, os de *P. insignis* (Bacuri) têm sido um dos que mais se destacou nos resultados dos testes para avaliação de atividades biológicas despertando, assim, o crescente interesse em estudos de seus componentes químicos. Quando o extrato etanólico de cascas de bacuri foi analisado quanto à presença de substâncias fenólicas, ao potencial fotoprotetor e antioxidante este se destacou em seus resultados

mostrando a importância de se ter um estudo mais aprofundado sobre os constituintes químicos presentes (YAMAGUCHI, 2015). Também foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana e verificou-se que o extrato etanólico das sementes de bacuri demonstrou atividade inibitória para o desenvolvimento de certas bactérias, porém, em concentrações muito elevadas. Contudo, o mesmo extrato demonstrou relevante atividade antimalárica frente à cepa de *Plasmodium falciparum* (BASTOS, 2015).

Os estudos com o fruto do bacuri concentram-se principalmente nos extratos das sementes, utilizados popularmente no tratamento de diarreias, dores de ouvido, problema de pele, doenças inflamatórias, picadas de aranhas e cobras, reumatismos e artrites, assim como por seu afeito cicatrizante e leishmanicida. Estudos realizados com extratos das cascas mostram que esta também possui atividade antileishmania *in vitro*, e extratos da polpa apresentaram atividade antioxidante (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011a; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2012; COSTA JUNIOR *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2010).

Considerando que os extratos de bacuri têm apresentado resultados muito promitentes nos testes para atividades biológicas, esse trabalho teve como proposta realizar o estudo químico dos extratos etanólicos de Bacuri, tendo como alvo o isolamento e a identificação dos constituintes químicos por métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos, e posterior avaliação antimalárica e fotoprotetora das frações e substâncias isoladas, dando continuidade aos trabalhos que já vem sendo realizados com o fruto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar os principais constituintes químicos dos extratos etanólicos das sementes e das cascas do bacuri, que apresentaram atividade antimalárica e fotoprotetora.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos etanólicos das cascas e sementes de Bacuri.
- ✓ Utilizar métodos cromatográficos para fracionar os extratos e isolar os principais constituintes.
- ✓ Identificar as substâncias isoladas por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.
- ✓ Avaliar as atividades antiplasmódica e fotoprotetora dos extratos e das substâncias isoladas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Estudos sobre Resíduos de Frutos Amazônicos

As frutas são conhecidas como ingrediente essencial para uma vida saudável, o que gera um crescente interesse em investigar seus constituintes químicos. Estudos mostram que as frutas são ricas em substâncias bioativas, tais como, fenólicos, vitaminas, carotenoides, minerais, o que amplia o conhecimento do seu potencial caráter medicinal. Essas substâncias, além de serem obtidas por meio do consumo de frutas, também podem ser consumidas pela ingestão de sucos, vinhos, chá verde e preto (HUBER *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2007).

O Brasil está entre os cinco países mais ricos em florestas do mundo apresentando regiões com condições climáticas e solo fértil que proporcionam um bom desenvolvimento de uma grande quantidade de árvores frutíferas (PAZ *et al.*, 2015; FAO, 2010; PEREIRA, 2015). A floresta Amazônica se destaca por apresentar uma rica biodiversidade contendo plantas e frutas já conhecidas cientificamente e outras que ainda estão sendo estudadas, visto que são utilizadas por povos indígenas para curar algumas inflamações e até doenças degenerativas como o diabetes. As frutas Amazônicas são fonte de substâncias bioativas, por exemplo, o açaí (*Euterpe oleracea*), que apresenta elevada atividade antioxidante, pois é rico em antocianinas e tocoferóis, entre outras substâncias. A atividade antioxidante vem sendo objeto de vários estudos e pesquisas considerando que esta é muito importante para a saúde humana (SILVA *et al.*, 2007; PAZ *et al.*, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, para ter uma vida saudável, além de outros requisitos alimentares e a prática de atividades físicas, é preciso que seja ingerida uma quantidade de 400 g frutas e legumes diariamente, no mínimo (OMS, 2003).

A divulgação do potencial nutritivo e curativo das frutas resultou no aumento de seu consumo nos últimos anos e, com isso, ocorreu também um aumento na produção de resíduos agroindustriais.

A indústria de alimentos, em especial a de processamento de frutos, gera uma grande quantidade de resíduos que, dependendo do tipo da fruta processada, pode ser formado por cascas, caroços ou sementes e bagaço. O descarte da biomassa é um grande problema das indústrias, pois, mesmo sendo material biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser degradada, sem o qual resulta em poluição de rios e florestas. Estima-se que as frutas geram cerca de 30 a 40% de resíduos no processo de despulpamento (HUBER *et al.*, 2012; SOUSA, 2011).

Buscando uma forma de utilizar os recursos naturais disponíveis sem destruir o meio ambiente, tem-se trabalhado na elaboração de projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. A indústria de alimentos tem uma grande produção de diversos resíduos, com alto valor de utilização e reutilização. Portanto, estudos utilizando resíduos do processamento de alimentos têm sido realizados de maneira crescente visando o aproveitamento destes, levando a uma redução no impacto ambiental e ainda agregando valor a esses produtos do mercado (PEREIRA, 2015).

O grupo de pesquisas Q-BiomA - Química de Biomoléculas da Amazônia, pertencente à Universidade Federal do Amazonas, vem investindo em projetos que visam o estudo químico e biológico dos resíduos gerados por frutos Amazônicos.

Recentemente, foi realizado o estudo dos resíduos de 19 frutos da Amazônia, os quais apresentaram uma grande quantidade de substâncias bioativas. Alguns deles apresentaram ótimos resultados em atividades biológicas tais como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras. Dentre os frutos estudados, a *P. insignis* (Bacuri) está entre os três que apresentaram os melhores resultados (YAMAGUCHI, 2015; BASTOS, 2015).

3.2 *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)

O bacurizeiro é uma árvore pertencente à família Clusiaceae, também conhecida como família Guttiferaceae, subfamília Clusioideae e a espécie é classificada como *Platonia insignis* Mart.. Pode atingir mais de 30 metros de altura, com tronco de até 2 metros de diâmetro nos indivíduos mais desenvolvidos (FERREIRA *et al.*, 2012; HOMMA *et al.*, 2010).

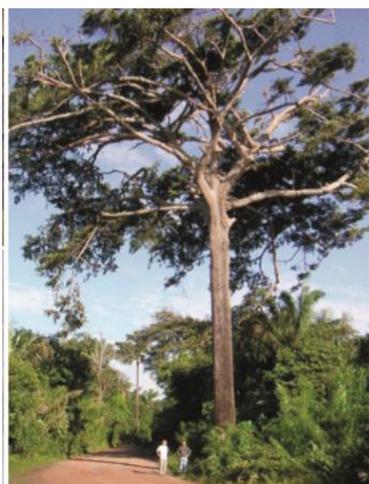


Figura 1 - Bacurizeiro.
Fonte: HOMMA *et al.* (2010)

É bastante conhecida pelos frutos que produz e por possuir madeira considerada nobre podendo ser utilizada na fabricação de móveis, caibros, ripas, estacas, embalagens pesadas e tacos que, segundo dados da literatura, no final dos anos 80, o volume de madeira produzido a partir dessa espécie no pólo madeireiro de Paragominas-PA superava os de outras essências florestais bem mais conhecidas na época, tais como o marupá (*Simaruba amara*), a andiroba (*Carapa guianensis*) e o acapu (*Vouacapoua americana*) (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Essa árvore encontra-se em estado silvestre nas matas de terra firme da Amazônia, estendendo-se por um vasto território desde a ilha de Marajó, na foz do rio Amazonas, perpassando o Piauí, a costa do Maranhão e do Pará. Algumas destas regiões são nomeadas e conhecidas como "bacurizais", pois possuem áreas que são amplamente preenchidas por esta árvore. Estes espaços são resultantes das constantes derrubadas para plantio de culturas, as

quais ocorrem anualmente. Para alguns, o bacurizeiro chega a ser considerado como uma verdadeira "praga" dos roçados. Tal fato é compreendido dado à característica do bacurizeiro, o qual é uma das poucas espécies amazônicas que apresenta reprodução sexuada (sementes) e assexuada (brotações oriundas de raízes) (HOMMA *et al.*, 2013; CALZAVARA, 1970).

A possibilidade de rebrotamento do bacurizeiro pode ser considerada uma nova alternativa para as áreas degradadas no Pará, Maranhão e Piauí, pois, por meio do manejo, considerando o espaçamento recomendado do plantio (em triângulo equilátero de 10 metros de lado, possibilitando a limpeza em três direções e maior número de plantas por hectare) e seu tempo de germinação que é de 50 dias, seria possível a preservação dessas áreas, visto que a densidade de bacurizeiros em início de regeneração chega a alcançar 40 mil plantas/hectare (HOMMA *et al.*, 2013; CALZAVARA, 1970).

Em relação ao período de floração e frutificação, os bacurizeiros originados de sementes iniciam a partir do 15º ao 18º ano após o plantio, dependendo bastante das condições do solo e sementes utilizadas. Já as mudas originadas de brotação da raiz de plantas adultas, iniciam sua produção após o 5º ano, desde que seja eliminada a concorrência das plantas vizinhas (CALZAVARA, 1970).

O fruto da *P. insignis* é um dos mais populares da região amazônica. Sendo pouco maior que uma laranja contendo polpa agridoce rica em potássio, fósforo e cálcio, que é consumida diretamente ou utilizada na produção de doces, sorvetes, sucos, geleias, licores e outras iguarias. Sua casca, de cor amarelo-citrina, também é aproveitada na culinária regional (HOMMA *et al.*, 2013; AGUIAR *et al.*, 2008).



Figura 2 – Bacuri, o fruto do bacurizeiro.
Fonte: HOMMA *et al.* (2010)

O bacuri é uma baga inoculada, com formato arredondado, ovalado ou achatado, contendo em seu interior de uma a cinco sementes envolvidas pelo endocarpo, que se constitui na parte comestível do fruto constituído em grande parte pelo epicarpo e mesocarpo, os quais, em conjunto, constituem a casca do fruto, com espessura variando entre 0,7 cm e 2,0 cm. A casca representa aproximadamente 70% do peso do fruto, vindo a seguir as sementes, cuja participação varia de 13% a 26%. A polpa é a parte do fruto de menor proporção representando cerca de 10% a 18% do peso do fruto (CARVALHO *et al.*, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 1992).

Há relatos de que a procura pela polpa de bacuri aumentou com a crescente exposição do mercado de frutas amazônicas pelos meios de comunicação, tanto no país como no exterior. Isso levou a um aumento do seu valor no mercado tendo o quilo de polpa passado de R\$ 10,00 para R\$ 20,00 em 2005 (HOMMA *et al.*, 2013).

3.2.1 Atividades biológicas

Segundo Yamaguchi e colaboradores (2014), em uma revisão publicada na revista on line “Scientia Amazonia”, diversos relatos sobre atividades biológicas e uso etnofarmacológico de Bacuri são encontrados na literatura e estes foram organizados de maneira resumida na tabela 1.

Parte do fruto	Atividade biológica
Semente	Diarreia, problemas de pele, dores de ouvido; Picadas de insetos, aranhas e cobras; Reumatismos e artrites; Cicatrizante; atividade leishmanicida; Antioxidante; Anti-inflamatória; citotoxicidade em <i>Artemia salina</i> ; efeito genotóxico em fibroblastos de pulmão de hamster chinês; Atividade anticonvulsivante;
Polpa	Atividade antioxidante
Casca do tronco	Tratamento de eczemas, vírus da herpes e tratamento de dermatites.
Garcinielliptona FC (GFC)	Ação antioxidante <i>in vitro</i> pelos métodos TBARS, sequestro de radicais hidroxilas (OH) e óxido nítrico (NO), atividade citotóxica e leishmanicida.

Tabela 1 - Atividades biológicas e uso etnofarmacológico de bacuri. Fonte: Extraída na íntegra do artigo de YAMAGUCHI, *et al.* (2014).

Recentemente, no grupo de pesquisas Q-BiomA foram realizados estudos com os extratos etanólicos das cascas de bacuri quanto ao potencial fotoprotetor e antioxidante em células e estes apresentaram resultados promitentes (YAMAGUCHI, 2015). Também foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana e verificou-se que os extratos etanólicos de bacuri demonstraram atividades moderadas frente às cepas de *Bacillus liquiniformes* e *Bacillus subtilis* (bactérias Gram-positivas), e do fungo *Candida albicans* nos testes de difusão, porém quando submetido ao teste de CIM (concentração inibitória mínima) a melhor atividade foi observada no extrato das sementes frente ao *B. subtilis*, os demais extratos não foram capazes de inibir nas concentrações consideradas ativass. Contudo, o mesmo extrato, testado juntamente com extratos de outros frutos, demonstrou relevante atividade frente à cepa de *Plasmodium falciparum*, sendo que as porcentagens de inibições antimaláricas foram similares nas concentrações de 50 e 12,5 µg/mL, como pode ser observado na figura 3 (BASTOS, 2015).

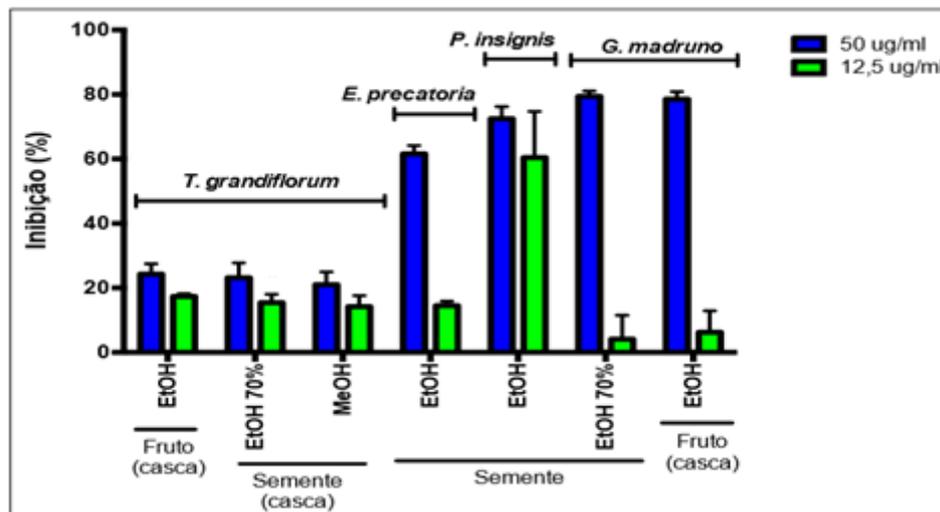


Figura 3 – Percentual da atividade antimicrobiana dos extratos de *Theobroma grandiflorum*, *Euterpe precatoria*, *Garcinia madruno* e *Platanus insignis*.
Fonte: Extraída na íntegra de BASTOS, 2015.

Em outro estudo foi realizada a avaliação dos efeitos citotóxicos e imunomoduladores *in vitro* do extrato hexânico das sementes de bacuri em macrófagos peritoneais de murinos. O extrato apresentou baixa toxicidade para macrófagos, bem como para eritrócitos. Observou-se uma forte atividade imunomoduladora através de um acentuado aumento da produção de NO, da capacidade fagocitária e do volume lisossômico (LUSTOSA, *et al.*, 2016).

3.2.2 Constituintes químicos

Pesquisas recentes realizadas com os extratos metanólicos da polpa desse fruto mostram que esse apresenta muitas substâncias químicas como flavonoides, antocianinas, vitamina E, vitamina C e polifenóis (RUFINO *et al.*, 2010) sendo os dois últimos considerados como as principais substâncias bioativas do fruto (CLERICI & CARVALHO-SILVA, 2011). O extrato da polpa apresentou relevante efeito antioxidante que se deve à presença da vitamina C (Figura 4) e substâncias fenólicas. Ao ser medido o teor de substâncias bioativas presentes pode-se observar que este apresenta cerca de 0,2 mg de vitamina C /100 g da polpa, e de fenólicos totais cerca 0,4 mmol/L de ácido gálico / 100 g de

amostra (RUFINO *et al.*, 2010; CANUTO *et al.*, 2010). Porém, essa quantidade de vitamina C não é tão significativa quando comparada a quantidade encontrada em frutos como a acerola, que apresenta cerca de 378,5 mg/ 100 g da polpa (CANUTO *et al.*, 2010).

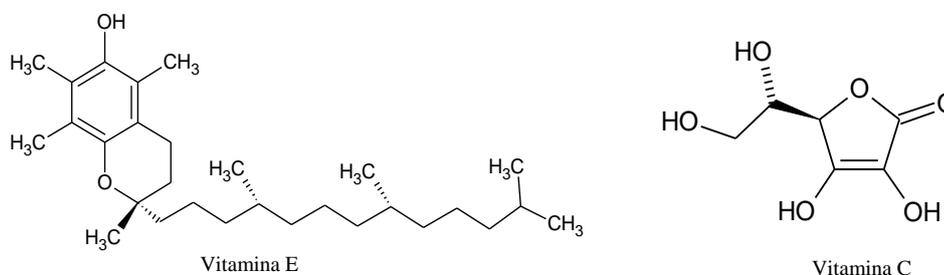


Figura 4 – Substâncias químicas encontradas nos extratos metanólicos da polpa de bacuri.
 Fonte: RUFINO *et al.* (2010).

Um estudo realizado sobre a composição química da polpa de bacuri, araçá-boi (*Eugenia stipitata*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) mostram que dentre estes o bacuri é o que apresenta maior quantidade de minerais como Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e de açúcares como glicose e frutose (Figura 5). Como principais aminoácidos, a polpa do bacuri apresentou os ácidos aspártico e glutâmico (Figura 5) (ROGEZ *et al.*, 2004).

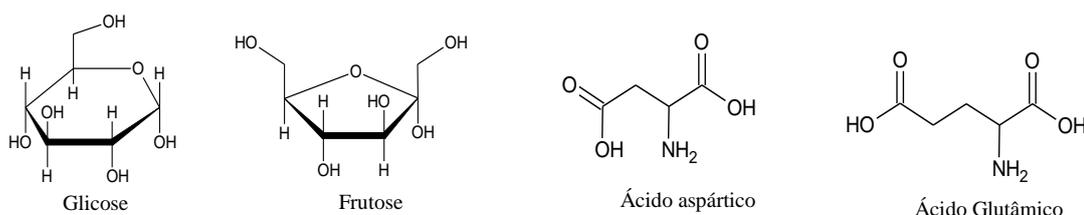


Figura 5 - Substâncias químicas encontradas na polpa de bacuri utilizando diferentes modos de extração.
 Fonte: ROGEZ *et al.* (2004).

Estudos voltados para identificação de substâncias voláteis da polpa e das cascas de bacuri apresentam substâncias aromáticas como alcoóis terpênicos, tendo como majoritário o linalol (Figura 6). Também observou-se a presença de hepta-2-ona e o acetato de *cis*-3-hexenila, presentes em quantidades relativamente pequenas, hexe-3-eno-1-ol e o derivado monoterpeneo acetato de linalol que são apresentados como responsáveis pelo sabor do bacuri.

Os outros voláteis identificados são os óxidos de (*Z*) e (*E*) linalol, pentan-2-ona e nonan-2-ona, dodecanoato de metila, terpineol, 3,7-dimetil-octa-1-eno-3,7-diol, eugenol e vários outros hidrocarbonetos, incluindo o bisaboleno, metil-2-heptano, nonacosano e o citrato de trimetila (Figura 6) (BOULANGER *et al.*, 1999; ALVES & JENNINGS, 1979).

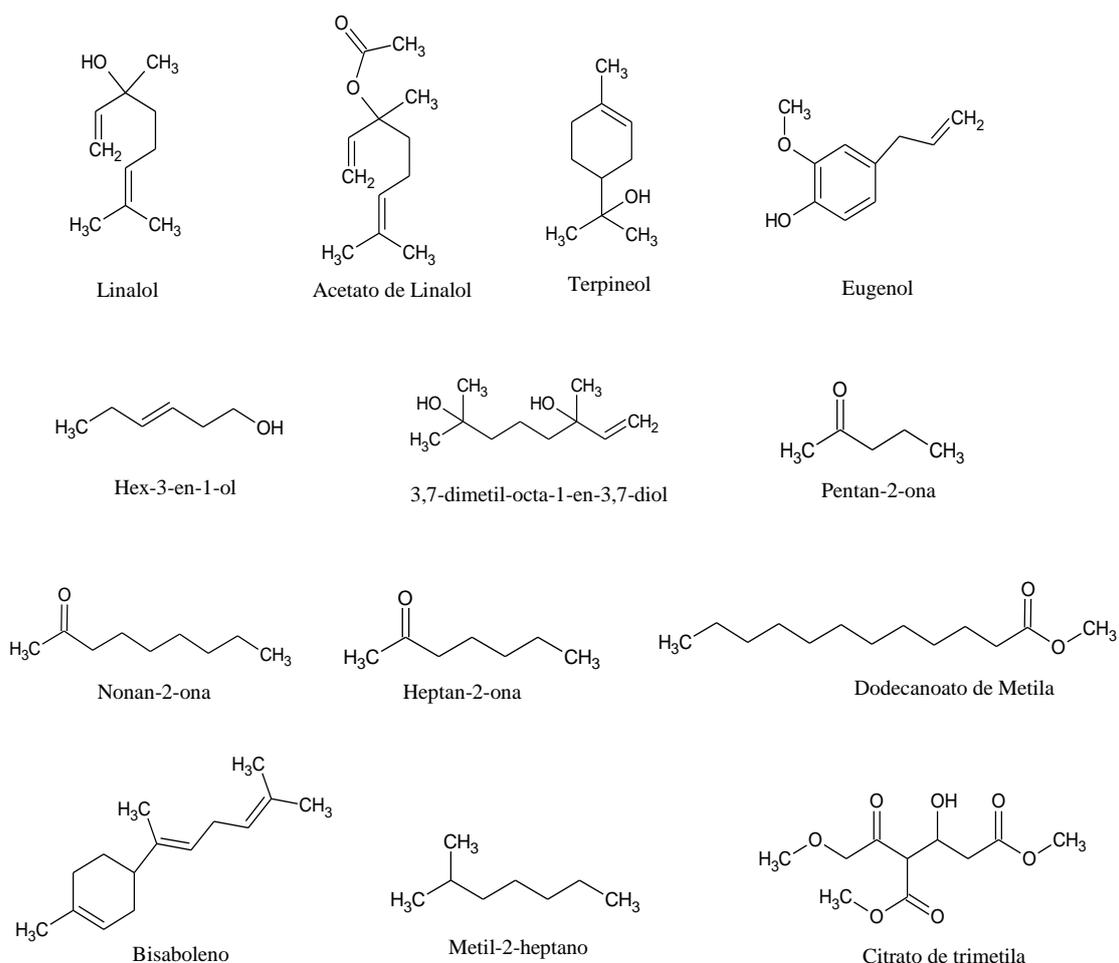


Figura 6 - Substâncias voláteis isoladas dos extratos da polpa e cascas de bacuri.
Fonte: BOULANGER *et al.* (1999); ALVES & JENNINGS (1979).

Os extratos das cascas de bacuri apresentam cerca de 1,3% de euxantona (Figura 7), substância responsável por apresentar atividades antiretroviral, anti-inflamatória e antitumoral (ROBERTS, 1961; BOULANGER *et al.*, 1999). A fração metanólica apresenta um biflavonoide, morelloflavona, tipo flavanona (3→8^{''})-flavona, que é descrita na literatura como um dos principais metabólitos responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas apresentadas em espécies da família Clusiaceae (FERREIRA *et al.*, 2012).

Também foi relatada a presença de cerca de 6,0% de pectina, mas essa não é uma quantidade muito relevante em comparação com alguns outros frutos, como exemplo, o limão tahiti (*Citrus latifolia Tanaka*) que apresenta 22,85% de pectina, porém, quando comparado a novas fontes de pectina como o maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), que apresenta cerca de 2,10%, pode ser bem aproveitado. Essa fibra é utilizada como espessante e geleificante em produtos alimentícios sendo mais utilizada por apresentar baixo valor calórico, em substituição aos amidos modificados, tradicionalmente usados como espessantes. O bacuri apresentou cerca de 2,47 g de proteínas totais / 100 g nas cascas e 3,15 g / 100 g nas sementes. Comparado aos valores de outras frutas comuns, por exemplo, a banana prata (*Musa balbisiana*), que possui um teor de proteínas de 1,3%, e o abacate, com 1,2% apresentou valores superiores. Na avaliação do perfil de minerais, os extratos de cascas e de sementes apresentaram elevados teores de Mg^{+2} , Mn^{+2} , Na^{+} , K^{+} e Ca^{+2} (SOARES, 2010).

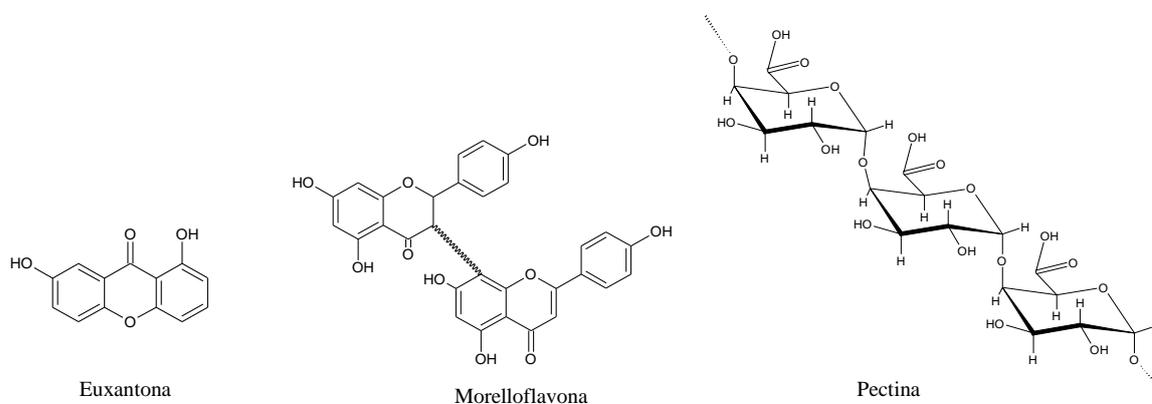


Figura 7 - Substâncias isoladas dos extratos metanólico e etanólico das cascas de bacuri.
 Fonte: ROBERTS (1961); YAMAGUCHI (2015); SOARES (2010).

O efeito antioxidante tem sido citado como um dos principais benefícios obtidos pelo consumo de frutos sendo este associado à presença de substâncias fenólicas, por isso, a busca por caracterizar estas substâncias em resíduos de frutos tem sido intensificada. Experimentos utilizando a espectrometria de massas relatam que no extrato etanólico do epicarpo de bacuri foi detectado um pico característico do ácido cafeico e, no extrato etanólico do mesocarpo

foram detectados picos correspondentes às massas de resveratrol, pelargonidina e os ácidos caftárico e clorogênico (Figura 8) (YAMAGUCHI, 2015).

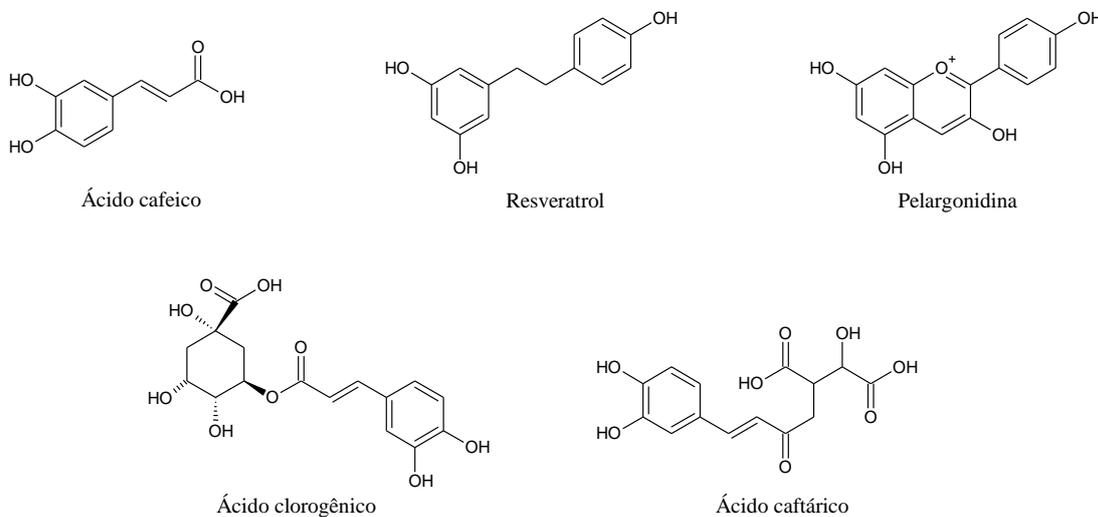


Figura 8 - Substâncias fenólicas caracterizadas por espectrometria de massas a partir dos extratos etanólicos de bacuri. Fonte: YAMAGUCHI (2015).

Estudos sobre a fração oleosa das sementes de bacuri apresentaram uma mistura de ácidos graxos (Figura 9) como o ácido palmítico, representando 44,2%, ácido palmitolênico, com 13,2%, ácido esteárico, com 2,3%, ácido oleico, com 37,8%, e ácido linoleico com 2,5%, além de ácido linolênico, com 10% (BENTES *et al.*, 1986; SOARES, 2010). Também foram relatadas as presenças de álcoois graxos (Figura 9) como o eicosanol e o octadecanol e hidrocarbonetos C₁₅, C₂₅ e C₂₈ (YAMAGUCHI, *et al.*, 2014). Essa fração oleosa apresentou efeito cicatrizante ao ser testada em feridas cutâneas de ratos (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2010). Do extrato hexânico das sementes de bacuri foi isolado o triglicérideo 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) (Figura 9) (SANTOS, *et al.*, 2013).

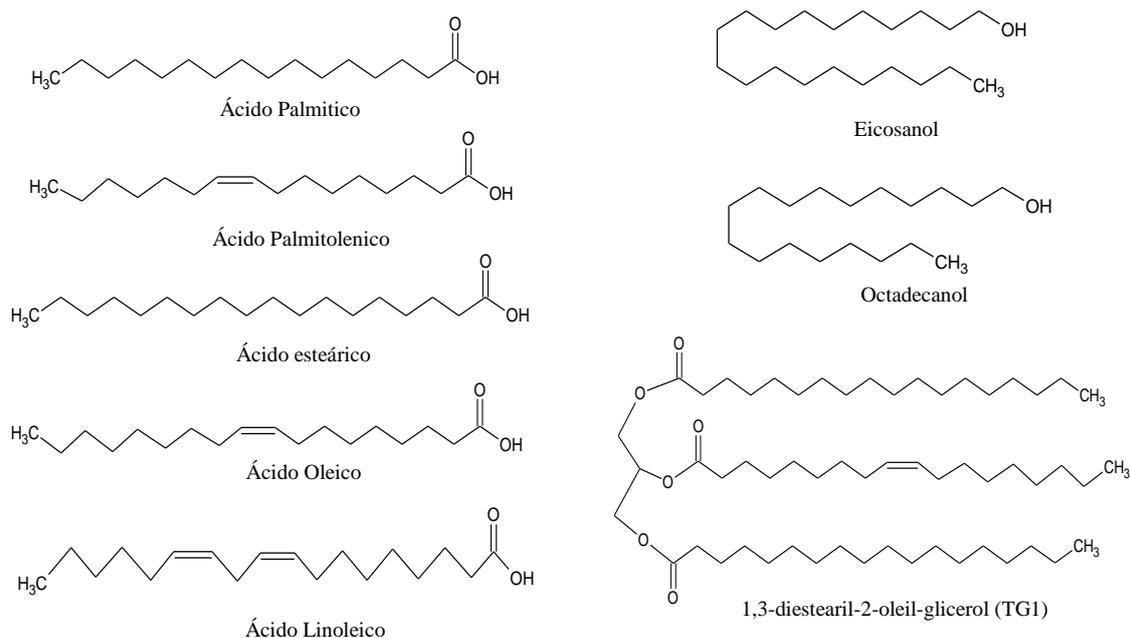


Figura 9 - Compostos químicos isolados da fração oleosa das sementes de bacuri.
 Fonte: BENTES *et al.* (1987); YAMAGUCHI, *et al.* (2014); SANTOS, *et al.* (2013).

Foram detectados também diterpenos de esqueletos caurano e labdano na fração de baixa polaridade das sementes de bacuri (Figura 10) (YAMAGUCHI, *et al.*, 2014).

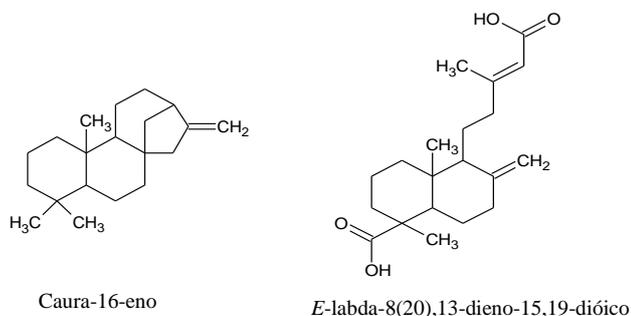


Figura 10 - Diterpenos isolados das sementes de bacuri.
 Fonte: YAMAGUCHI, *et al.* (2014).

Nas frações em diclorometano e acetato de etila foram realizadas análises por cromatografia gasosa / espectrometria de massas (CG/EM), e foram relatados como compostos majoritários as xantonas 1,3,5,6-tetrahydroxi-2-(2-metilbut-3-en-2-il)-7-(3-metilbut-2-enil)xanten-9-ona (gamma-mangostin), 1,3,6-trihidroxi-7-metoxi-2,8-bis(3-metilbut-2-enil)xanten-9-ona (alpha-mangostin) e 1-hidroxi-3,5,6-trimetoxi-xanten-9-ona

(Figura 11). Essas frações apresentaram efeito antioxidante, um efeito tóxico contra o microcrustáceo *Artemia salina* e promastigota *Leishmania amazonensis*, efeito anticonvulsivante que podem ser atribuídos à presença das xantonas (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011a; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011c; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013).

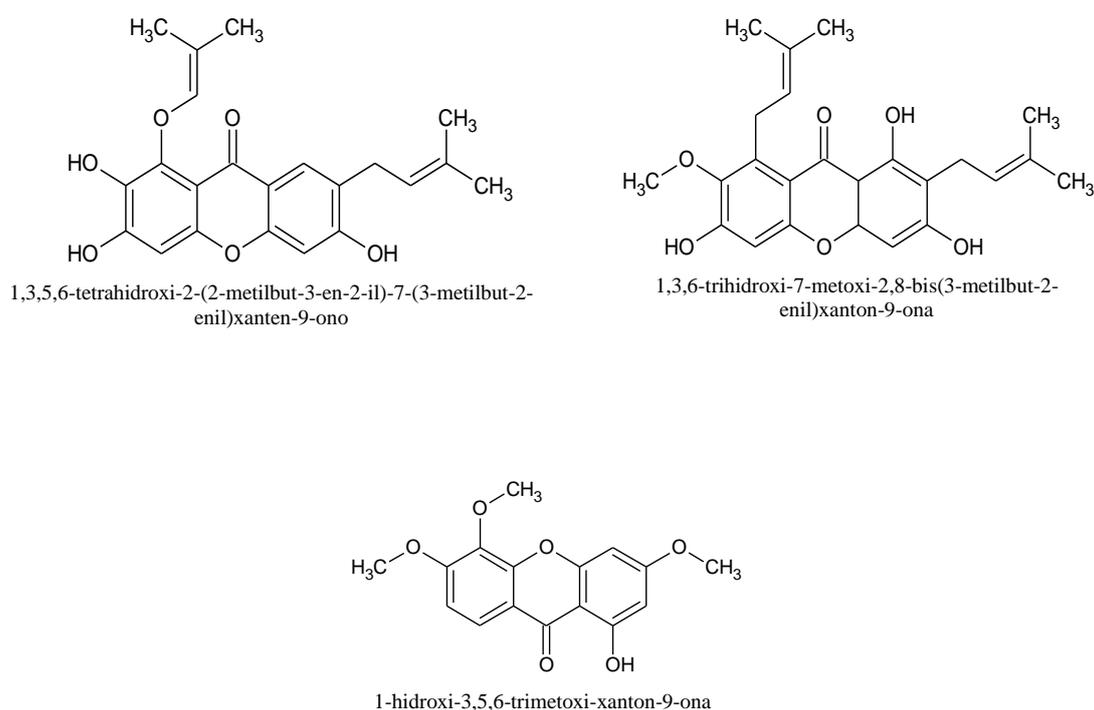


Figura 11 - Xantonas isoladas das frações em diclorometano e acetato de etila originadas do extrato etanólico das sementes de bacuri. Fonte: YAMAGUCHI *et al.* (2014).

3.3 Substâncias fenólicas

As substâncias fenólicas são responsáveis pelo crescimento e reprodução dos vegetais contribuindo na sua pigmentação e agindo como antipatogênicos. e, em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. Esses compostos se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO & JORGE, 2007).

As substâncias fenólicas são encontradas em grande quantidade nas frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, e outras como a cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Outros alimentos como a pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são ricas fontes destas substâncias (ANGELO & JORGE, 2007).

São consideradas substâncias fenólicas aquelas substâncias vegetais que apresentam um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila (OH) como substituintes. Esses compostos são geralmente encontrados no vacúolo celular, são mais frequentemente associados aos açúcares e tendem a ser solúveis em água (HARBONE, 1998).

Essas substâncias são sintetizadas a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido mevalônico e a via do ácido chiquímico que é considerada a mais importante para os vegetais (POMPEU, 2007).

Pode-se notar que pela condensação do fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato é formado o ácido chiquímico, que é o precursor dos aminoácido aromáticos: triptofano, fenilalanina e tirosina. Estes são os precursores de vários alcaloides. Observa-se também que um dos primeiros grupos de substâncias fenólicas formados são os fenilpropanoides que, geralmente são voláteis, sendo considerados juntamente com os monoterpenos e óleos essenciais. A formação dos substâncias fenólicas se dá pela presença da enzima fenilalanina amônio lipase (PAL) que retira o grupo amina do aminoácido dando origem ao ácido cinâmico (DEWICK, 2009; POMPEU, 2007).

Já foi encontrada uma diversidade estrutural de substâncias fenólicas nos vegetais, isso porque ocorre uma grande variedade de combinações na natureza. Essas combinações dão origem ao que se chama de classes de fenólicos que podem ser observadas na tabela 2 (ANGELO & JORGE, 2007).

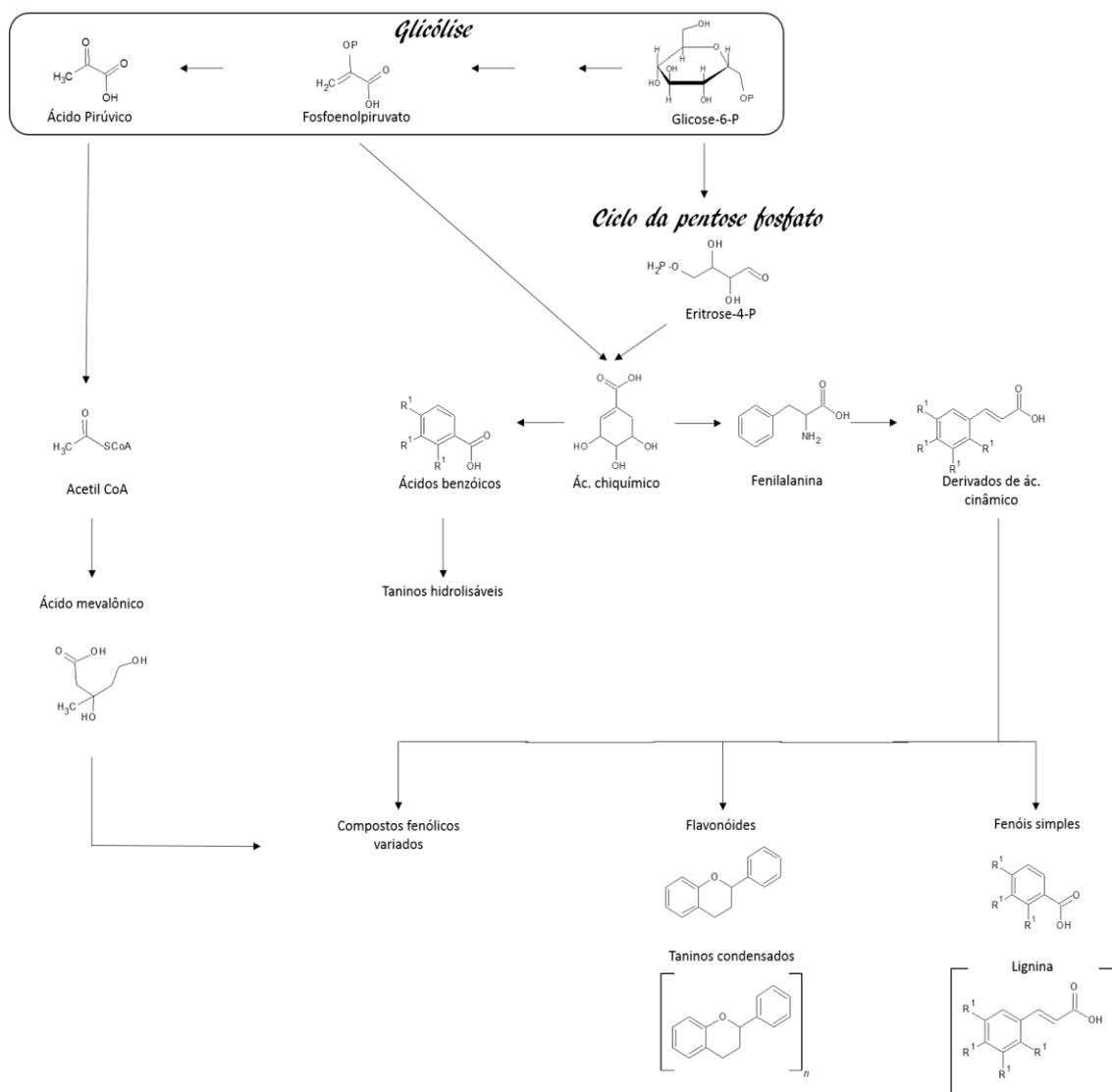


Figura 12 – Rota biossintética de substâncias fenólicas.
 Fonte: Adaptado de DEWICK (2002) e POMPEU (2007).

Os flavonoides formam o maior grupo de fenólicos conhecidos dentre as substâncias naturais, assim como também podem ser citados os fenólicos simples como monocíclicos, fenilpropanóides e as quinonas fenólicas que aparecem em quantidades relevantes nos vegetais (HARBONE, 1998).

Os fenólicos que se destacam como antioxidantes de fontes naturais são os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007).

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzoicos	C_6-C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Tabela 2 -Classes de compostos fenólicos em plantas.
Fonte: ANGELO & JORGE (2007).

Os métodos espectrais são bastante importantes para a identificação e análise quantitativa de fenóis, considerando que estes absorvem as radiações UV curtas e podem ser detectados à luz do comprimento de onda de 253 nm, sob a forma de manchas absorventes escuras nas placas espalhadas com gel de sílica contendo um indicador fluorescente (HARBONE, 1998).

3.4 Métodos Cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico de separação que se baseia na migração diferencial dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase estacionária, que é a parte fixa onde alguns componentes da mistura podem ficar retidos, e a fase móvel, que pode ser um líquido ou um gás que interage com alguns componentes da mistura e os transporta por entre a fase estacionária. A diferença de migração ocorre devido a diferentes interações entre as duas fases e as substâncias que existem na mistura. As diversas combinações entre as fases móvel e estacionária faz com que essa técnica seja muito eficiente na separação de misturas (DEGANI, *et.al.*, 1997).

3.4.1 Cromatografia em coluna aberta de fase normal (CCAFN)

A cromatografia em coluna aberta (ou cromatografia clássica – CC – como também é conhecida) é um método bastante utilizado para isolamento de produtos naturais. É realizada em um tubo cilíndrico de vidro com medidas de altura e diâmetro que dependem da quantidade de amostra e de qual tipo de análise deseja-se realizar (DEGANI *et al.*, 1997). Esta se utiliza de fases estacionárias sólidas que podem ser a sílica (SiO_2) e a alumina (Al_2O_3), adsorventes que também podem servir apenas como suporte para uma fase estacionária líquida. No caso do uso de fases estacionárias sólidas esse processo é classificado como cromatografia por adsorção, e com fase estacionária líquida, cromatografia por partição. Com o uso da cromatografia de fase quimicamente ligada a cromatografia por partição se tornou menos usual, pois, quando comparadas, apresentou menor estabilidade na análise (DEGANI *et al.*, 1997).

As interações que ocorrem entre o soluto, a fase móvel e a fase estacionária podem ser interações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Wan der Waals, entre outras. Essas interações é que norteiam as separações das misturas e definem qual modo será usado na análise, se modo reverso, normal, por pareamento de íons ou por troca iônica e/ou por exclusão (CASS & DEGANI, 2001).

No modo normal as fases estacionárias são mais polares que a fase móvel e estas podem ser adsorventes orgânicos (sílica ou alumina) ou fases polares quimicamente ligadas (ciano, diol, fenil, amino) (CASS & DEGANI, 2001).

As fases estacionárias sólidas apresentam partículas com tamanhos entre 60-230 mesh, que possibilitam um fluxo razoável da fase móvel dentro da coluna, considerando que esse fluxo depende da gravidade. Neste método, as frações individuais das amostras são manualmente recolhidas. Também pode ser feito o uso de sílica de partícula menor (230-400 mesh) como adsorvente, porém, para essas colunas é necessário o uso de um sistema de

bombeamento para o empacotamento e eluição e esta são chamadas de Cromatografia Flash (DEGANI, *et al.*, 1997; SNYDER & KIRKLAND, 1979).

A escolha do sistema de eluição segue os princípios da cromatografia em camada delgada - CCD podendo ser alterado no decorrer da análise (DEGANI, *et al.*, 1997).

3.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção em que a separação se dá pela interação entre os componentes de uma mistura, a fase estacionária e a fase móvel. Comparada a CC é um método mais simples, muito mais econômico e mais rápido, durando cerca de 30 a 60 minutos de análise, portanto tornou-se predominantemente escolhido para o acompanhamento de reações orgânicas, sendo também muito utilizada tanto na escala analítica quanto na preparativa (DEGANI *et al.*, 1997; SNYDER & KIRKLAND, 1979).

A amostra é aplicada com bastante facilidade, porém, a escolha da fase móvel não é tão simples. Considerando que as fases estacionárias mais usadas são bastante polares não se deve usar solventes muito apolares, pois estes não removem os compostos do ponto de aplicação, nem usar os muito polares, pois estes são capazes de arrastar os componentes da amostra até o topo da placa. Portanto, a opção que apresenta melhores resultados na separação das substâncias é a mistura de solventes formando um sistema de polaridade média em relação à polaridade dos componentes da amostra (DEGANI *et al.*, 1997; SNYDER & KIRKLAND, 1979).

O fluxo da fase móvel inicia colocando a placa, já com a amostra aplicada, em uma cuba ou outro recipiente fechado com uma pequena quantidade de solvente. O fluxo de solvente ocorre por capilaridade, sem a necessidade de intervenção do operador, contra a força da gravidade (SNYDER & KIRKLAND, 1979).

A revelação das placas pode ser feita usando os processos destrutivos e não destrutivos. Os processos não destrutivos mais usados são com a utilização de substâncias fluorescentes misturadas à sílica, quando na preparação da placa, que possibilita a revelação dos compostos em câmaras de luz UV, ou, pode-se utilizar o iodo, considerando que este forma um complexo com compostos insaturados, de modo que placas que contenham estes compostos, ao serem colocadas em uma câmara com cristais de iodo, apresentam pontos amarronzados. Já os processos destrutivos ocorrem quando é aplicada sobre a placa (já eluída) uma solução aquosa de um oxidante orgânico ou um ácido mineral e estas são submetidas a altas temperaturas, cerca de 100 °C. Os compostos orgânicos oxidados são revelados na forma de manchas coloridas (DEGANI *et al.*, 1997).

Um exemplo comumente utilizado em estudos com produtos naturais é a identificação de compostos fenólicos simples por meio de CCD. Esses compostos podem ser detectados por meio das cores verdes, roxas, azuis ou pretas intensas, utilizando uma mistura aquosa fresca de 1% de cloreto férrico e 1% de ferricianeto de potássio (HARBONE, 1998). Porém, esse método não é tão específico quanto a classe de fenólicos, pois a análise apresenta problemas com a instabilidade de soluções diluídas de cloreto férrico, causando o aumento da absorbância na presença de solventes orgânicos e a impregnação da cor azul na vidraria utilizada, incluindo as cubetas do espectrofotômetro (ANGELO & JORGE, 2007). A vanilina-HCl (1 g de vanilina em 10 ml de HCl concentrado) e vanilina-H₂SO₄ (10% de vanilina em EtOH e H₂SO₄-conc, 2:1) dão uma gama de cores cor-de-rosa com derivados de resorcinol e floroglucinol. O reagente de Gibbs (cloridrato de 2,6-dicloroquinona a 2% em clorofórmio) seguido de fumagem da placa com NH₄OH 2M dá uma variedade de cores com diferentes fenóis (HARBONE, 1998). Pode-se também optar por detectá-los utilizando um reagente mais específico, sendo citado como o melhor o reagente de Folin-Ciocalteu que está disponível no mercado como uma solução de pulverização. Com o uso desse reagente os

fenóis como catecol ou núcleos de hidroquinona aparecem como pontos azuis imediatamente após a pulverização. Outros fenóis aparecem como pontos azuis a cinzentos quando é aplicado na placa o vapor de amônia (HARBOME, 1998).

Apesar de essa ser uma técnica muito mais conveniente e vantajosa por sua simplicidade, também apresenta limitações como a baixa capacidade para separação preparativa e dificuldade para quantificação quando comparada à técnicas mais modernas (SNYDER & KIRKLAND, 1979).

3.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das mais importantes técnicas de análises químicas, pois, é capaz de identificar diferentes núcleos atômicos sendo capaz de prever quais e quantos átomos estão formando a estrutura de determinada substância.

Essa técnica se utiliza de uma propriedade existente em muitos núcleos atômicos, o spin, que descreve os núcleos como se estivessem girando em diferentes sentidos. O núcleo mais comumente estudado é o do hidrogênio (próton), onde é possível verificar quantos e quais de seus isótopos estão presentes na substância e, também prever qual ambiente químico estes se encontram. Outro exemplo é o estudo com os núcleos de carbono (PAVIA *et al.*, 2015).

Esse fenômeno ocorre quando sobre determinada substância é aplicado um campo magnético externo e este fica alinhado com o spin do núcleo atômico fazendo com que esse absorva energia e mude sua orientação de spin em relação ao campo aplicado.

Em alguns casos, apenas usando os dados das análises em RMN e IV já é o bastante para elucidar estruturas moleculares (PAVIA *et al.*, 2015).

3.6 Espectrometria de massas (EM)

A espectrometria de massas (EM) é um método ainda mais antigo que os citados anteriormente, porém, apresenta-se como um destaque entre os métodos analíticos modernos. Assim como CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), também é utilizada em vários campos das ciências, como exemplo, na indústria farmacêutica que na produção de medicamentos utiliza a EM na análise de identificação das substâncias importantes para o desenvolvimento sintético dos medicamentos (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

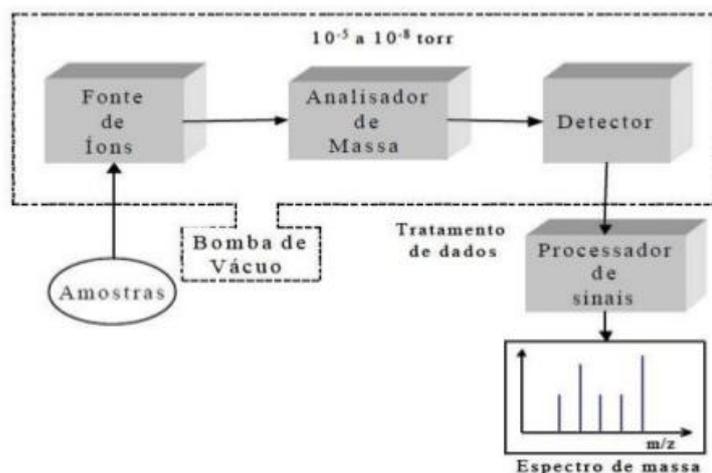


Figura 13 - Componentes básicos de espectrômetro de massas.

A figura acima apresenta os cinco componentes básicos de um espectrômetro de massas. Primeiramente tem-se a unidade de entrada da amostra, que é onde a amostra é levada para o ambiente de baixa pressão, pois, em um espectrômetro de massas as pressões são muito baixas na fonte de ionização e menores ainda nas regiões do analisador de massa e do detector. A partir daí, a amostra é direcionada para a fonte de íons, compartimento que transforma as moléculas em íons em fase gasosa à vácuo, como a ionização por impacto eletrônico (IE) e a ionização química (IQ) e, após isso, acelera estes íons por um campo eletromagnético. Em seguida, esses íons são levados para o analisador de massa que os separa

pelas diferenças de sua razão massa/carga (m/z). Após esse processo de separação de íons, estes são contados pelo detector, e o sinal é processado e registrado pelo processador de sinais que, em geral é um computador. Por fim, pode-se observar o resultado da análise que é o espectro de massa, um gráfico do número de íons detectados como uma função de sua razão m/z (PAVIA *et al.*, 2015).

Acoplada a cromatografia líquida, a espectrometria de massas é considerada a técnica mais eficiente para análise de compostos de maior massa molecular, maior polaridade e menos voláteis. As fontes de ionização mais utilizadas nesse método hifenado, CL/EM, que formam íons à pressão atmosférica são: Electrospray (ESI, “*Electrospray Ionization*”), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI, “*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*”), Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica (“*Atmospheric Pressure Photon Ionization*”). Dentre estas, o Electrospray é, de longe, a forma de ionização mais empregada no acoplamento CL/EM, seguida da APCI (LANÇAS, 2009).

3.7 Avaliação das atividades biológicas

3.7.1 Atividade fotoprotetora

Vivemos em um país cuja localização geográfica recebe a radiação solar de maneira muito intensa. Receber a radiação solar pode trazer muitos benefícios como: tratamento de icterícia em bebês, que é causada pelo excesso de bilirrubina no sangue fazendo com que a pele e o branco dos olhos fiquem de cor amarelada; o bronzeamento da pele; a produção de vitamina D, e etc. (CABRAL *et al.*, 2011; VIOLANTE *et al.*, 2009) Porém, uma das maiores preocupações é com a exposição excessiva a essa radiação, pois esta pode causar o foto envelhecimento, que é o excesso de exposição da pele ao sol causando manchas que podem levar a queimaduras e até mesmo ao câncer de pele. (CABRAL *et al.*, 2011)

Existem três tipos de raios solares de acordo com seu comprimento de onda. A radiação ultravioleta A (UVA), que se apresenta entre 320 e 400 nm, apesar de penetrar na pele de maneira mais profunda, dependendo do tempo de exposição geralmente não causa eritema. Essa radiação promove a fotoxidação da leucomelanina levando ao bronzeamento da pele. Se exposta em excesso, a pele pode sofrer danos como a formação de radicais livres e o câncer. A radiação ultravioleta B (UVB), entre 290 e 320 nm, apresenta energia muito mais forte sendo mais prejudicial à pele. Também leva ao bronzeamento da pele, porém, com mais rápida possibilidade para queimaduras e indução ao câncer. A terceira é a radiação ultravioleta C (UVC) que está entre os comprimentos de onda de 100 e 290 nm. Esta apresenta energia muito forte sendo prejudicial a saúde da pele, porém, é completamente absorvida pelo oxigênio e pela camada de ozônio, portanto não apresenta riscos a saúde. (VIOLANTE *et al.*, 2009)

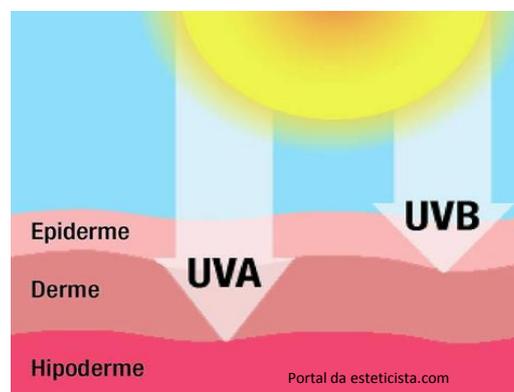


Figura 14 - Ilustração da absorção das radiações solares UVA e UVB na pele.

Sabe-se que a absorção da radiação solar se dá não só por exposição direta ao sol, mas também pela ação refletida dos raios, portanto, além do uso de chapéus, tecidos e o cuidado em não se expor ao sol por tanto tempo, a pele também deve ser protegida com filtro solar, que é um dermocosmético composto por substâncias que são capazes de absorver, refletir ou refratar a radiação ultravioleta evitando assim o aparecimento de eritemas e edemas na pele,

reduzindo o risco de queimaduras e o risco de carcinoma de células. (CABRAL *et al.*, 2011; VIOLANTE *et al.*, 2009)

Existem no mercado dois tipos de filtro solar: os orgânicos e os inorgânicos.

Os filtros orgânicos são, geralmente, formados por moléculas aromáticas que apresentam grupos carboxílicos e um grupo doador de elétrons que pode ser uma amina ou um grupo metoxila na posição orto ou para do anel. Esses filtros protegem a pele absorvendo as radiações ultravioleta, que possuem alta energia e transformam-nas em radiações de energias menores que não causam danos à pele. (FLOR *et al.*, 2007)

Flor e colaboradores (2007) explicam em seu artigo que no processo de absorção da radiação ultravioleta as transições eletrônicas envolvidas ocorrem entre a diferença de energia dos orbitais HOMO – LUMO, de modo que os elétrons situados no orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) são excitados para orbital π^* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e, ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor.

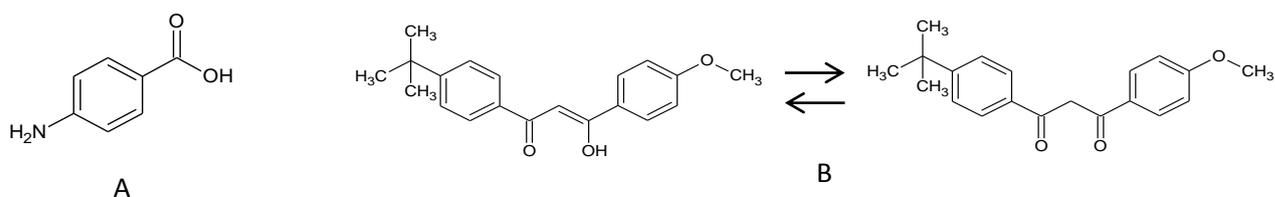


Figura 15 - Estruturas de substâncias utilizadas como filtros solares (A) *p*-aminobenzóico (PABA), que apresenta melhor absorção da radiação UVB e, para radiação UVA, (B) 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano-1,2-diona (Butil Metoxi-dibenzoil-metano). Fonte: FLOR *et al.* (2007).

Filtros solares inorgânicos são representados por dois óxidos: ZnO e o TiO_2 , produtos de origem mineral, que se apresentam na forma de pós inertes que são incorporados as formulações sendo o tamanho da partícula de relevante importância para o bom funcionamento do produto (VIOLANTE *et al.*, 2009).

3.7.2 Atividade antiplasmódica

A malária é uma doença conhecida mundialmente por ser considerada muito grave ao ponto de levar muitos dos infectados à óbito. Essa doença é adquirida por meio da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* que se alimentam, também, de sangue humano. Existe cerca de quatrocentas espécies desse gênero de mosquito, porém, poucas são responsáveis pela transmissão da malária. No Brasil a malária está presente em todas as regiões do país, porém, apresenta uma incidência maior de casos na região Norte por ser esta uma região que, além de ter clima tropical, apresenta também uma vasta floresta que é o ambiente preferido para a proliferação desses mosquitos. As espécies responsáveis pela transmissão da malária no Brasil são *A. deaneorum*, *A. albitarsis*, *A. aquasalis*, *A. brasiliensis* e a *A. darlingi*, sendo esta última considerada a responsável pelo maior número de casos de malária no país (LIMA, 2014).

O parasita causador da malária pertence ao filo Protozoa, classe Sporozoa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Cinco espécies são capazes de infectar o homem, porém, no Brasil, apenas três são associadas à malária: *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. malariae*. Destas a *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença, pois tem a capacidade de invadir células mais jovens tendo maior eficácia no seu desenvolvimento e atenuando os sintomas da doença (BASTOS, 2015; LIMA, 2014).



Figura 16 - *Anopheles*, o mosquito vetor da malária. Fonte: <https://www.news-medical.net>.

Estudos relatam que dos principais antimaláricos frequentemente empregados na terapêutica encontram-se as aminoquinolinas (cloroquina, amodiaquina, primaquina, quinina, quinidina e mefloquina); os antifolatos (sulfadoxina); diaminopirimidinas (pirimetamina); as lactonas sesquiterpênicas (artemisinina) e alguns antibióticos (tetraciclina, doxiclina e clindamicina combinado principalmente com a quinina) (BASTOS, 2015).

Com isto, no presente trabalho foi realizado o estudo químico para isolamento das substâncias majoritárias existentes nos extratos etanólico de bacuri que foram ativos para atividade antiplasmódica e fotoprotetora.

4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

4.1 Coleta do material

O material vegetal utilizado faz parte das amostras do Projeto de Resíduos do grupo de pesquisas Q-BiomA, e já estavam devidamente armazenados nos freezers do laboratório.

As cascas e sementes de bacuri foram cedidas pela empresa “Pousada Bacuri”, no mês de março de 2012, localizada no município de Bragança (Pará), onde são plantados bacurizeiros em 65 hectares.

4.2 Obtenção dos extratos brutos das cascas e sementes de bacuri

O extrato etanólico das cascas de bacuri (EECB), que foi utilizado neste trabalho, foi obtido por maceração a frio por um período de 24, 48 e 72 horas. A cada intervalo o extrato foi filtrado e foi acrescentado mais uma quantidade de etanol suficiente para cobrir o material o material vegetal que permaneceu no frasco. Esse extrato já estava preparado, devidamente armazenado no freezer de amostras do Q-BiomA e com quantidade suficiente para a realização desta pesquisa tendo 70 g do extrato. O extrato etanólico das sementes de bacuri (EESB) foi preparado seguindo o mesmo método de extração.

Para obtenção do EESB, primeiramente, pesaram-se 150 g das sementes (trituradas) que foram colocadas em um frasco âmbar onde foram adicionados 300 mL de etanol, quantidade de solvente necessária para que o material vegetal ficasse submerso. Foi realizada a filtração simples desse material a cada 24 h, em seguida, a parte filtrada foi levada ao evaporador rotatório à uma pressão de 600 mm/Hg e temperatura de 40 a 50 °C para evaporação da maior quantidade de solvente e, para eliminação do que ainda restou de solvente, o material foi deixado na capela de exaustão por alguns dias.

Esse método de extração foi escolhido baseado no trabalho de Yamaguchi (2015), onde foi realizada a otimização das extrações e, como resultado, pode-se observar que este é um dos métodos que apresentou maior rendimento para as extrações das sementes de bacuri sendo mais acessível e simples de realizar.

Também foi realizada uma extração sequencial em banho ultrassônico (US) utilizando como solventes extratores o hexano, AcOEt e MeOH respectivamente conforme fluxograma abaixo:

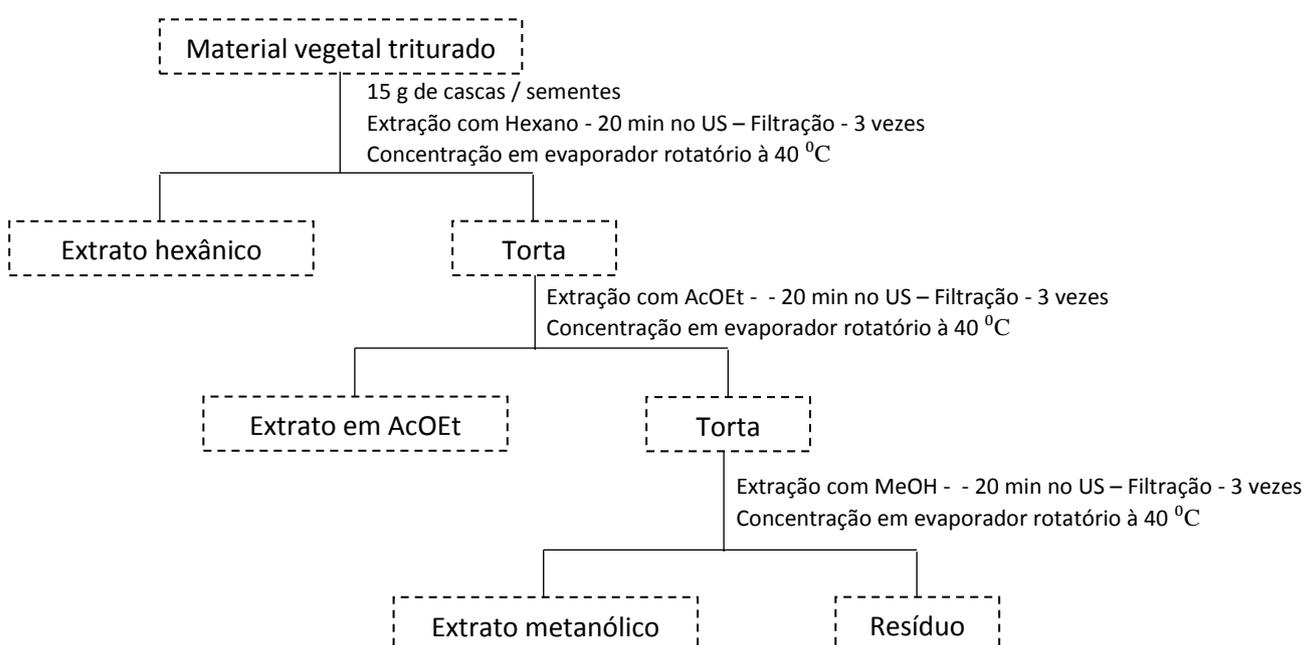


Figura 17 - Fluxograma da extração sequencial de cascas e sementes de bacuri.

A partir dessa extração sequencial foram obtidos os seguintes extratos:

Extrato das cascas de bacuri (BAC)	Extrato das sementes de bacuri (BAS)
Em hexano (BAC-Hex)	Em hexano (BAS-Hex)
Em acetato de etila (BAC-Ac)	Em acetato de etila (BAS-Ac)
Em metanol (BAC-Me)	Em metanol (BAS-Me)

Tabela 3 - Extratos obtidos por banho ultrassônico a partir das cascas e sementes de bacuri.

Esses extratos foram analisados nas atividades biológicas para comparação com os extratos em diferentes polaridades obtidos pela partição dos extratos etanólicos. O processo de partição está descrito no próximo item.

4.2.1 Pré-fracionamento dos extratos etanólicos

Com os extratos etanólico (obtidos por maceração a frio) EECB e EESB secos e pesados, foi realizado o particionamento com uma pequena massa de extrato solubilizada em mistura de metanol (MeOH) com água destilada (H_2O_{dest}) na proporção de 8:2 com acréscimo de algumas gotas de hexano. O extrato solubilizado foi transferido para um funil de separação onde foi realizado o fracionamento utilizando como solventes extratores o hexano (Hex), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt) dando origem a quatro fases de cada extrato: fase hexânica (EECB-Hex e EESB-Hex); fase em diclorometano (EECB-DCM e EESB-DCM); fase em acetato de etila (EECB-AC e EESB-AC) e fase em metanol/água (EECB-ME e EESB-ME).

4.3 Métodos cromatográficos

4.3.1 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos etanólicos

O perfil cromatográfico dos extratos foi avaliado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas cromatográficas de folhas de alumínio com sílica gel 60, com indicador de fluorescência F_{254} , da Merck (Germany), em fase normal. As placas foram reveladas com vanilina sulfúrica, cloreto férrico e a luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm. O sistema de eluentes foi definido pela análise da melhor separação de manchas apresentada na placa cromatográfica.

4.3.2 Fracionamento cromatográfico dos extratos etanólicos de bacuri

As fases originadas da partição foram submetidas a análises cromatográficas para o fracionamento e possível isolamento das substâncias. Os eluentes utilizados em cada etapa da análise em cromatografia em coluna (CC) foram determinados por cromatografia em camada delgada (CCD), como citado no item anterior. Nos fracionamentos por CCAFN (cromatografia em coluna aberta de fase normal) foram utilizadas colunas com sílica gel (Silicycle, SiliaFlash® G60, 70-230 mesh). Inicialmente, os fracionamentos foram realizados utilizando uma coluna tipo filtrante, que apresenta uma relação amostra/sílica de 1 g / 30 g visando o fracionamento dos extratos. As frações originadas desse fracionamento foram monitoradas por CCD. As frações que apresentaram as substâncias majoritárias foram novamente submetidas a análises por CCAFN para possível isolamento utilizando a relação amostra – sílica 1 g / 50 g (COLLINS, 1997).

4.4 Métodos espectroscópicos e espectrométricos

4.4.1 Análise por RMN

A identificação das substâncias isoladas foi inicialmente realizada por análise de RMN de ^1H e ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado (CD_3OD ou CDCl_3) tendo como padrão o TMS. Esta análise foi realizada na Central Analítica da UFAM utilizando um espectrômetro da Bruker Avance III HD operando a 11,75 Tesla, observando o núcleo de ^1H a 500,13 MHz e de ^{13}C a 125,76 MHz. Os espectros gerados foram analisados com o auxílio do software ACD/NMR Processor academic edition.

4.4.2 Análise por espectrometria de massas

Para auxiliar na identificação das substâncias também foram realizadas análises em espectrômetro de massas da marca LCQ Fleet, da Thermo Scientific, com fonte de ionização APCI (para análises de compostos de baixa à média polaridade). As amostras foram preparadas pesando 1 mg, que foi solubilizado em 1 mL de MeOH (de alta pureza). Dessa solução de 1 mg/mL foram retirados 20 µL que foram transferidos para um outro frasco onde foi adicionado mais MeOH, totalizando 1 mL da solução. Os espectros resultantes foram analisados com o auxílio do software Xcalibur. Esta análise também foi realizada na Central Analítica da UFAM.

4.5 Ensaio biológicos

4.5.1 Avaliação da atividade fotoprotetora

Para análise do potencial de fotoproteção dos extratos e frações, foi utilizado o método adaptado de determinação do espectro de absorção, a espectrofotometria, que vem sendo utilizado no laboratório Q-BiomA e foi descrito por Mansur (1996) e colaboradores. As amostras são analisadas em concentrações diluídas e são verificados os seus respectivos comprimento de onda máximo e a absorção máxima.

As amostras foram preparadas pesando 1 mg e sendo solubilizado em 1 mL de MeOH de alta pureza. Dessa solução foram retirados 60 µL e transferidos para outro frasco em que foi avolumado para completar 3 mL de solução. Cada solução foi levada a análise para obtenção do espectro de absorção na região do ultravioleta na faixa de comprimento de onda que corresponde às regiões UVA, UVB e UVC: entre 200 a 400 nm.

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro de marca Genesys 10S UV-VIS da Thermo Scientific, localizado no laboratório de físico-química da UFAM.

4.5.2 Avaliação da atividade antiplasmódica

A avaliação da atividade antiplasmódica foi realizada em parceria com a plataforma de bioensaios da Fiocruz Amazônia sob a coordenação da profa. Dra. Patrícia Orlandi. A cepa de *Plasmodium falciparum*, FCR3, foi cultivada em meio de cultura suplementado, mais 10% de soro humano AB+ e eritrócitos humanos normais. As soluções foram preparadas utilizando 100% de dimetilsulfóxido (DMSO), em seguida, estas foram transferidas para uma placa de poços de fundo chato contendo meio de cultura para o parasita, eritrócitos infectados, o controle positivo utilizado foi o DMSO, a droga controle foi o Quinino e o controle negativo foram eritrócitos não parasitados e sem droga. Esse material foi mantido em incubadora por 72h a 37 °C. Após esse período de incubação as soluções foram analisadas em citômetro de fluxo para leitura que determina a parasitemia, então, foi realizado o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento parasitário de acordo com a fórmula: % Inibição = $100 - \left[\frac{\% \text{Fluorescência amostra} - \% \text{Fluorescência Eritrócitos sadios}}{\% \text{Fluorescência Controle} - \% \text{Fluorescência Eritrócitos sadios}} \right] \times 100$. (BASTOS, 2015). A concentração inibitória em 50% da parasitemia total (CI50) foi determinada pelo software Graphpad Prism 7 através de um gráfico do Log da dose versus inibição (expresso em porcentagem em relação ao controle) por análise de regressão não linear, apenas para as amostras que inibiram 50% do crescimento parasitário.

4.5.3 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade também foi realizado em parceria com a plataforma de bioensaios da Fiocruz Amazônia sob a coordenação da profa. Dra. Patrícia Orlandi. O método utilizado foi o de alamar blue segundo (NAKAYAMA *et al*, 1997), utilizando células VERO (linhagem celular sadia derivada de rins de macaco verde) e células HEp-2 (linhagem celular

tumoral derivada de carcinoma de laringe humana). As células foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 50 µg/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) a 37 °C em estufa a 5% de CO₂. As células foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁴ células/poço na placa de 96 poços, cada poço contendo 100 µL da solução. As amostras foram solubilizadas em 100 µL de DMSO, quando extratos, óleos ou frações, e 200 µL de DMSO, quando compostos isolados. Após isso, 10 µL deste estoque inicial, de cada amostra, foram transferidos para um tubo contendo 990 µL de meio DMEM completo, com concentração final do DMSO de 0,5% na placa, de forma que este não interfira nos resultados. Após 24 horas de incubação e aderência das células na placa, as mesmas foram tratadas com 100 µL das amostras, totalizando uma concentração final de 50 µg/mL para extratos, frações e óleos, e 25 µg/mL para isolados. A incubação das células tratadas com as amostras ocorreu durante um período de 72 horas. Após o período de tratamento foi adicionado 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20) para a análise de fluorescência. Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreendeu 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência. A média da porcentagem de viabilidade celular (VC) foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde Ft= (fluorescência da célula + meio DMEM+ resazurina + amostra) e Fb= (fluorescência da célula + meio DMEM + resazurina). A porcentagem de morte celular (MC) foi calculada de acordo com a fórmula: MC = 100 - % viabilidade celular (VC). O teste foi realizado em triplicata.

$$VC = Ft \times 100 / Fb$$

$$MC = 100 - VC$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos extratos

O EESB, obtido pelo método de maceração, apresentou rendimento igual a 25,8655 g (~16%).

Os extratos etanólicos das cascas e sementes de bacuri foram fracionados inicialmente usando uma massa pequena de 1 mg para verificar se a partição daria certo. Em seguida, o processo foi repedido para a obtenção de mais massa das fases originadas pela partição e seus rendimentos estão descritos na tabela 4.

Massa dos extratos (g)	Extrações do EECB (Massa em g)			Rendimento de EECB(%)	Extrações do EESB (Massa em g)			Rendimento de EESB(%)
	1,0038	1,0021	6,0041	----	1,0058	1,0000	6,0052	----
F(Hex)	0,6203	0,5124	3,35	55,96 %	0,4376	0,6798	2,8067	48,99 %
F(DCM)	0,1104	0,1416	0,8284	13,48 %	0,2670	0,0892	0,5068	10,77 %
F(AcOEt)	0,0569	0,243	1,1468	18,06 %	0,0607	0,0199	0,0327	3,77 %
F(MeOH/H₂O)	----	0,1041	0,9039	18,87 %	----	----	0,3423	5,700 %

Tabela 4 - Rendimento das frações originadas do particionamento dos extratos etanólico de cascas e sementes de bacuri.

Pode-se observar um alto rendimento da fase hexânica de ambas as partes do fruto mostrando que esta apresenta uma grande quantidade de substâncias de baixa polaridade na sua constituição química.

Observando os rendimentos das extrações realizadas em banho ultrassônico pode-se notar que o extrato das sementes apresenta uma quantidade de substâncias de baixa polaridade maior que o extrato das cascas.

	Rendimento de extratos de cascas BAC (%)	Rendimento de extratos de sementes BAS (%)
Extrato hexânico	1,0659 g (7,1 %)	4,5208 g (30,13 %)
Extrato em AcOEt	0,3861 g (2,574 %)	3,4232 g (22,82 %)
Extrato metanólico	3,4348 g (22,89 %)	0,6129 g (4,086 %)

Tabela 5 - Rendimento da extração sequencial das cascas e sementes de bacuri.

5.2 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos etanólicos de bacuri

O perfil cromatográfico dos extratos EESB, EECB e das fases F(Hex), F(DCM) e F(AcOEt) originadas da partição foi avaliado utilizando o sistema de eluição composto por Hex/AcOEt, na proporção 6:4, sendo essa mistura de eluentes a que melhor apresentou a separação de manchas nas placas cromatográficas.

As placas foram analisadas utilizando como reveladores a luz UV nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm, vanilina sulfúrica e cloreto férrico.

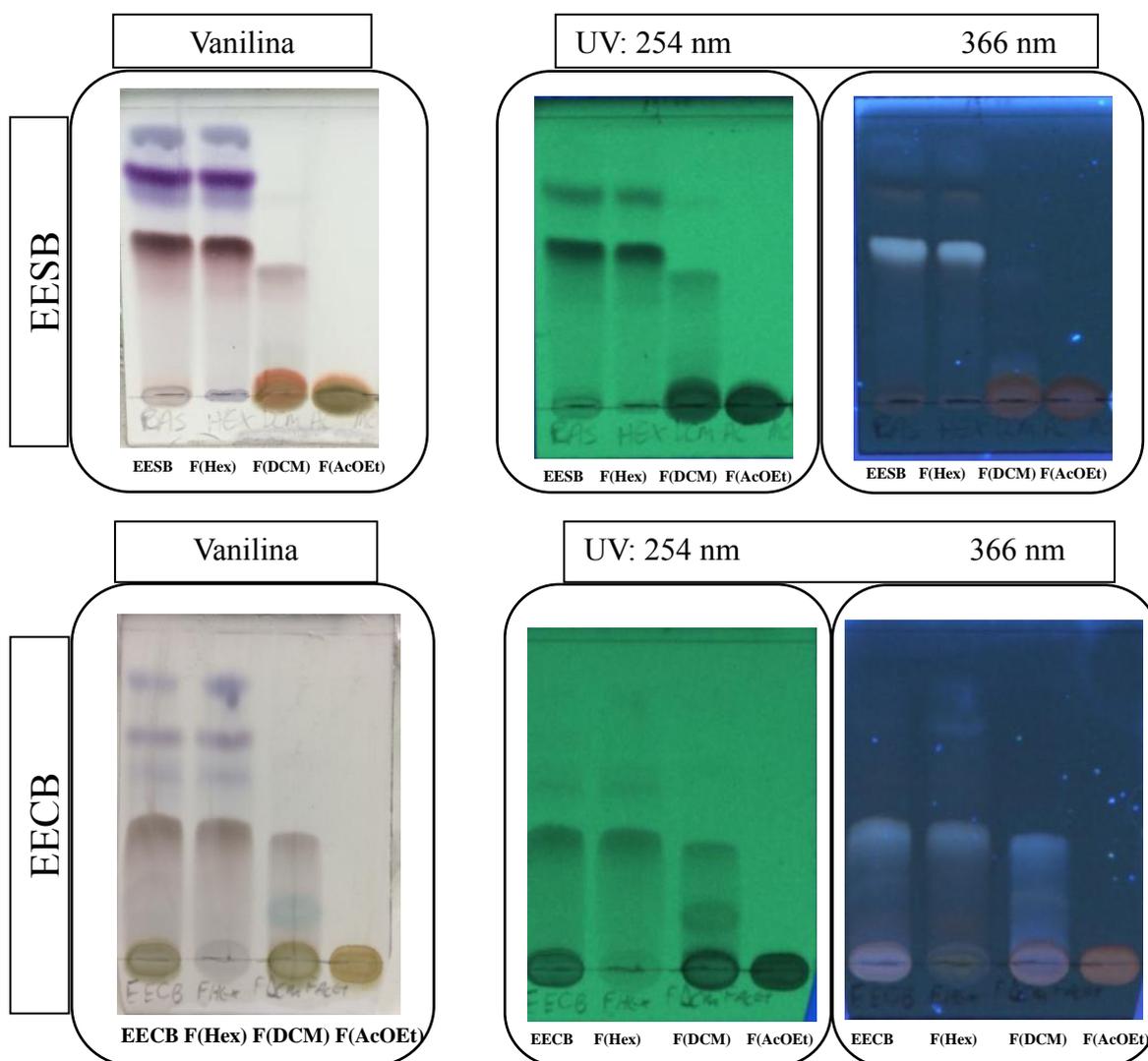


Figura 18 - Análise por CCD de EECB, EESB e suas respectivas fases originadas da partição eluídas em Hex/AcOEt (6:4)

Observa-se que os perfis cromatográficos de EECB e EESB são semelhantes assim como das suas respectivas fases hexânicas. Reveladas em cloreto férrico, ambas as fases F(Hex) apresentaram manchas na coloração rosada e cinza escuro. Reveladas em luz UV no λ 254 nm, nota-se a presença de manchas escuras e no λ 366 nm, uma mancha majoritária esverdeada. Essas colorações indicam a presença de substâncias fenólicas e terpenoides, confirmando os dados da literatura que apresentam o bacuri sendo rico em substâncias fenólicas (HARBOME, 1998). As fases obtidas em diclorometo apresentam comportamento cromatográfico semelhante, porém com algumas manchas diferentes entre si e estas foram analisadas novamente com outra mistura de eluentes que será apresentada mais à frente.

5.3 Avaliação de atividades biológicas dos extratos

5.3.1 Atividade fotoprotetora

Para a avaliação da atividade fotoprotetora foi utilizado o método da espectrofotometria adaptado do trabalho de Mansur (1996) e colaboradores. É considerado um método confiável além de ser simples, barato, rápido e não apresentar riscos, pois não há necessidade de expor a pele à análise (MANSUR *et al.*, 1996; YAMAGUCHI *et al.*, 2016).

Os espectros da figura 20 apresentam os comprimentos de onda máximo ($\lambda_{MÁX}$) e as absorções máximas dos extratos e frações de cascas e sementes de bacuri.

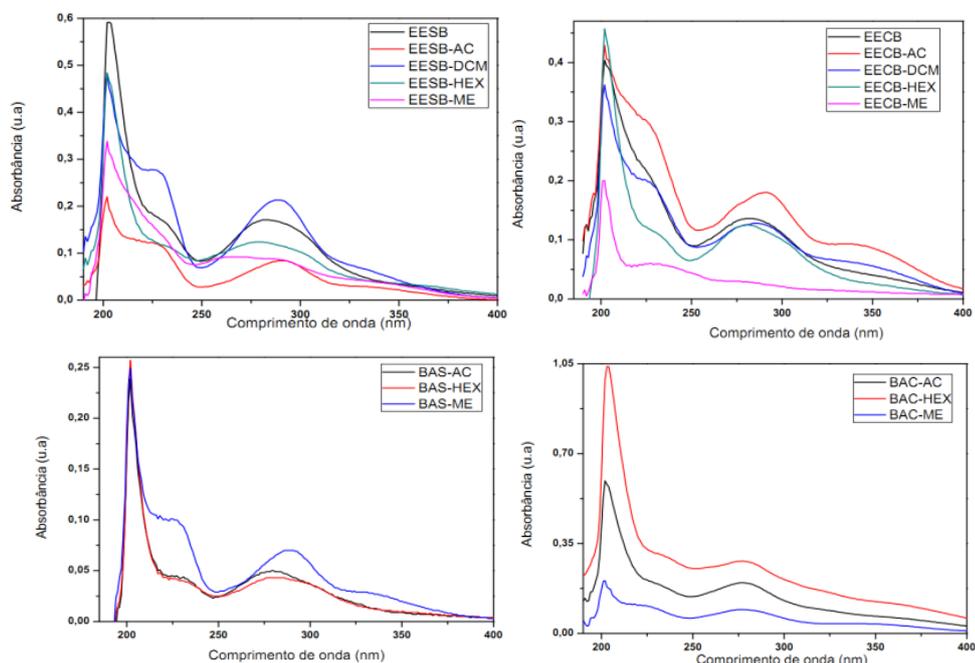


Figura 19 - Espectros de absorção dos extratos e frações de bacuri.

Para melhor visualizar os valores de $\lambda_{MÁX}$ estes foram listados na tabela 5 apresentando uma ênfase nas regiões relativas as radiações UVA, UVB e UVC.

Amostras	$\lambda_{MÁX}$ (nm)/absorbância	UVC (100 a 290 nm)	UVB (290 a 320 nm)	UVA (320 a 400 nm)
EESB	205(0,58)	205(0,58)	290(0,16)	320(0,05)
EESB-Hex	203(0,47)	203(0,47)	290(0,11)	320(0,04)
EESB-DCM	203(0,47)	203(0,47)	290(0,21)	320(0,07)
EESB-AC	200,01(0,22)	200,01(0,22)	290(0,09)	320(0,03)
EESB-ME	200,01(0,34)	200,01(0,34)	290(0,08)	320(0,05)
EECB	203(0,40)	203(0,40)	290(0,13)	320(0,06)
EECB-Hex	202(0,46)	202(0,46)	290(0,09)	320(0,05)
EECB-DCM	203(0,36)	203(0,36)	290(0,12)	320(0,07)
EECB-AC	203(0,43)	203(0,43)	290(0,17)	320(0,09)
EECB-ME	203(0,2)	203(0,2)	290(0,02)	320(0,01)
BAC-Hex	203(1,05)	203(1,05)	ND	ND
BAC-AC	203(0,58)	203(0,58)	ND	ND
BAC-ME	202(0,19)	202(0,19)	ND	ND
BAS-Hex	202(0,26)	202(0,26)	ND	ND
BAS-AC	202(0,23)	202(0,23)	ND	ND
BAS-ME	202(0,25)	202(0,25)	ND	ND

Tabela 6 - Comprimentos de onda máximos e absorbância máxima dos extratos e frações de bacuri. (ND= não detectado)

Pode-se notar que todos os extratos e frações testados apresentam comprimento de onda máximo na região da radiação UVC. Para os extratos etanólicos as fases que se destacaram foram EESB-Hex e EESB-DCM, que apresentaram absorbância um pouco maior em relação às outras frações para a região de UVC e, na região de UVB, a fração destaque foi a EESB-DCM com comprimento de onda 290 nm (0,21).

Em comparação com dados encontrados na literatura observa-se que esses extratos e fases não apresentam um espectro de absorção tão amplo como relatado. Porém, apresenta sim absorção abrangente entre as regiões de UVC e início de UVB o que caracteriza um filtro solar que poderia apresentar menos risco de irritabilidade para a pele, pois, não haveria a necessidade de misturar mais substâncias para se conseguir uma boa proteção para a pele (YAMAGUCHI, *et al.*, 2016).

A fase EESB-DCM, que se destacou em absorção na região de UVB, foi analisada para identificação das substâncias presentes e a capacidade que estas apresentam essa de absorção, visto que, segundo as análises preliminares por cromatografia em camada delgada, essa fase apresenta substâncias fenólicas.

5.3.2 Atividade antiplasmódica

Para a avaliação da atividade antiplasmódica cada amostra foi analisada em oito concentrações diferentes (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL e 0,39 µg/mL), em triplicata, e em seguida, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento parasitário da cepa FCR3 e suas respectivas médias. A partir da porcentagem de inibição, foi calculado o CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de inibir 50% do crescimento parasitário) das amostras.

Dentre os extratos testados, o EESB destacou-se apresentando CI₅₀ de 10,53 µg/mL. Este extrato quando testado na concentração 50 µg/mL apresentou 81,8% de inibição, 70,9%

na concentração de 25 µg/mL, e 33% de inibição na concentração de 12,5 µg/mL. Bastos (2015) apresentou um trabalho comparando a porcentagem de inibição dos extratos de alguns frutos amazônicos nas concentrações de 50 µg/mL e 12,5 µg/mL e o extrato etanólico das sementes de bacuri apresentou o melhor resultado tendo cerca de 60% de inibição do crescimento parasitário em ambas as concentrações. Essas diferenças nos resultados podem ser relacionadas ao fato de se tratar de uma linhagem diferente, sendo que Bastos (2015) utilizou a linhagem 3d7gfp de *P. falciparum*.

O extrato BAC-ME apresentou 46% de inibição na concentração de 50 µg/mL, e o de BAS-ME apresentou inibição entre 41 e 46% em todas as oito concentrações testadas. Os demais extratos apresentaram espectro de inibição abaixo de 40%.

Para as frações do particionamento de EECB foi plotado o gráfico da figura 20.

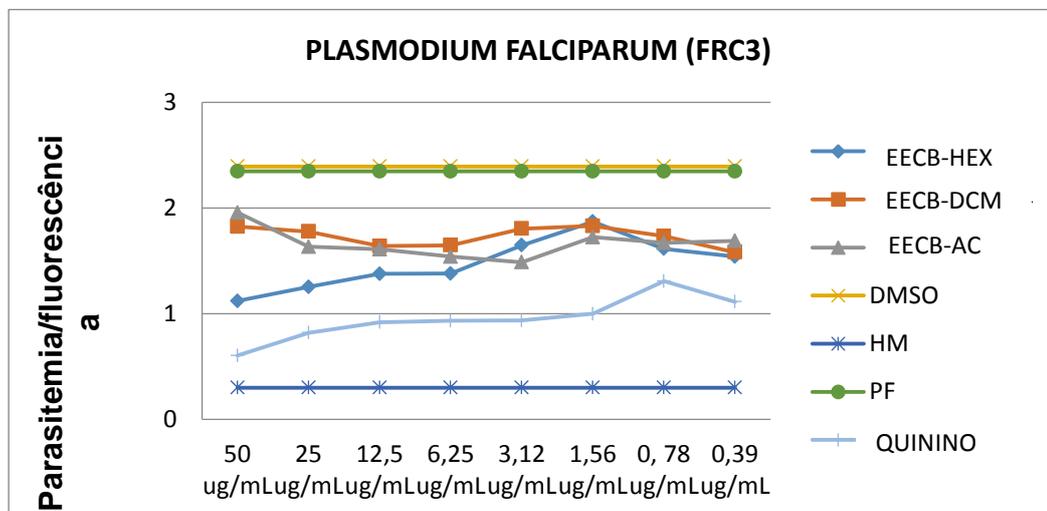


Figura 20 - Análise das fases originadas do EECB contra o crescimento do parasita *Plasmodium falciparum*. HM = Hemácias sadias: controle negativo; PF = Parasita sem o extrato: controle de crescimento parasitário: controle positivo; DMSO = Dimetilsulfóxido: controle reagente; Quinina = droga controle. Fonte: Fiocruz.

Para as fases da partição do EESB também foi plotado um gráfico que está representado na figura 21.

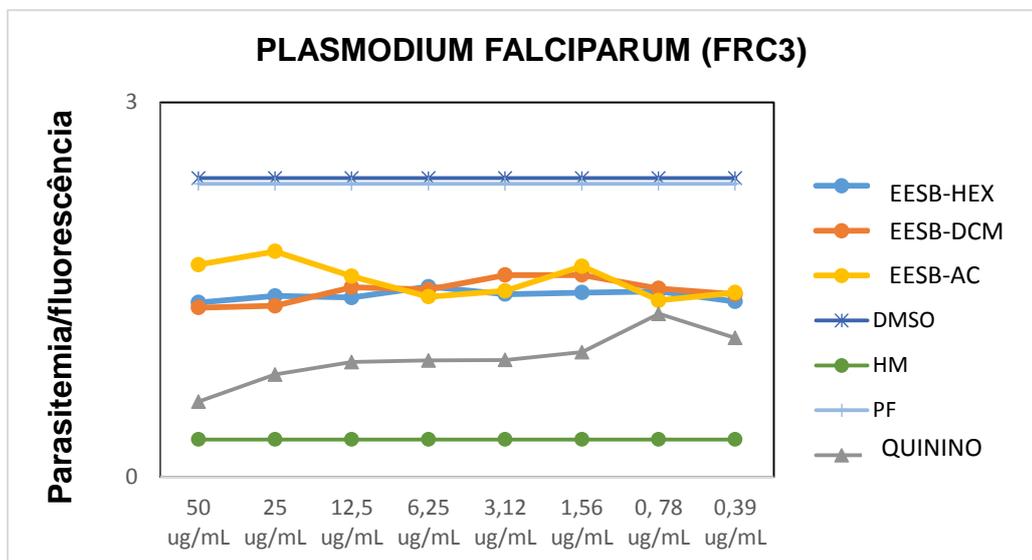


Figura 21 - Análise das frações originadas do EESB contra o crescimento do parasita *Plasmodium falciparum*. HM = Hemácias sadias: controle negativo; PF = Parasita sem o extrato: controle de crescimento parasitário: controle positivo; DMSO = Dimetilsulfóxido: controle negativo; Quinino = droga. Fonte: Fiocruz.

Analisando os gráficos acima se observa que a fase EECB-HEX foi a que se destacou apresentando CI_{50} de 13,97 $\mu\text{g/mL}$. Esta fração apresentou 61% de inibição na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 54% em 25 $\mu\text{g/mL}$. A fração EESB-HEX apresentou 48% de inibição apenas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. As demais frações apresentaram entre 20 e 40% de inibição parasitária.

Dentre os extratos e frações, o extrato EESB (CI_{50} = 10,53 $\mu\text{g/mL}$) e a fração EECB-HEX (CI_{50} = 13,97 $\mu\text{g/mL}$) se apresentaram como os melhores resultados. Estes resultados podem indicar que essas amostras apresentam atividade antiplasmódica moderada para esta cepa, pois, segundo Amarante *et al.* (2011), amostras que apresentarem $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ são consideradas como tendo uma boa atividade antiplasmódica, já as que apresentam valores entre 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas como tendo atividade moderada e acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ baixa atividade.

O estudo químico da fração hexânica foi realizado para obtenção das substâncias responsáveis por esse resultado de inibição de crescimento parasitário.

5.3.3 Avaliação do potencial citotóxico em células sadias e células tumorais.

A avaliação do potencial citotóxico dos extratos de sementes e de cascas de bacuri foi realizado utilizando linhagem celular tumoral de laringe humana (HEp-2), e linhagem de células sadias derivada de rins de macaco verde (VERO), conforme mostra as tabelas 7 e 8.

Amostra	% Morte celular
EESB	63,17307
EECB	47,57046
BAC Acetato	72,68327
BAC Hexano	73,65905
BAC MeOH	11,79672
BAS MeOH	-
BAS Hexano	-
BAS Acetato	1,421956

Tabela 7 –Porcentagem de morte celular em linhagem celular tumoral de laringe humana (HEp-2).
(-) = Não apresentaram morte celular.

Observa-se que, com exceção dos extratos metanólico e hexânico de sementes de bacuri, extraídos em banho ultrassônico (BAS-MeOH; BAS-HEX), todos os outros apresentaram certa porcentagem de morte de células tumorais tendo destaque os BAC-HEX e BAC-AC (extração em banho ultrassônico), e os extratos EESB e EECB (extraídos por maceração exaustiva).

Amostra	% Morte celular
EESB	-
EECB	-
BAC Acetato	85,33404291
BAC Hexano	68,10417636
BAC MeOH	-
BAS MeOH	-
BAS Hexano	-
BAS Acetato	25,8231833

Tabela 8 - Porcentagem de morte celular em linhagem celular sadia de rins de macaco verde (VERO).
(-) = Não apresentaram morte celular.

Além de apresentar uma porcentagem significativa de morte das células tumorais testadas, os extratos EECB e EESB também apresentaram resultado positivo quando testados em células saudáveis, ou seja, não apresentaram morte de células saudáveis podendo ser considerados extratos com composição química interessante para o estudo farmacológico. Já os extratos BAC-Hexano e BAC-Acetato apresentaram uma porcentagem de morte de células saudáveis até maior que a morte das células tumorais não sendo assim extratos interessantes para prosseguir nos estudos.

5.4 Fracionamento cromatográfico de EECB-Hex

Na primeira análise foi realizado o fracionamento da F(Hex) do EECB para obtenção das primeiras substâncias isoladas, conforme figura 23.

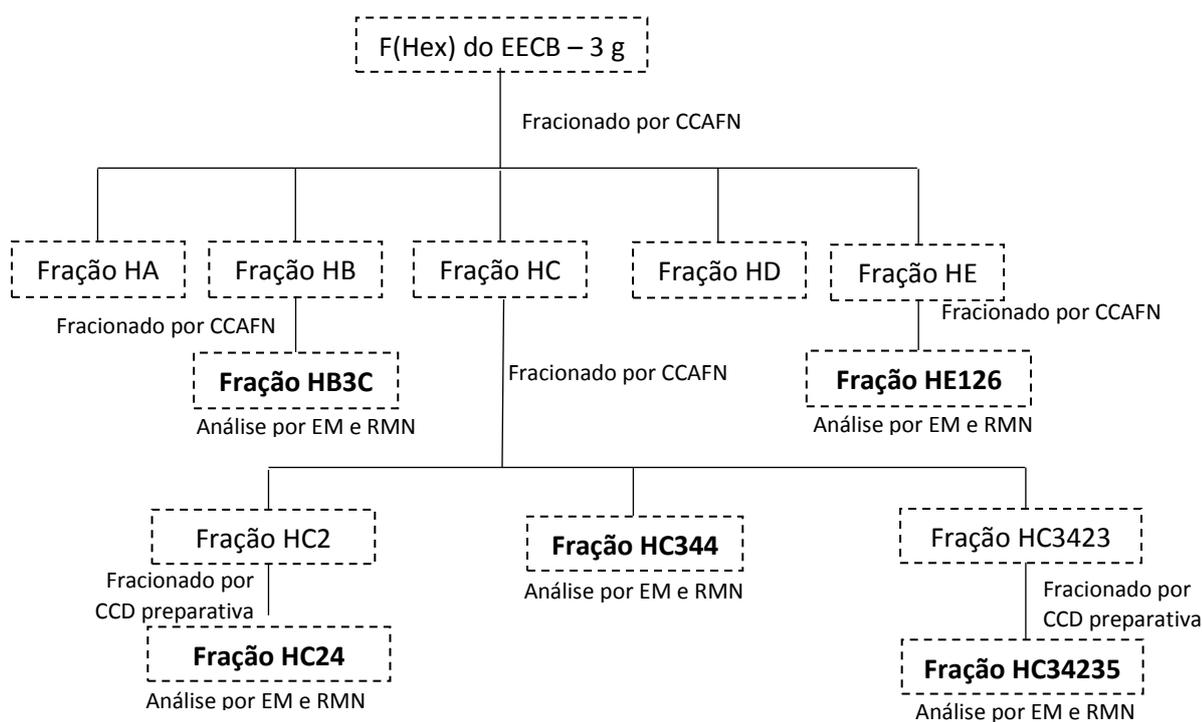


Figura 22 - Fluxograma geral do fracionamento e isolamento de substâncias a partir da F(Hex) do EECB.

A análise foi iniciada com uma coluna do tipo filtrante (relação amostra/sílica = 1 g / 30 g). Então, foram utilizados 3 g da F(Hex), cerca de 90 g de sílica gel G60 (20 cm de altura) em uma coluna de 4 cm x 75 cm. A eluição foi realizada no modo gradiente com o sistema de solventes Hex:AcOEt, aumentando a quantidade de AcOEt gradativamente, como apresentado na tabela 8. Foram obtidas cinco frações (HA, HB, HC, HD e HE) de 210 mL cada a partir dessa coluna.

Frações	Coluna filtrante de F(Hex)	
	Gradiente	
	Hex (%)	AcOEt (%)
HÁ (0,735 g)	100	--
HB (0,461 g)	90	10
HC (1,104 g)	80	20
HD (0,364 g)	70	30
HE (0,096 g)	50	50

Tabela 9 - Gradiente utilizado na coluna de fracionamento da F(Hex).

Todas as frações foram secas, devidamente pesadas e analisadas por CCD (Figura 23). Em seguida, foram submetidas a outras análises cromatográficas para isolamento das substâncias majoritárias.

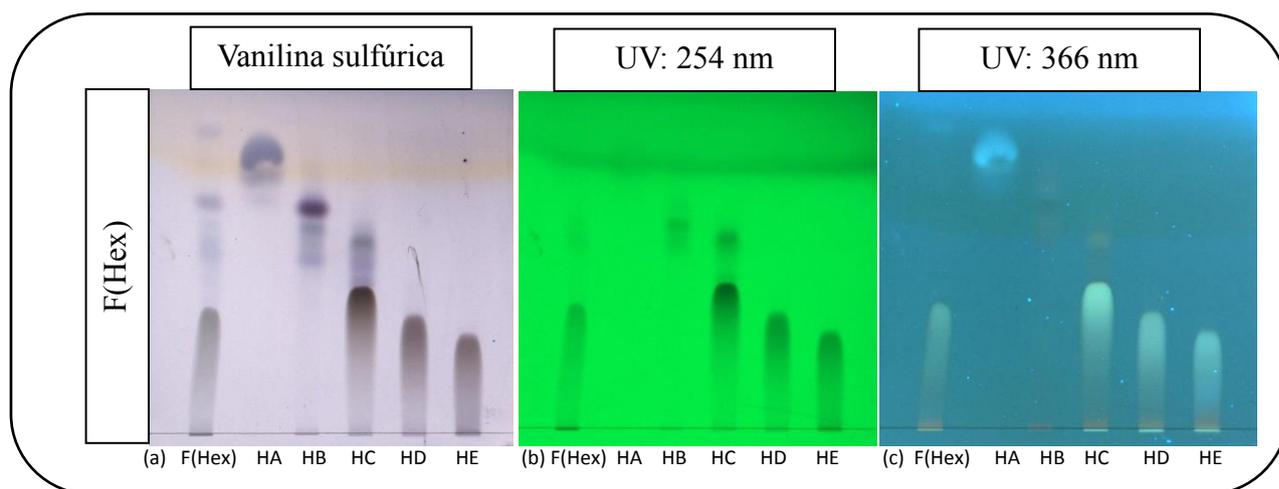


Figura 23 - Análise por CCD da coluna filtrante de F(Hex) eluídas em Hex/AcOEt (6:4) sendo reveladas em vanilina sulfúrica (a) e luz UV 254 nm (b) e 366 nm (c).

5.5 Fracionamento da amostra HB por CCAFN

A fração HB foi fracionada por CCAFN para possível isolamento da substância majoritária conforme figura 25. Essa substância apresenta coloração roxa escura, quando revelada com vanilina sulfúrica, e $R_f = 0,6$ como mostra a figura 26.

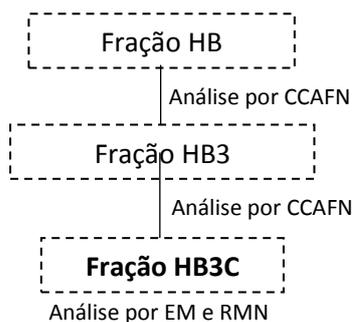


Figura 24 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da amostra HB.

Para isso, foi utilizada uma coluna de 2 cm x 75 cm, com 0,461 g da amostra e 27,11 g de sílica gel (relação amostra/sílica de 1 g / 60 g), tendo o volume morto igual a 50 mL e sistema de eluição no modo gradiente composto por DCM/AcOEt, conforme tabela abaixo:

Coluna de isolamento HB		
Gradiente		
Frações	DCM (%)	AcOEt (%)
1ª (10x)	100	--
2ª (5x)	99	1
3ª (3x)	98	2
4ª (2x)	97	3
5ª	95	5
6ª (2x)	90	10
7ª	80	20
8ª	70	30
9ª	60	40
10ª	50	50

Tabela 10 - Gradiente utilizado na coluna de isolamento da amostra HB.

Cada fração coletada teve o volume equivalente à metade do volume morto. O resultado dessa análise foi observado por CCD como pode ser observado na figura 25:



Figura 25 - Análise por CCD da fração HB com sistema de eluentes DCM/AcOEt (98:02) e revelado com vanilina sulfúrica.

Desta análise, foram reunidas as frações que estão sinalizadas na figura 25, onde se acredita ter a mancha correspondente à substância majoritária, e essa foi chamada de HB₃.

5.5.1 Fracionamento por CCAFN da amostra HB₃

A fração HB₃ foi fracionada por CCAFN na qual foi utilizada uma coluna de 1,5 cm x 50 cm, com 0,138 mg da amostra e 7,2 g de sílica gel (18 cm), tendo o volume morto igual a 47 mL, e sistema de eluição no modo gradiente foi composto primeiramente por Hex/CHCl₃(clorofórmio) e depois por CHCl₃(clorofórmio)/AcOEt, conforme tabela abaixo:

Coluna de isolamento HB3			
Gradiente			
Frações	Hex (%)	CHCl ₃ (%)	AcOEt (%)
1ª (2x)	20	80	--
2ª (3x)	10	90	--
3ª (4x)	--	100	--
4ª (3x)	--	98	02
5ª (2x)	--	95	05
6ª (4x)	--	90	10
7ª (5x)	--	50	50

Tabela 11 - Gradiente utilizado na coluna de isolamento da amostra HB₃.

As frações sinalizadas na figura 27 foram reunidas, originando a fração HB₃C de massa igual a 0,083 g e esta foi analisada por CCD onde se observou que a substância

majoritária já está bastante purificada, então esta foi levada a análises por EM e RMN para identificação.

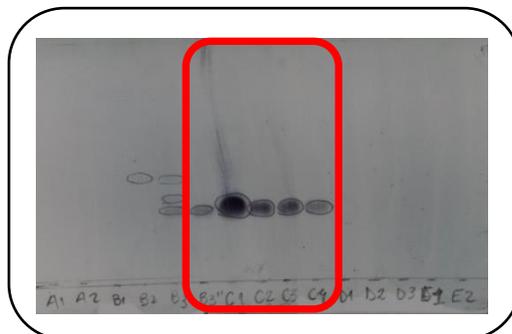


Figura 26 - Análise por CCD da coluna de isolamento da amostra HB₃ com sistema de eluentes DCM/AcOEt (98:02) e revelado com vanilina sulfúrica

5.5.2 Caracterização da amostra HB₃C por espectrometria de massas

A amostra foi analisada por espectrometria de massas utilizando com o ionizador APCI nos modos negativo e positivo.

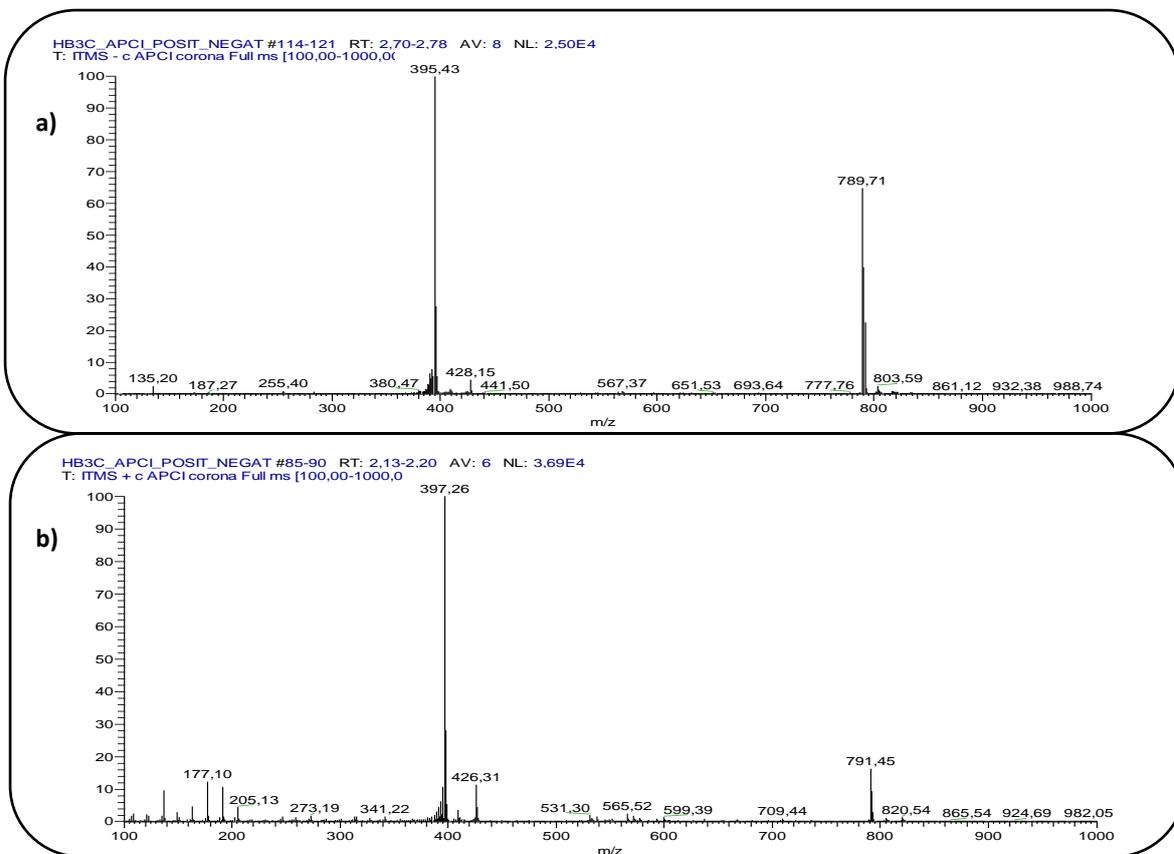


Figura 27 - Espectros de massas da amostra HB₃C analisados em APCI nos modos negativo (a) e positivo (b).

Esses espectros apresentaram um pico mais intenso de m/z 395 no modo negativo e m/z 397 no modo positivo.

Essa massa pode representar a presença de um fitoesterol que são encontrados em grande quantidade na composição das frações oleosas dos vegetais (BARTOLOMEAZZI *et al.*, 1999). Essa substância apresenta massa igual 414 g/mol, porém, esse tipo de esterol, que possui grupo hidroxila na posição três da estrutura, apresenta um padrão de fragmentação $[M + H - H_2O]^+$ quando analisado por APCI (KOBAYASHI *et al.*, 1993).

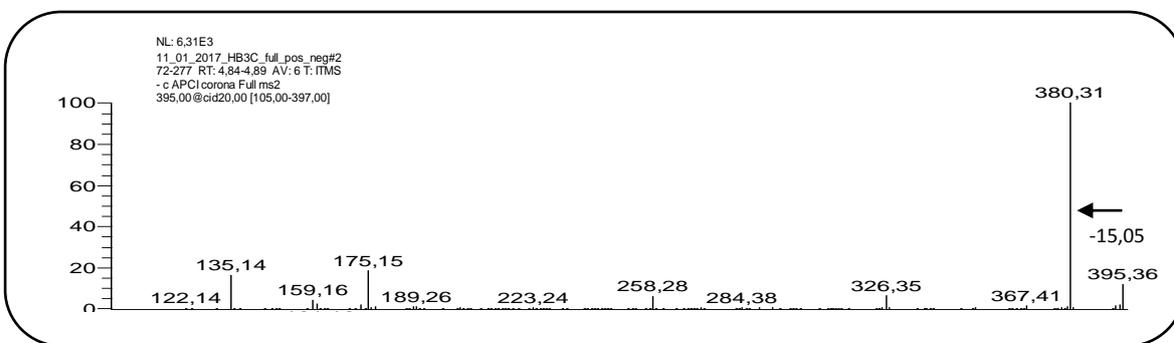


Figura 28 - Espectros de massas de fragmentação do pico de m/z 395 da amostra HB₃C analisados em APCI no modo negativo.

Ao analisar o espectro de fragmentação observa-se um pico mais intenso de m/z 380 representando a perda de uma metila, o que confirma a possibilidade de ser um esterol, pois estes apresentam essa característica de fragmentação.

Essas informações espectrais condizem com o fato de essa substância ter sido isolada da fração hexânica do bacuri, sendo esta a que se apresenta mais oleosa que as demais.

A amostra foi enviada para análise por RMN, porém não houve tempo hábil para a análise desses dados e possível elucidação da molécula.

Espectros de RMN obtidos a partir da amostra HB₃C.

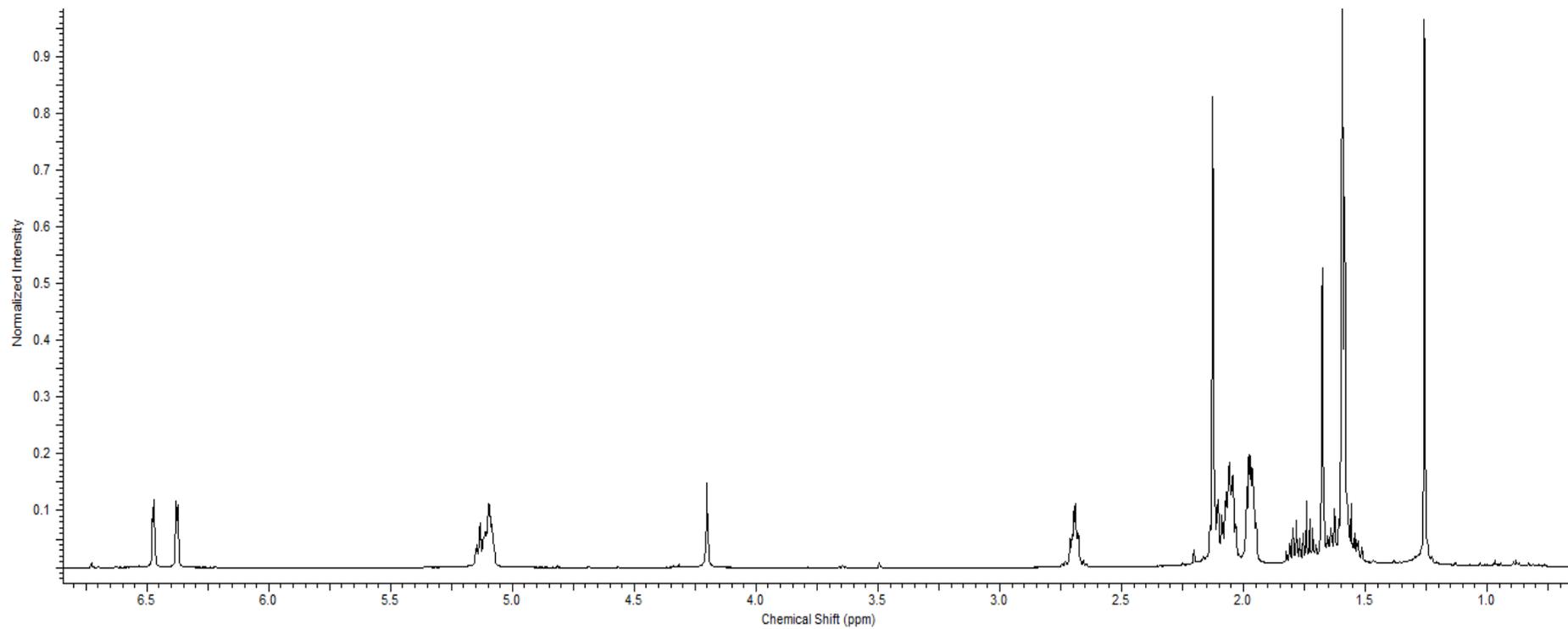


Figura 29 - Espectro de RMN de ¹H da substância HB₃C solubilizada em CDCl₃, a 500,13 MHz.

5.6 Fracionamento da amostra HC por CCAFN

A fração HC, originada da coluna de pré-fracionamento da F(Hex) do EECB, foi fracionada por CCAFN para possível isolamento das substâncias majoritárias, como mostra a figura 30.

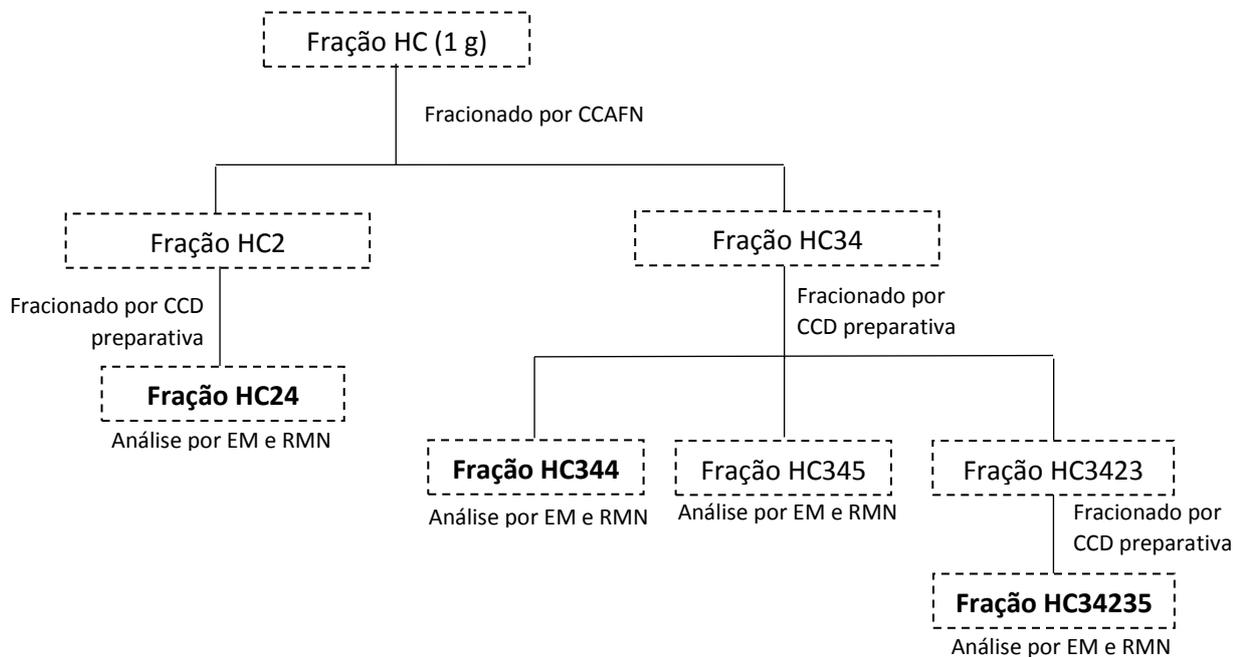


Figura 30 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da amostra HC.

Foi utilizada uma coluna de 2 cm x 75 cm, com 1 g de amostra e 50 g de sílica gel, tendo o volume morto igual a 40 mL e sistema de eluição no modo gradiente composto por $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$, conforme tabela 12:

Frações	Coluna de isolamento HC	
	Gradiente	
	CHCl_3 (%)	AcOEt (%)
1 ^a (2x)	100	--
2 ^a (2x)	90	10
3 ^a (2x)	85	15
4 ^a (2x)	80	20
5 ^a (2x)	70	30
6 ^a (2x)	--	100

Tabela 12 - Gradiente utilizado na coluna de isolamento da amostra HC.

As frações coletadas dessa coluna foram analisadas por CCD em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2) e revelada com vanilina sulfúrica, conforme figura 31 e o processo de isolamento da substâncias majoritárias está descrito nos itens seguintes.

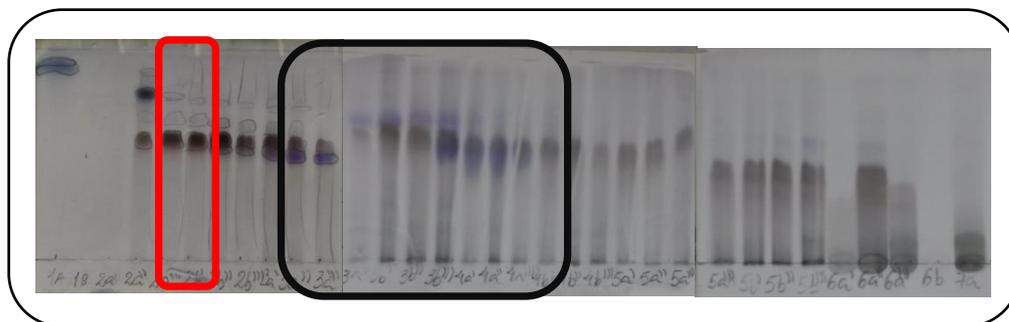


Figura 31 - Análise por CCD da coluna de isolamento da amostra HC eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2) e revelada com vanilina sulfúrica.

5.6.1 Isolamento da amostra HC24

As duas primeiras frações, sinalizadas na figura 31 apresentaram $R_f = 0,57$, massa de 300 mg quando pesadas juntas e formaram uma mistura de cristal com um sólido amarelo escuro no frasco onde foram coletadas, como ilustrado na figura 30. Quando reveladas com vanilina sulfúrica apresentam coloração marrom, coloração preta em cloreto férrico e coloração alaranjada quando em NP-PEG. Quanto à absorção no ultravioleta, apresentou uma mancha escura quando revelada no comprimento de onda 254 nm e esverdeada quando em 366 nm. Essas colorações podem ser características de substâncias fenólicas (HARBOME, 1998; WAGNER & BLADT, 2001). Estas frações foram reunidas, denominada de HC2 e levadas a análises por EM conforme figura 32.

Observa-se que os picos com maior abundância relativa são os de m/z 603, no modo positivo, e m/z 601, no modo negativo. De acordo com dados da literatura acredita-se que essa massa é relativa à presença de benzofenona prenilada, uma classe de substâncias isoméricas de comum ocorrência na família Cluseaceae e que, uma destas, a Garcinielliptona FC, já foi isolada do extrato hexânico das sementes de bacuri por meio de cromatografia em coluna

aberta e CCD preparativa, utilizando os eluentes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção de 9:1, sendo esta identificada por EM e RMN. (SILVA *et al.*, 2015; COSTA JÚNIOR, *et al.*, 2012). Essa substância apresentou significativa inibição de crescimento em duas linhas de células tumorais, atividade leishmanicida, efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo*, além de efeitos anticonvulsivante e vaso relaxante (NASCIMENTO *et al.*, 2014; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011b; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2012; ARCANJO *et al.*, 2014; ACUÑA *et al.*; 2009).

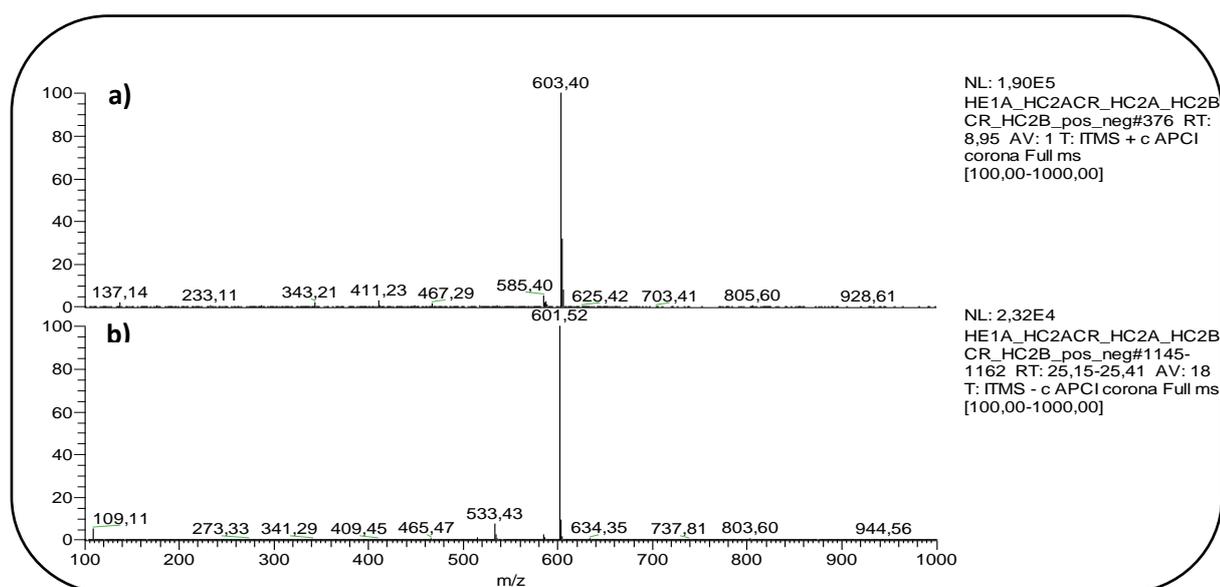


Figura 32 - Espectro de massas da amostra HC2 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).

Em seguida, o pico de m/z 601 foi fragmentado conforme espectros da figura 33 que apresenta picos intensos de m/z 465 e 409. Esses espectros confirmam a presença de uma benzofenona prenilada com fórmula molecular contendo $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_6$ e massa 602g/mol que se apresenta de forma isomérica na natureza (LOPEZ, 2014; PICCINELLI *et al.*, 2009).

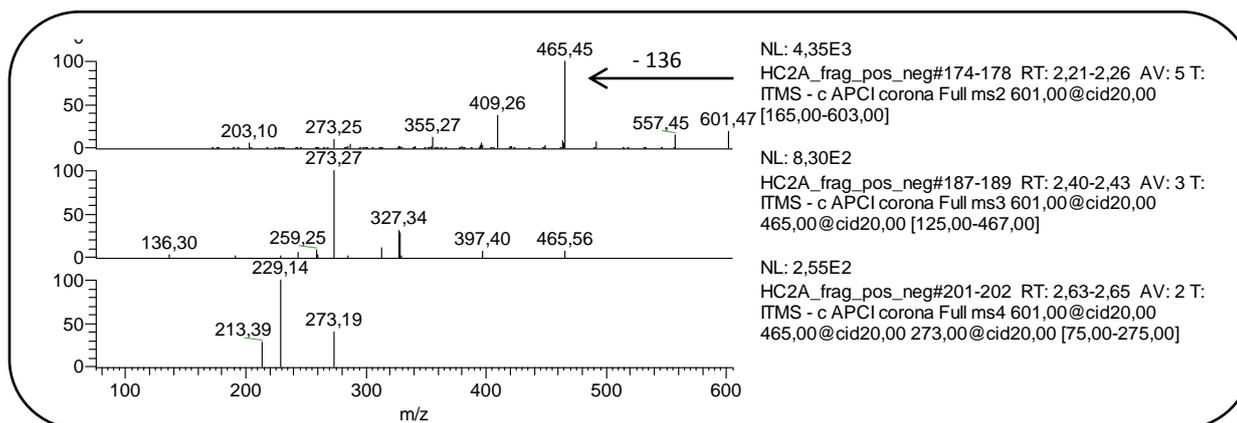


Figura 33 - Espectros de MSn da amostra HC2 referente ao pico de m/z 601 ionizado em APCI (-).

Dessa fração 40 mg foram usados para análise por CCD de fase normal preparativa utilizando uma placa de vidro medindo 20 cm x 20 cm com 0,25 mm de sílica gel 60 contendo indicador de fluorescência UV₂₅₄ e eluída em CHCl₃:MeOH na proporção 20:1, conforme imagem 35. Esta mistura elutropica foi adaptada a partir de relatos da literatura para detecção de fluroglucínóis, dos quais as benzofenonas preniladas fazem parte (PYKA, 2014).

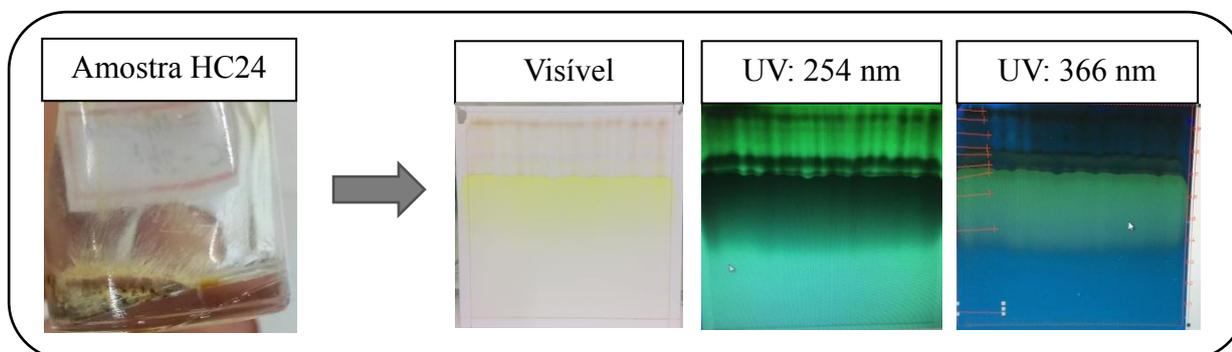


Figura 34 - Amostra HC24 eluída em CHCl₃:MeOH na proporção 20:1 e revelada em UV 254 e 366nm.

A mancha majoritária amarela foi raspada da placa com o auxílio de um estilete e a extração foi realizada com acetato de etila por 5 vezes finalizando com metanol. Após essa análise foi possível obter uma fração oleosa de cor amarela e massa de 14 mg que foi chamada de HC24. Quando analisada por CCD, apresentou apenas duas manchas de Rf muito próximo como mostra a imagem 36.

Essa fração foi enviada para análise por RMN.

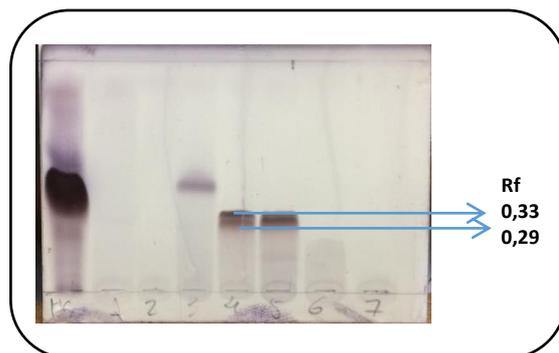


Figura 35 - Amostra HC24 eluída em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ na proporção 20:1 e revelada em vanilina sulfúrica.

5.6.2 Identificação da amostra HC24 por RMN

A análise por espectroscopia por RMN de ^1H apresentou o seguinte espectro:

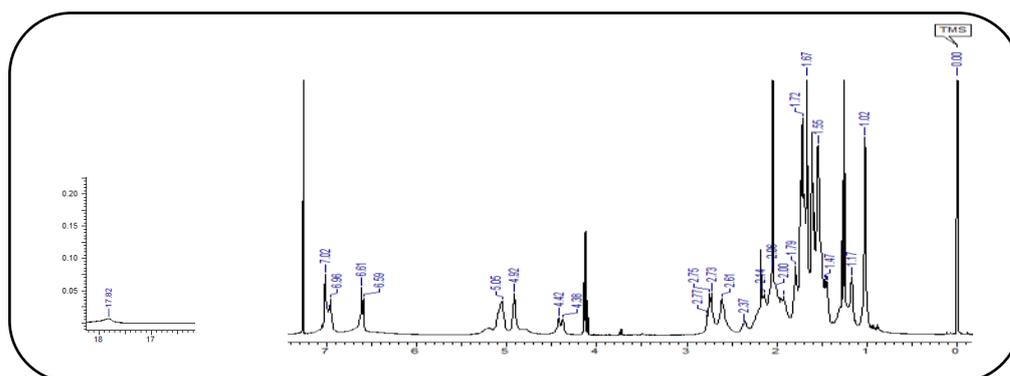


Figura 36 - Espectro de RMN ^1H da substância HC24 solubilizada em CDCl_3 , a 500,13 MHz. Espectros ampliados no final deste item.

O espectro de RMN ^1H apresentou sinais de hidrogênios na região de aromáticos com deslocamentos químicos (δ) em 6,6 (d 8,4 Hz), 7,0 (m) e 7,02 (s). Também foi possível observar a presença de sinais referentes a oito metilas e quatro sinais de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 em cadeias abertas com δ em 4,38 (s), 4,42 (s), 4,92 (t 6,5 Hz) e 5,09 (s largo). No δ 17,8 (s largo e de baixa intensidade) pode-se observar a presença característica de hidrogênio de hidroxila comum em substâncias que sofrem tautomeria.

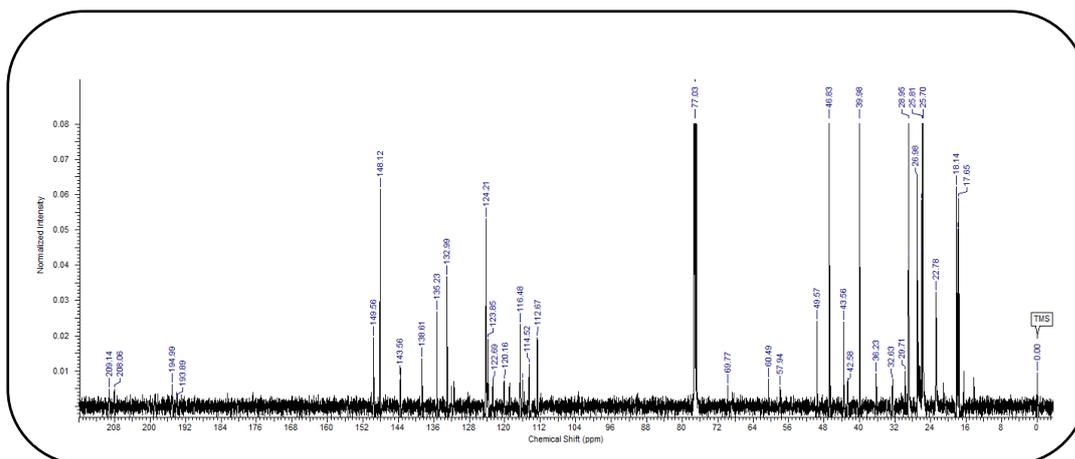


Figura 37 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância HC24 solubilizada em CDCl_3 , a 125,76 MHz.

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C pode-se observar a presença dos carbonos com deslocamentos típicos de região de aromático em δ 114,5, 116,5 e 124,05, assim como, aqueles que representam dois grupos hidroxila como substituintes do anel em δ 143,4 e 149,5. Encontra-se também os sinais referentes a três carbonilas em δ 193,89, 194,85 e 209.

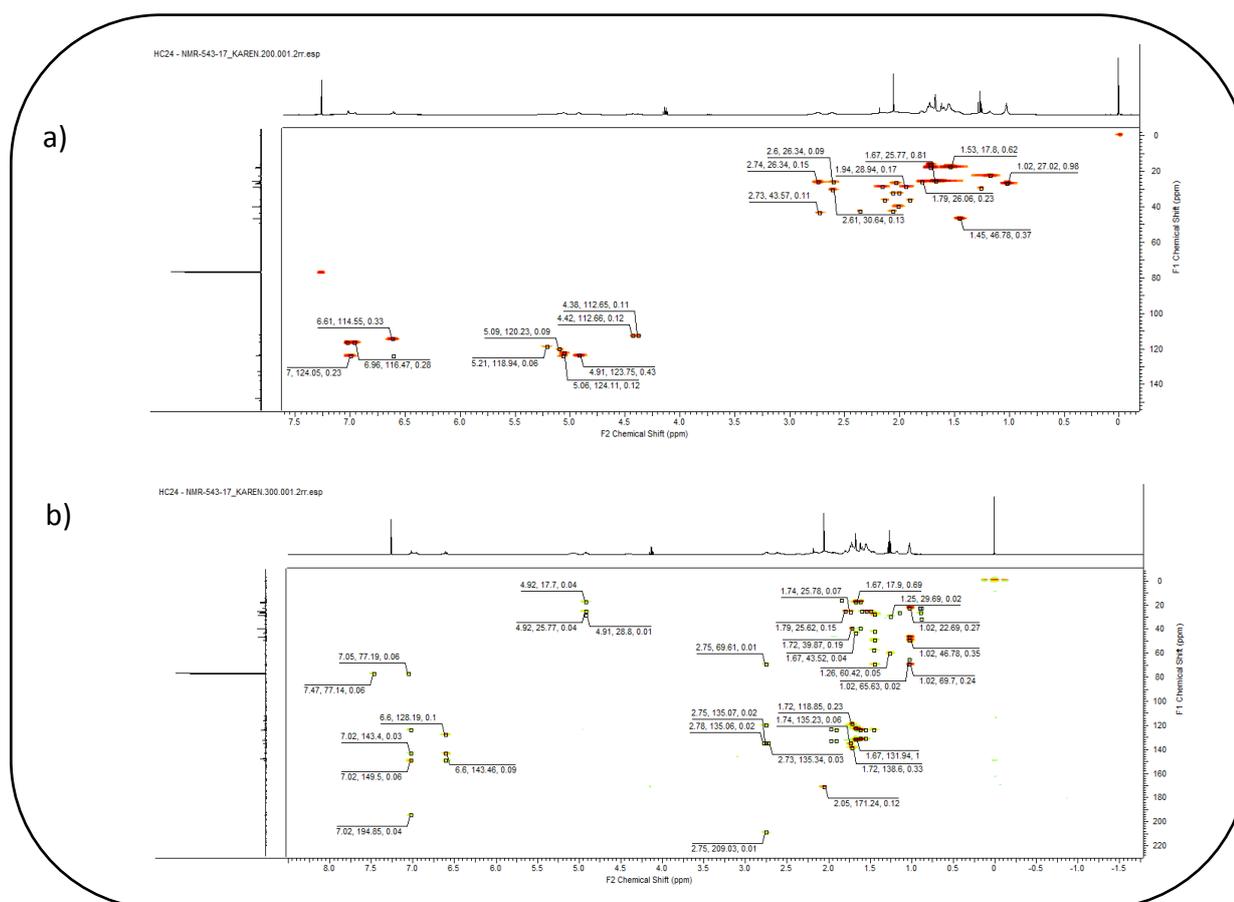


Figura 38 – Mapa de correlações de HSQC (a) e HMBC (b) da substância HC24 solubilizada em CDCl_3 .

Os espectros bidimensionais apresentaram as correlações que permitiram a elucidação estrutural da molécula em comparação com dados encontrados na literatura.

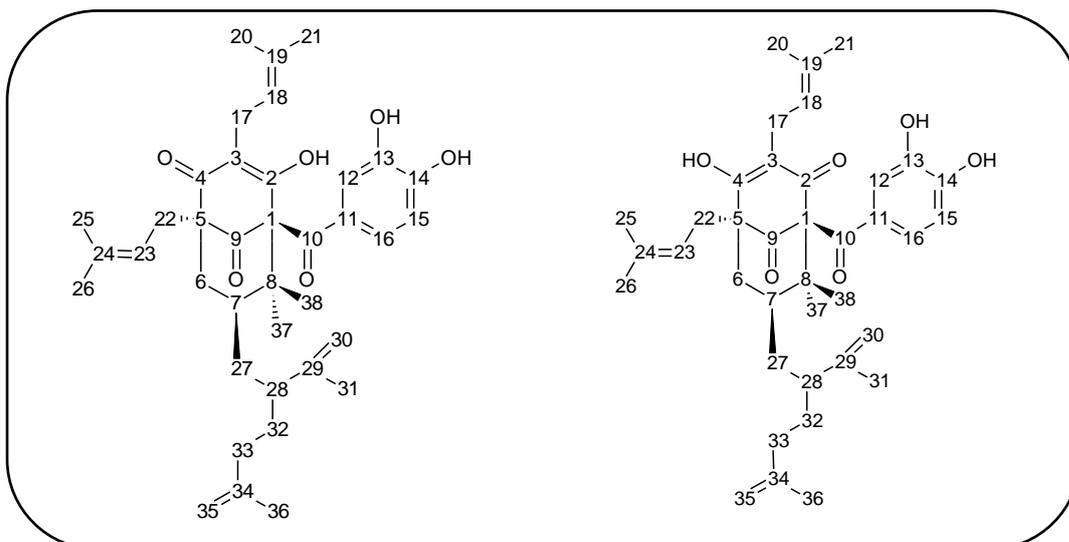


Figura 39 - Par tautomérico da Garcinielliptona FC – Substância (1) - 8,8-dimetil-1-(3,4-dihidroxibenzil)-2-hidroxi-3,5-di(d,d-dimetilalil)-7-(2-isopropenilhex-5-enil)-7a-H-trans-biciclo[3.3.1]nona-2-en-4,9diona. Substância (1A) - 8,8-dimetil-1-(3,4-dihidroxibenzil)-4-hidroxi-3,5-di(d,d-dimetilalil)-7-(2-sopropenilhex-5-enil)-7a-H-trans-biciclo [3.3.1]nona-3-en-2,9-diona.

Foi identificada então a substância conhecida por Gacinielliptona FC, uma benzofenona prenilada, já relatada na literatura, presente no extrato hexânico das cascas e sementes de bacuri que se apresenta como um par tautomérico, figura 40 (SILVA, *et al.*, 2015).

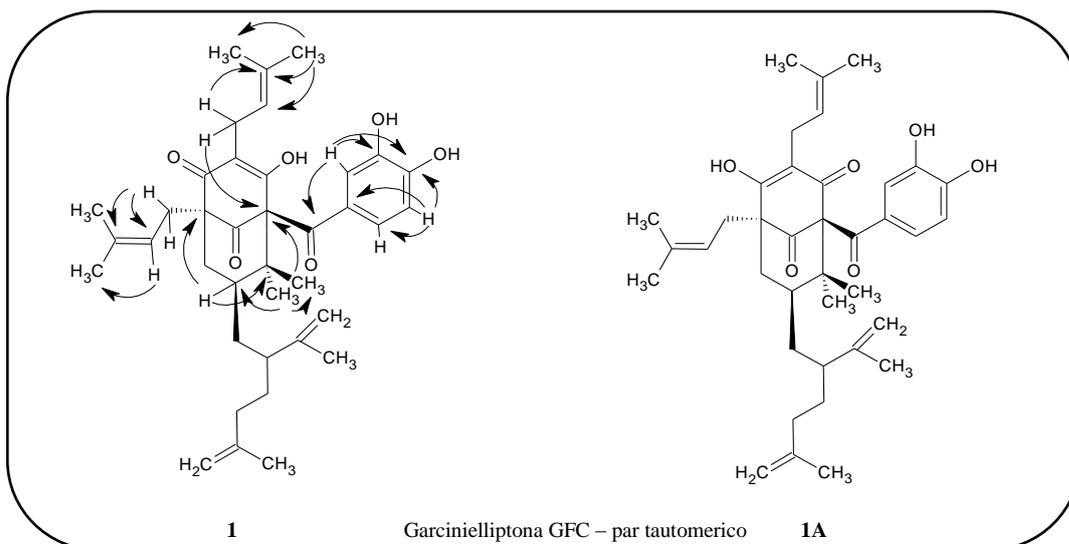


Figura 40 - Correlações entre hidrogênios e carbonos da Garcinielliptona FC.

Os dados apresentados nos espectros foram organizados na tabela 13 para melhor visualização e comparação com os dados da literatura.

Posição	Garcinielliptona FC (1)			Garcinielliptona FC (1) SILVA, <i>et al.</i> , 2015	
	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm)	HMBC	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm)
1	---	69,7	H7, H17, H37	---	69,9
2	---	193,89	---	17,84 (OH)	194,1
3	---	116,41	---	---	116,1
4	---	194,89	---	---	198,8
5	---	57,7	H7	---	58
6	$\alpha = 2,06$ (d 13,1) $\beta = 2,36$ (d 13,1)	42,5	---	$\alpha = 2,04$ (d 13,5) $\beta = 2,32$ (d 13,5)	42,8
7	1,45 (m)	46,7	H37	1,46 (m)	47
8	---	49,47	H7, H37	---	49,8
9	---	209,0	H17	---	209,3
10	---	194,85	H12	---	195,8
11	---	128,1	H15	---	128,2
12	7,02 (sl)	116,5	---	7,02 (d, 4,5)	116,7
13	---	143,4	H12, H15	7,52 (OH)	143,7
14	---	149,5	H12,H15	7,69 (OH)	149,8
15	6,6 (d 8,4)	114,5	---	6,57 (d, 8,4)	114,6
16	7,0 (m)	124,05	H15	6,99	124,3
17	$\alpha = 2,61$ (sl) $\beta = 2,75$ (d 13,2)	26,3	---	$\alpha = 2,63$ (dl, 13,8) $\beta = 2,71$ (dl, 13,8)	26,4
18	5,09 (sl)	120,05	H17, H21	5,36 (t)	120,3
19	---	135	H17, H21	---	135,3
20	1,67 (s)	25,78	H21	1,88 (s)	26,1
21	1,72 (sl)	18,17	---	1,73 (s)	18,7
22	$\alpha = 1,90$ (m) $\beta = 2,13$ (sl)	36,3	---	$\alpha = 1,95$ (15, 7,2) $\beta = 2,16$ (14,5,8,0)	36,4
23	4,92 (t 6,5)	123,75	H α 22	4,97 (t 7,2)	124,1
24	---	133	H α 22	---	133,1
25	1,67 (s)	25,7	H23	1,67 (s)	22,9
26	1,53 (s)	17,7	H23	1,53 (s)	17,8
27	2,0 (m 2H)	32,6	---	1,88 (m, 2H)	32,1
28	2,73 (d 12,9)	43,57	---	2,64 (dl, 13,8)	43,8
29	---	148,15	---	---	149,8
30	4,38 (s)	112,65	---	4,30 (s)	115,1
31	1,53 (s)	17,8	---	1,53 (s)	17,8
32	$\alpha = 2,0$ (m) $\beta = 2,06$ (m)	32,6	---	$\alpha = 1,88$ (m) $\beta = 1,96$ (m)	32,1
33	2,01 (m 2H)	40	---	1,88 (m 2H)	36,4
34	---	148,13	---	---	148,3
35	4,42 (s 2H)	122,66	---	4,64 (s) 4,66 (s)	112,9
36	1,79 (s)	26,06	---	1,73 (s)	25,9
37	1,02 (s)	27,02	H7, H38	0,98 (s)	27,2
38	1,17 (s)	22,81	H37	1,18 (s)	23,3

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da Garcinielliptona FC (CDCl_3).

Espectros de RMN ampliados referente à substância Garcinielliptona FC:

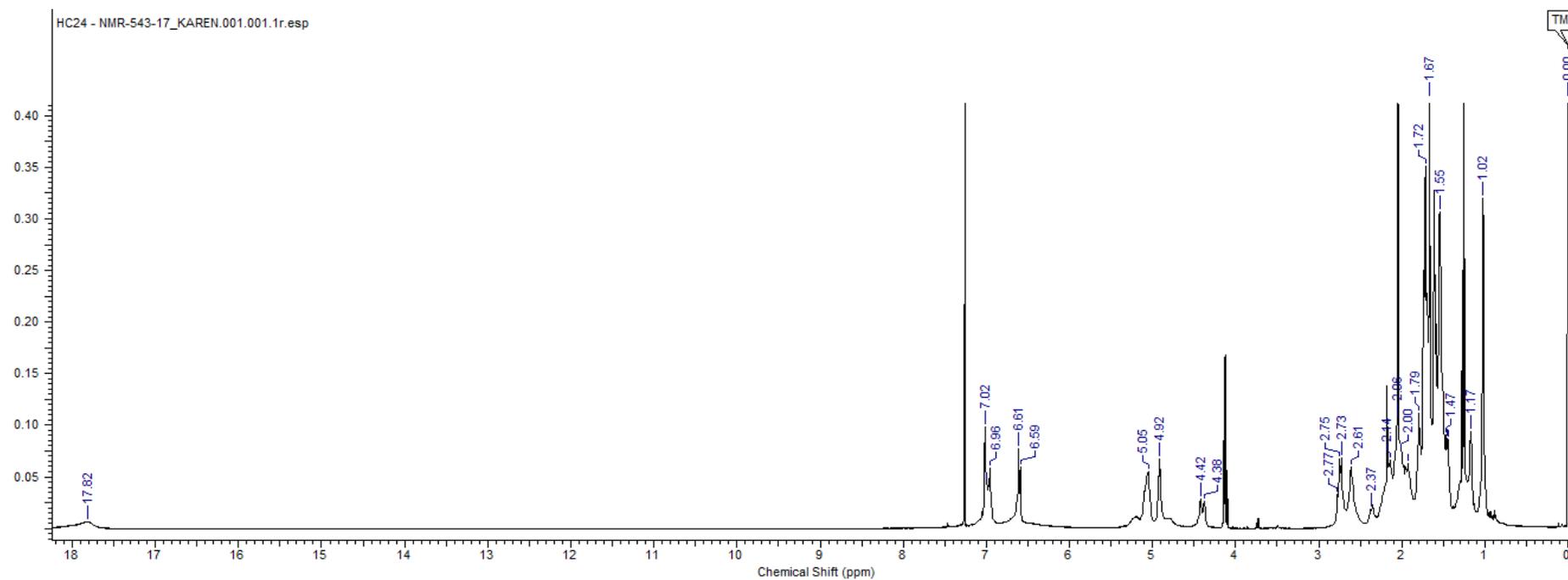


Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H da substância HC24 solubilizada em CDCl_3 , a 500,13 MHz.

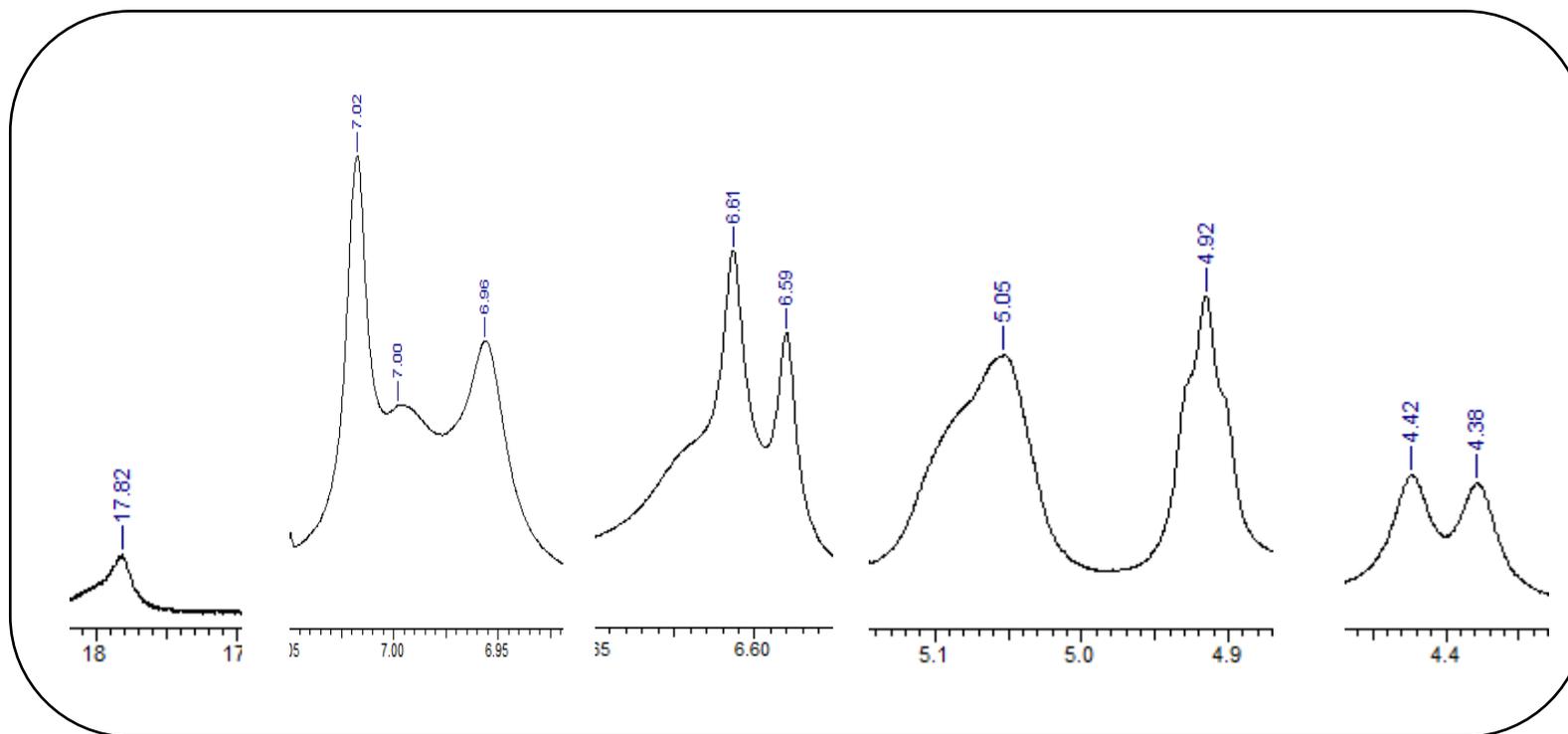


Figura 42 - Ampliação dos sinais de RMN de 1H da substância HC24 nas regiões de 17,82 a 4,4 ppm.

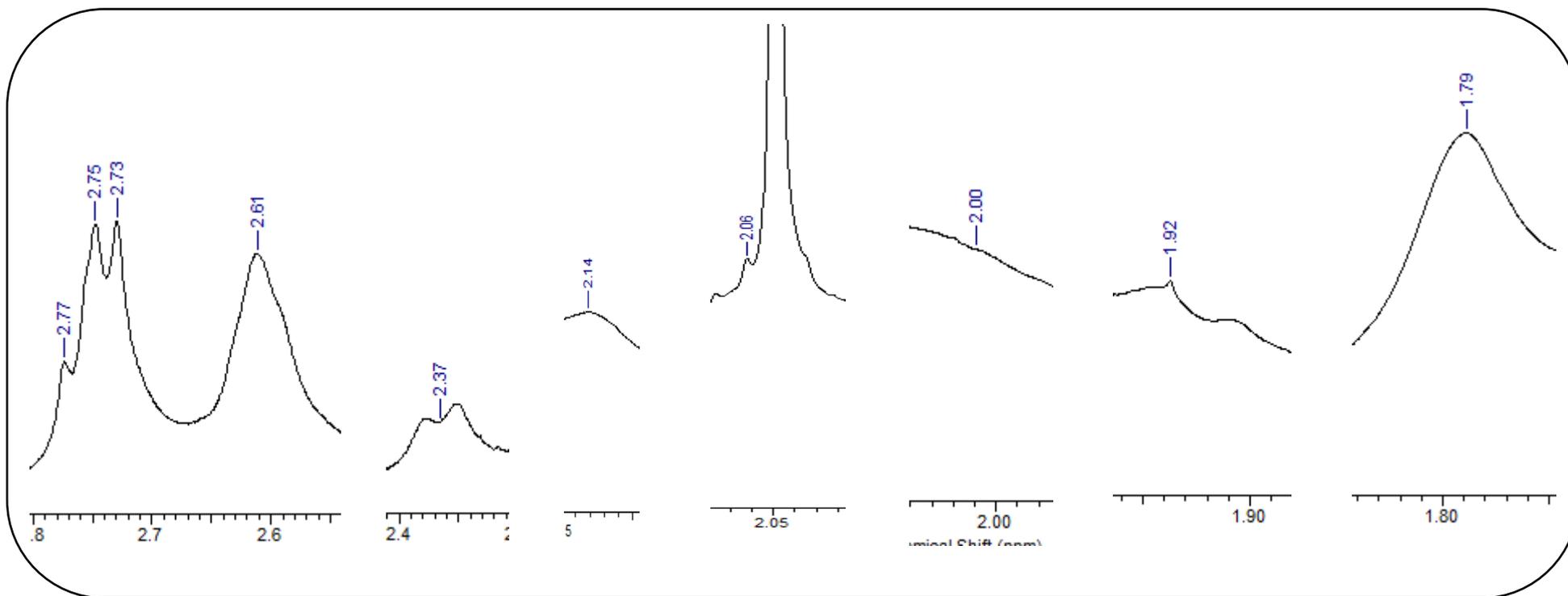


Figura 43 - Ampliação dos sinais de RMN de 1H da substância HC24 nas regiões de 2,77 a 1,79 ppm.

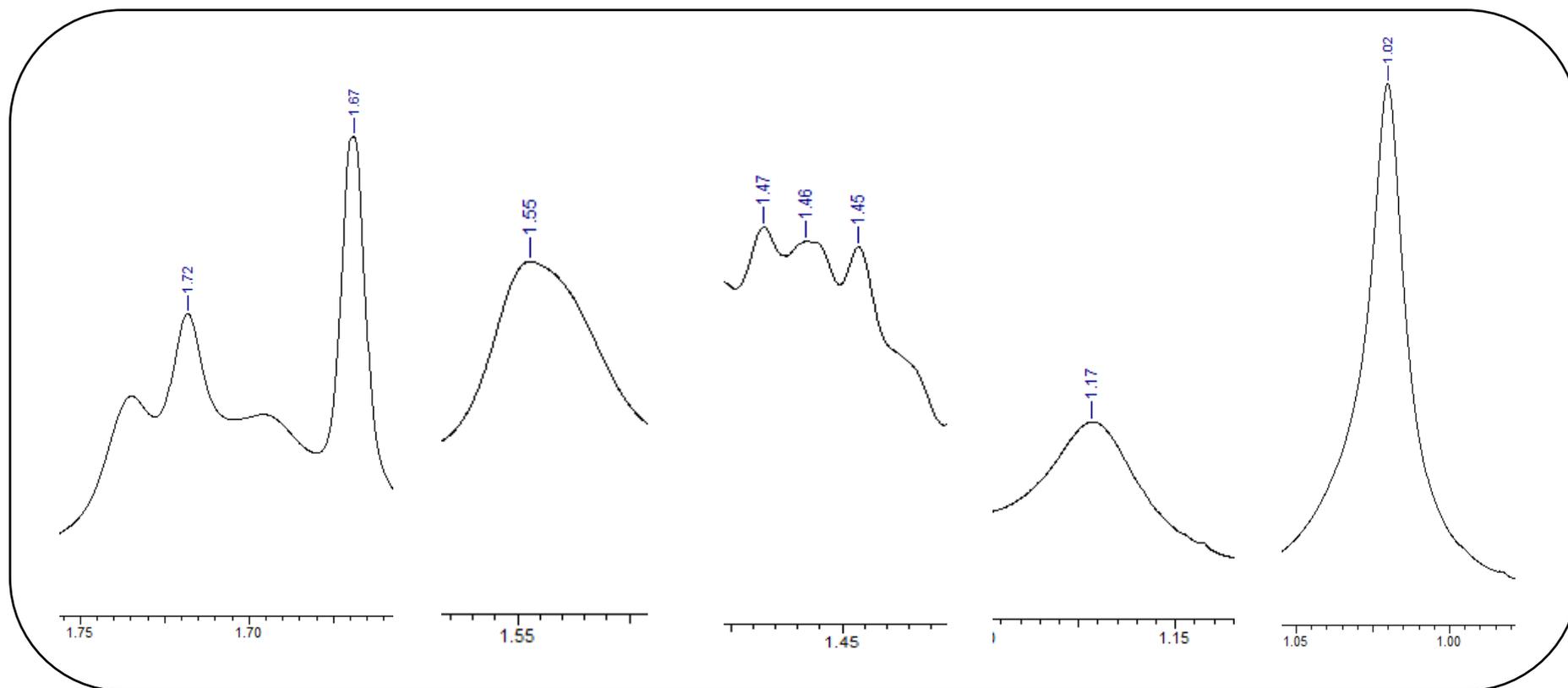


Figura 44 - Ampliação dos sinais de RMN de 1H da substância HC24 nas regiões de 1,72 a 1,02 ppm.

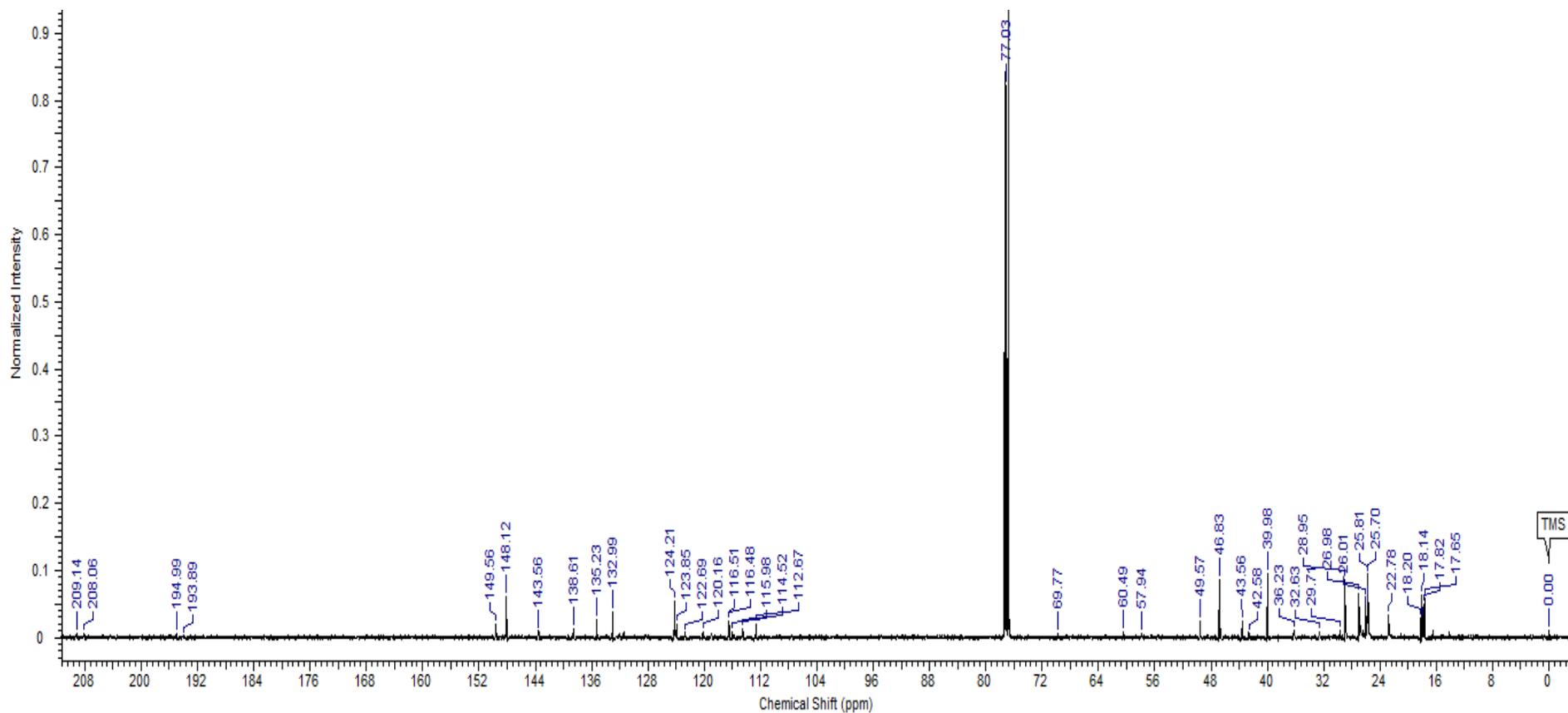


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância HC24 solubilizada em CDCl_3 , a 125,76 MHz.

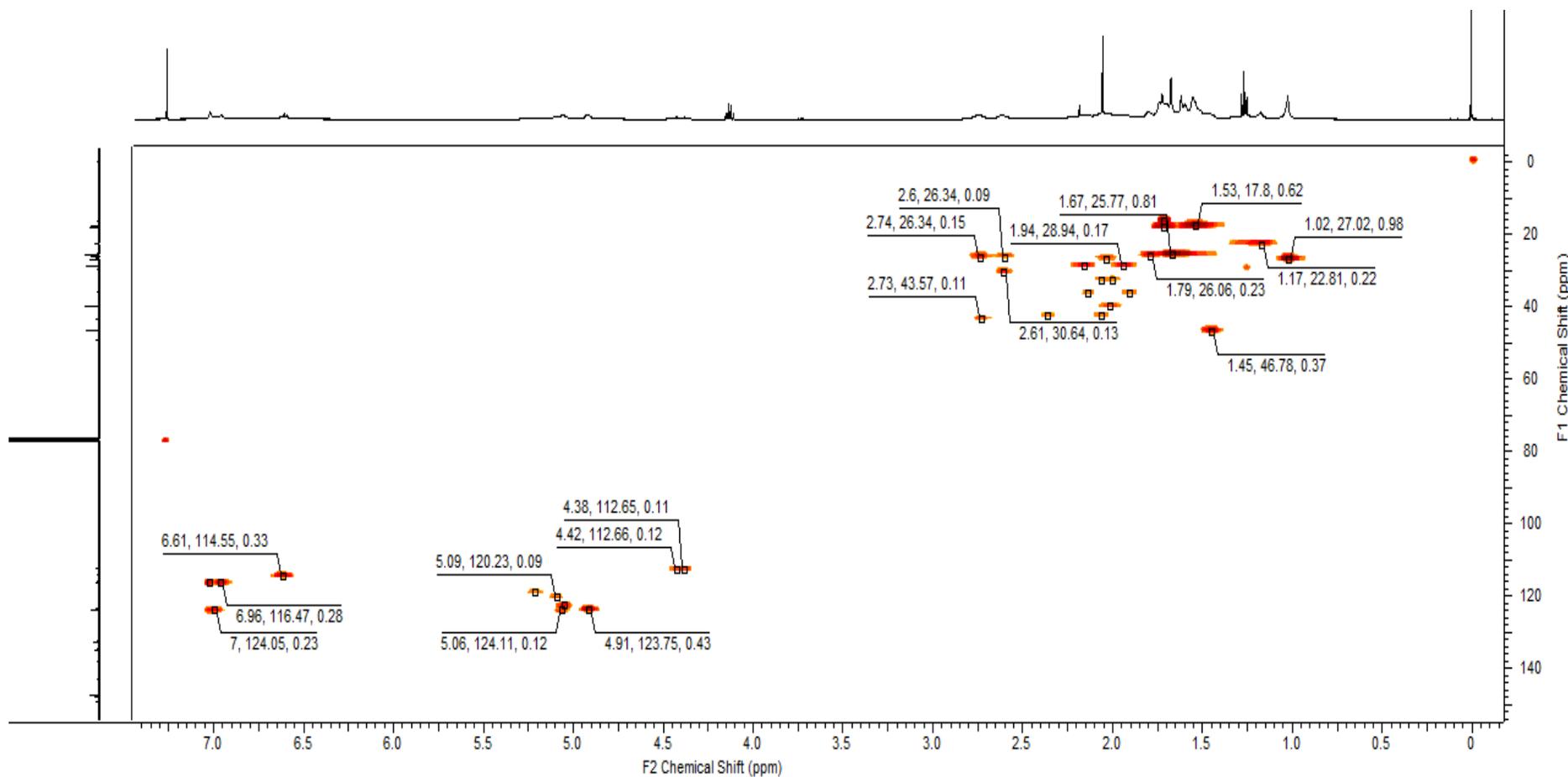


Figura 46 – Mapa de correlação de HSQC da substância HC24 solubilizada em CDCl_3 .

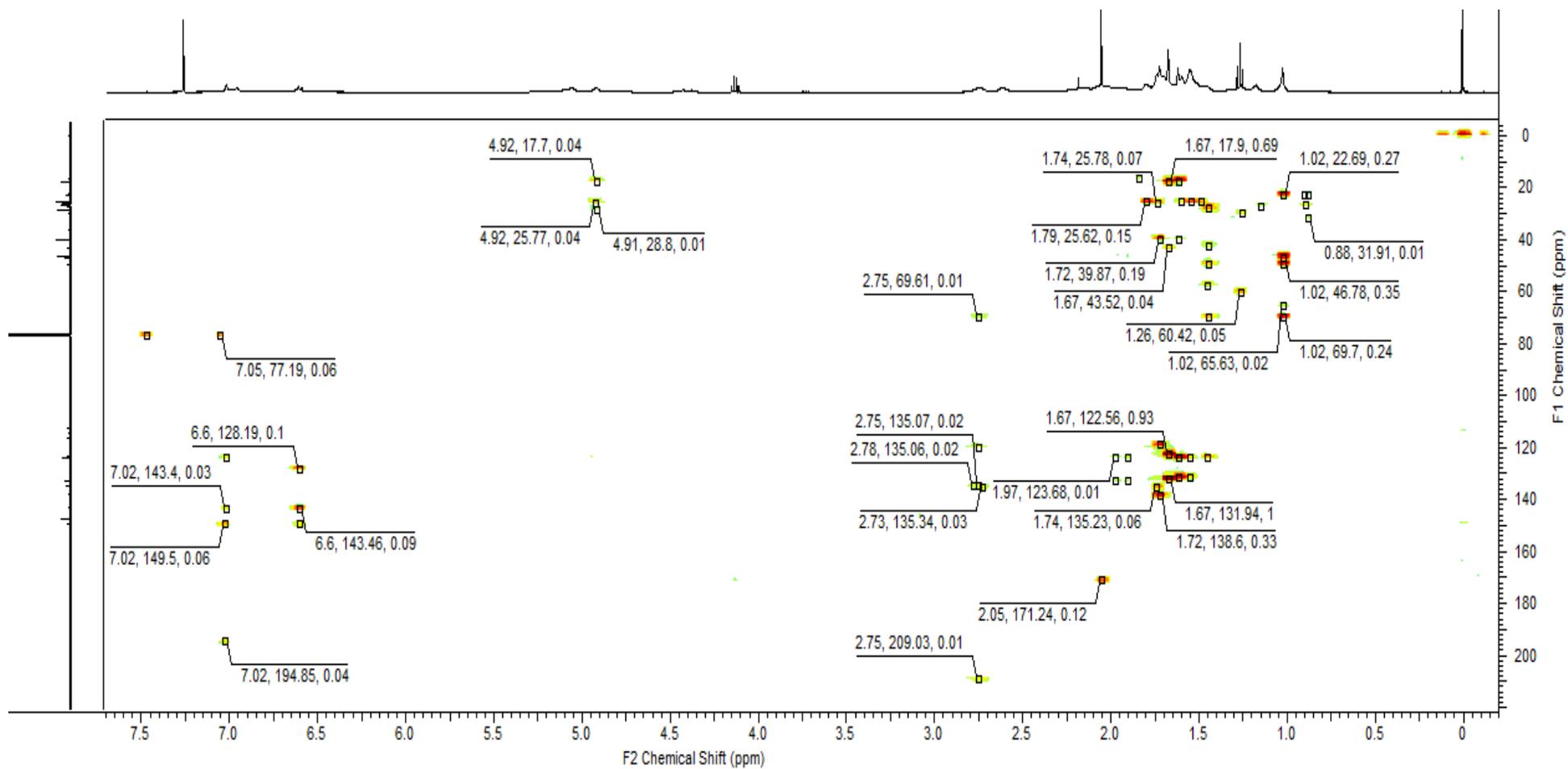


Figura 47 - Mapa de correlação de HMBC da substância HC24 solubilizada em CDCl₃.

5.6.3 Isolamento de substâncias a partir da amostra HC34

As frações destacadas à direita da figura 31 foram reunidas e chamadas de HC34. Essa fração, quando analisada por CCD com hexano, clorofórmio e acetato de etila (1:7:2), apresentou duas manchas majoritárias uma com $R_f = 0,34$ e a outra com $R_f = 0,44$. Essas manchas quando reveladas com vanilina sulfúrica apresentam coloração lilás e rocha, revelam no UV 366 nm apresentando coloração azulada, porém, não revelam em λ 254 nm, cloreto férrico nem em NP-PEG.

Para o isolamento das manchas majoritárias a fração foi fracionada por CCD de fase normal preparativa utilizando uma placa de vidro medindo 20 cm x 20 cm com sílica gel contendo indicador de fluorescência UV₂₅₄ e eluída em hexano, clorofórmio e acetato de etila na proporção 1:7:2.

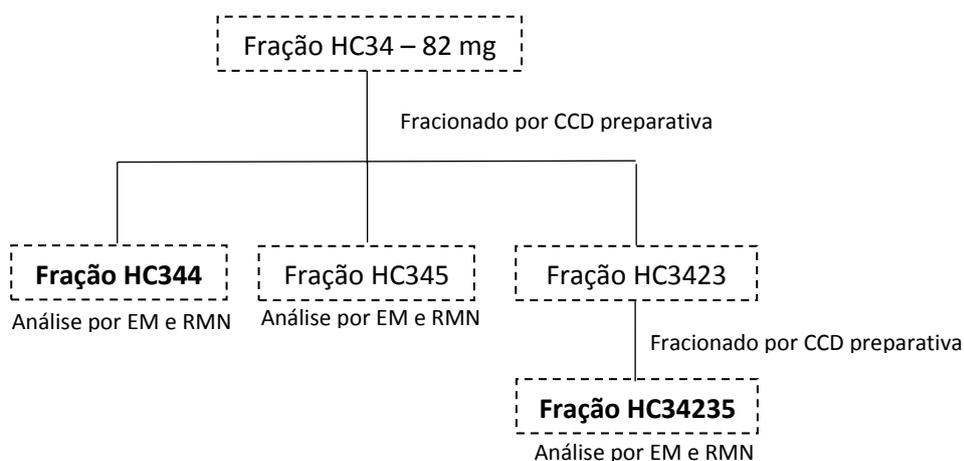


Figura 48 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da amostra HC34.

Dessa placa foram extraídas cinco frações que podem ser vistas na figura 49.

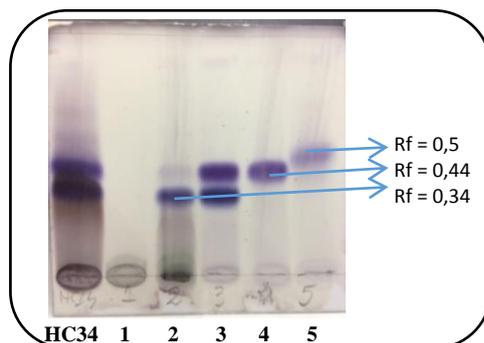


Figura 49 - Análise por CCD da amostra HC34 eluída em Hex:CHCl₃:AcOEt (1:7:2) e revelada com vanilina sulfúrica.

As frações HC34-4 e HC34-5 de Rf = 0,44 e 0,5, respectivamente foram submetidas a análises por EM e RMN, porém, não foi possível realizar a análise dos dados da fração HC34-5, pois esta ainda se apresentou em mistura.

A fração HC34-4, com massa de 2 mg, apresentou espectro de massas com um único pico intenso de m/z 455, em APCI no modo negativo, e com pico base de m/z 439 em APCI no modo positivo, como pode ser observado nos espectros a seguir.

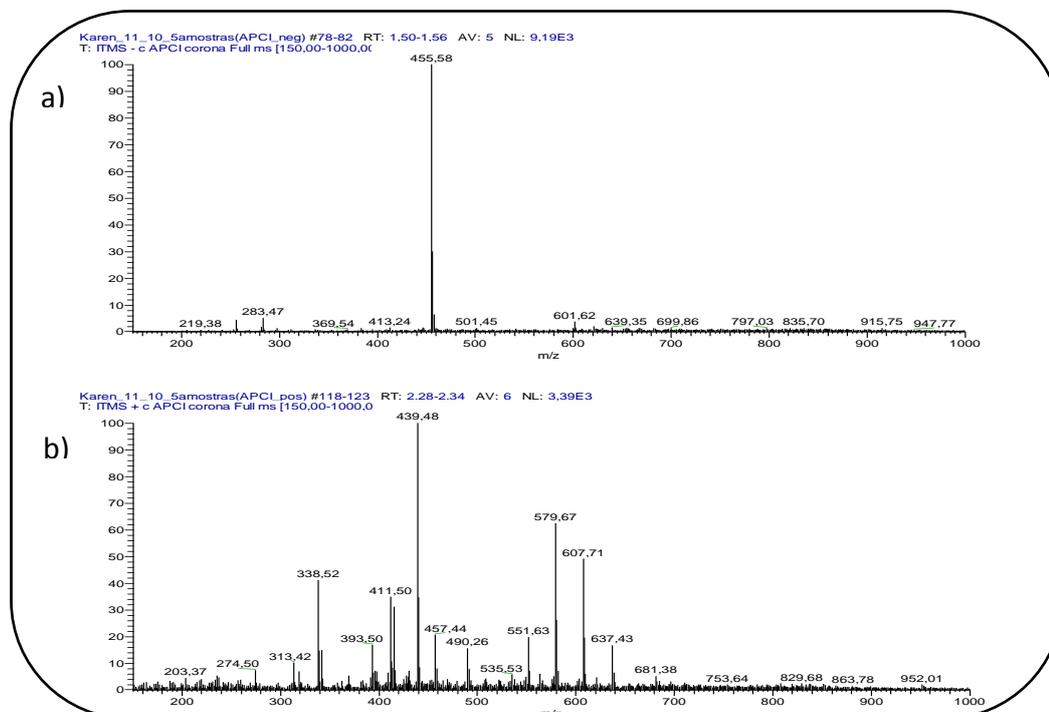


Figura 50 - Espectros de massas da amostra HC34-4 analisadas em APCI no modo negativo (a) e positivo (b).

Em seguida, esta amostra foi submetida à análise por RMN de ^1H e seu espectro pode ser observado na figura abaixo. A análise do espectro e possível elucidação da substância não foram realizadas por falta de tempo hábil.

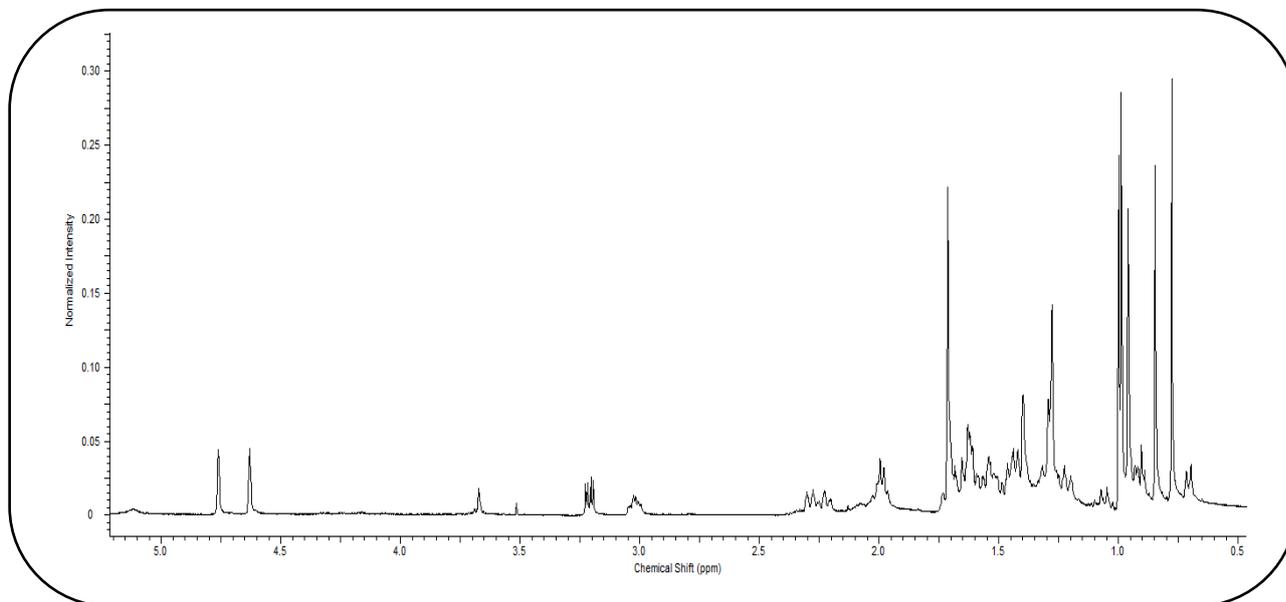


Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H da substância HC34-4 solubilizada em CDCl_3 , a 500,13 MHz.

As frações HC34-2 e HC34-3 foram reunidas resultando na fração codificada como HC34-23 e submetidas a um novo fracionamento por CCD preparativa em uma placa medindo 10 cm x 10 cm, utilizando o mesmo sistema de eluição citado a cima, Hex: CHCl_3 :AcOEt (1:7:2), com o fim de isolar a mancha de $R_f = 0,34$.

A partir do fracionamento da amostra HC34-23 foram extraídas sete frações das quais a fração 5, 6 e 7 apresentaram uma única mancha. Estas foram reunidas resultando em massa de 1 mg, denominadas de HC34-23-5 e submetidas a análises por EM e RMN para identificação.

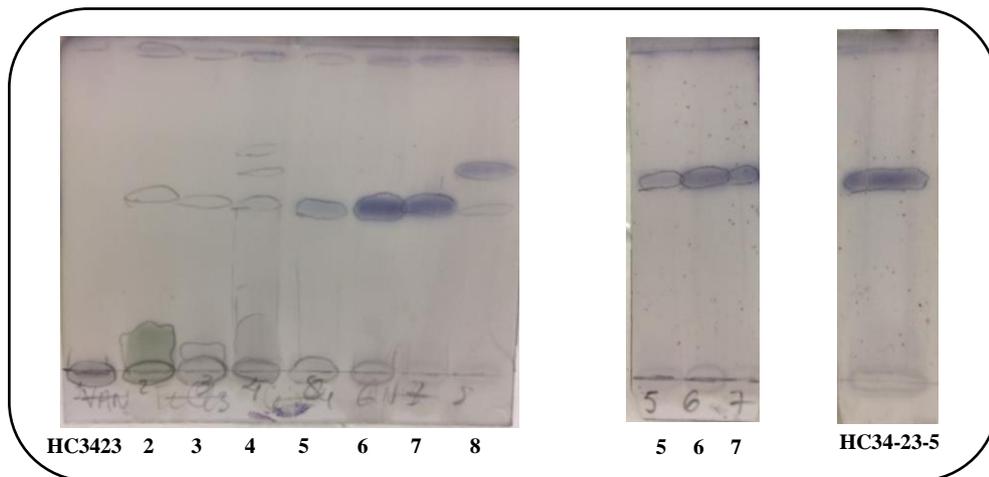


Figura 52 – Análise por CCD da amostra HC34-23-5 eluída em Hex:CHCl₃:AcOEt (1:7:2) e revelada com vanilina sulfúrica.

Quando analisados seus espectros de massas e RMN pôde-se observar que a amostra estava em mistura o que impediu a elucidação da substância.

5.6.4 Fracionamento da amostra HE por CCAFN

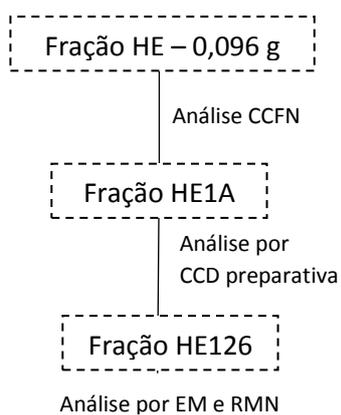


Figura 53 - Fluxograma do fracionamento e isolamento da Fração HE.

A fração HE foi analisada por CCD com sistema de eluente CHCl₃:AcOEt (1:1). Quando revelada com vanilina sulfúrica a mancha majoritária de R_f = 0,6 apresentou

coloração marrom, quando em cloreto férrico apresentou coloração escura, em UV₂₅₄ apresentou uma mancha escura e em UV₃₆₆ coloração amarela esverdeada. Essas colorações podem indicar presença de substâncias fenólicas.

Então essa amostra foi submetida à análise por CCAFN filtrante sendo utilizada uma coluna de 1,5 cm x 75 cm, com 90 mg de amostra e 2,7 g de sílica gel, tendo o volume morto igual a 8 mL e sistema de eluição no modo isocrático composto por CHCl₃/AcOEt (1:1).

Foram obtidas cinco frações dessa coluna e estas foram analisadas por CCD eluída em CHCl₃:AcOEt (1:1) e revelada com vanilina sulfúrica conforme imagem “a” da figura 48.

A primeira fração, HE1A, foi analisada utilizando um sistema de eluição próprio para flavonoides que é composto por clorofórmio, acetona e ácido fórmico (75:16,5:8,5) e revelado com cloreto férrico, vanilina sulfúrica e NP-PEG como pode ser observado na imagem “b” da figura 51 (WAGNER & BLADT, 2001).

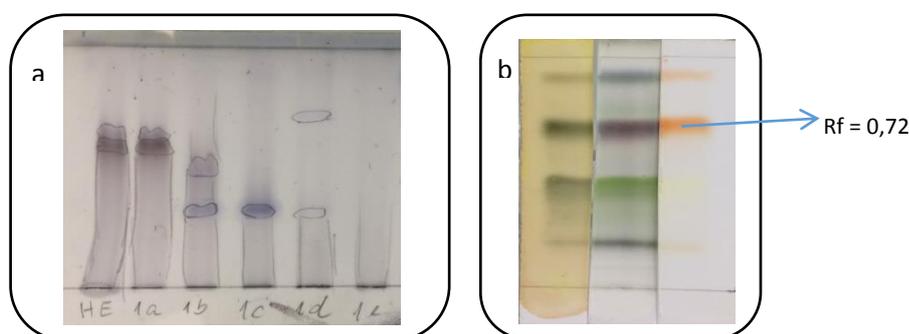


Figura 54 - Imagem “a”: análise por CCD da coluna da amostra HE eluída em CHCl₃:AcOEt (1:1); Imagem “b”: análise da amostra HE1A eluída em clorofórmio, acetona e ácido fórmico (75:16,5:8,5) e revelado com cloreto férrico, vanilina sulfúrica e NP-PEG, respectivamente.

Observa-se que a mancha majoritária que revelou em NP-PEG na cor alaranjada de Rf = 0,72 apontando a presença de um flavonoide. Portanto a amostra HE1A foi analisada por CCD preparativa utilizando uma placa de vidro de 20 cm x 20 cm com sílica gel e essa mancha, chamada de substância HE129, foi purificada e levada a análises por EM e RMN.

Na análise por EM pode-se observar novamente a presença de *m/z* 601 (APCI no modo negativo) e no espectro de massas de fragmentação a perda 136 Da, característica de

benzofenonas preniladas que é muito comum de benzofenonas preniladas encontradas na família Clusiaceae como citado anteriormente (LOPEZ, 2014; PICCINELLI *et al.*, 2009).

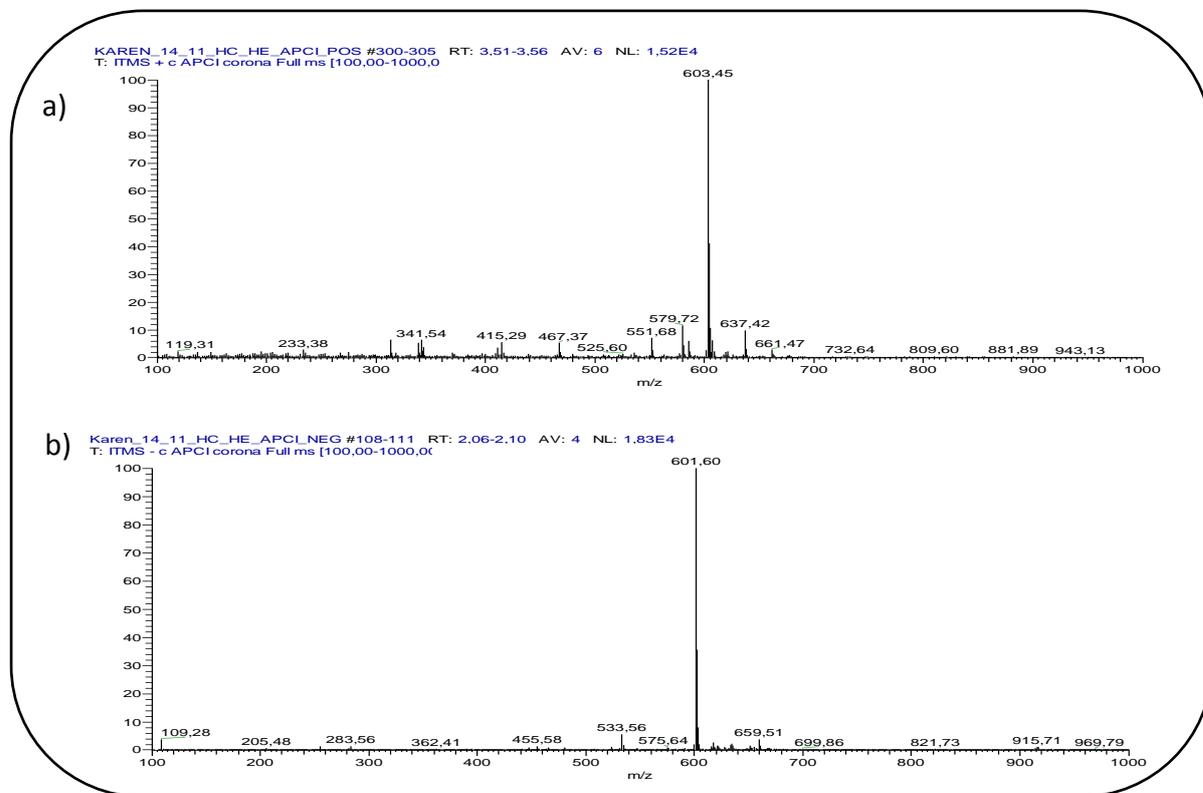


Figura 55 - Espectro de massas da amostra HE129 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).

Quando analisadas em uma mesma placa de CCD de fase normal com a mesma mistura eluitrópica, Hex/AcOEt 8:2, as amostras HE129 e a Garcinielliptona FC, substância isolada anteriormente, apresentam Rf diferente sendo a amostra HE129 de maior polaridade. E quando analisadas em CCD com a mistura eluitrópica característica para benzofenonas, CHCl₃/MeOH, estas apresentam o mesmo Rf. Portanto essa amostra pôde ser caracterizada como um isômero da Garcinielliptona FC. Não foi possível realizar a elucidação estrutural, pois a quantidade de amostra era de 2 mg o que impediu a análise dos espectros de RMN pois os sinais de ¹H apresentaram-se com baixa intensidade.

5.7 Fracionamento cromatográfico do EESB-DCM

Na segunda parte da análise cromatográfica foi realizado o fracionamento da F(DCM) do EESB, com uma coluna do tipo filtrante (relação amostra/sílica = 1 g / 30 g) sendo utilizado 0,500 g da fração, cerca de 20,4 g de sílica gel (15 cm de altura) em uma coluna de 2 cm x 75 cm.

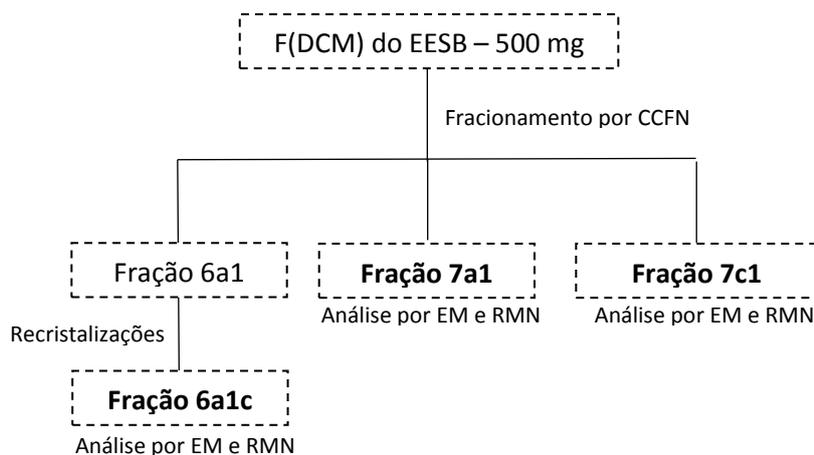


Figura 56 - Fluxograma geral do fracionamento e isolamento de substâncias a partir da F(DCM) do EESB.

A eluição foi realizada no modo gradiente primeiramente com o sistema de solventes Hex/ CHCl_3 , em seguida usou-se o sistema composto por $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$, como apresentado na tabela abaixo:

Frações	Coluna filtrante de F(DCM)		
	Gradiente		
	Hex (v)	CHCl_3 (v)	AcOEt (v)
1 ^a (1x)	1	---	---
2 ^a (2x)	3	1	---
3 ^a (2x)	1	1	---
4 ^a (3x)	1	3	---
5 ^a (3x)	---	1	---
6 ^a (3x)	---	3	1
7 ^a (3x)	---	1	1
8 ^a (3x)	---	1	3
9 ^a (3x)	---	---	1

Tabela 14 - Gradiente utilizado na coluna filtrante da fração F(DCM).

As frações obtidas foram analisadas por CCD a partir da 6^a fração, pois nas primeiras frações não pode ser observado manchas na placa.

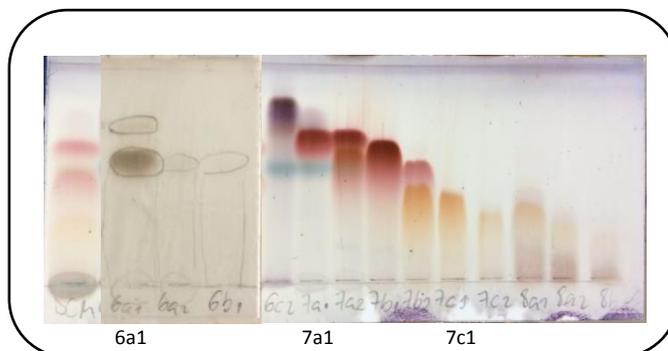


Figura 57 - Análise por CCD da coluna filtrante de F(DCM) eluídas em Hex/AcOEt (2:8) e reveladas com vanilina sulfúrica.

As frações 6a1, contendo 32 mg, a fração 7a1 com 35 mg e a fração 7c1 com 11,5 mg foram submetidas a novas análises para isolamento das substâncias majoritárias.

5.7.1 Isolamento da amostra 6a1

A amostra 6a1 apresentou-se como uma mistura de um sólido branco em solução amarela. Foi submetida a sucessivas análises por recristalização utilizando etanol a quente e sendo observada a formação de cristais com formato de cubos brancos à medida que a solução ia sendo resfriada. Apresentou $R_f = 0,57$, quando eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1, coloração roxa bem escuro quando revelado em vanilina sulfúrica, azulada quando revelado em cloreto férrico e amarela quando em NP-PEG sendo essas cores características de substâncias fenólicas.

Após purificação da amostra esta apresentou massa igual a 10 mg e foi submetida a análises por EM e RMN para possível identificação da sustância.

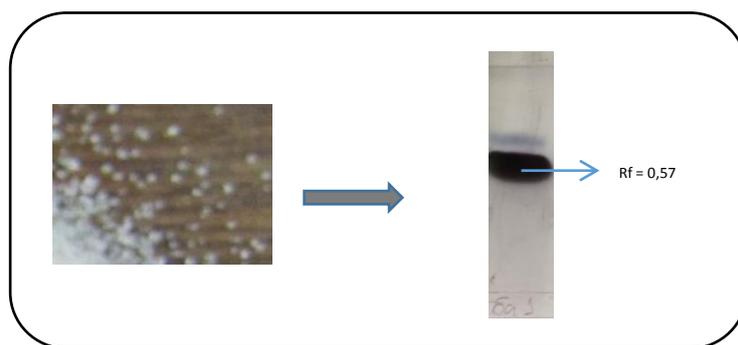


Figura 58 - Cristal formado pela substância 6a1 e placa de CCD eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1 e revelada em vanilina sulfúrica.

5.7.2 Identificação da substância 6a1 por EM e RMN

A amostra foi analisada por EM utilizando como fonte de ionização APCI e apresentou m/z 603 em modo positivo, e m/z 601 em modo negativo. Massa comum de substâncias isoméricas encontradas em plantas da família Clusiaceae.

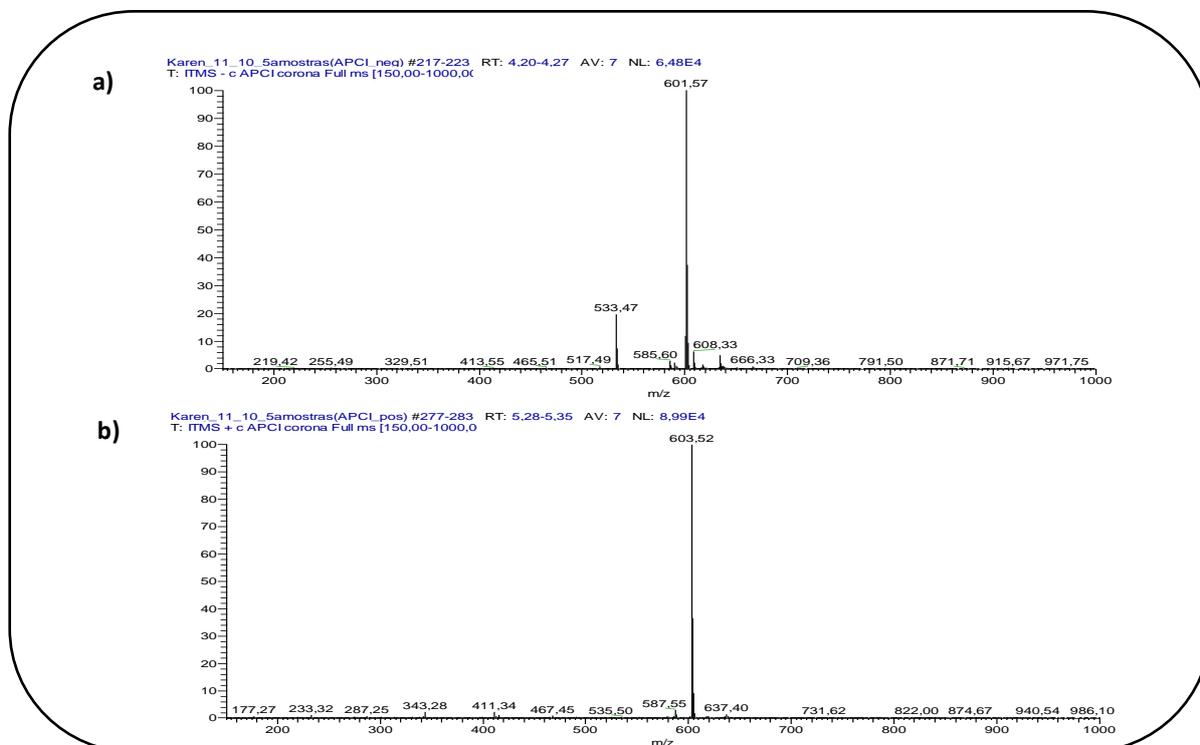


Figura 59- Espectro de massas da amostra 6a1 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).

Essa massa pode ser de um dos isômeros das benzofenonas preniladas muito comuns na família principalmente em plantas do gênero *Garcinia*. Para continuar as análises foi realizada também a fragmentação do pico em m/z 601.

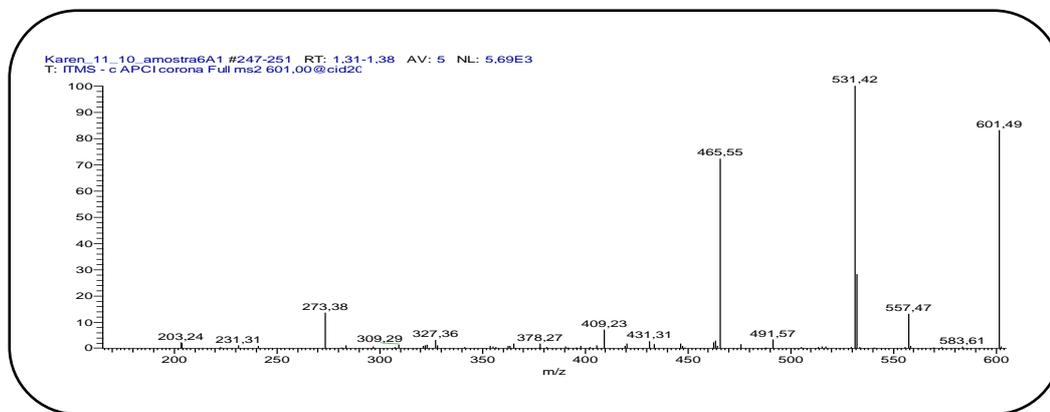


Figura 60 - Espectro de MS2 de m/z 601 da amostra 6a1 na fonte APCI modo negativo.

Essas são fragmentações comuns encontradas nesse tipo de substância, principalmente a perda de 136 unidades de massa, característico de uma unidade de floroglucinol.

Então a amostra foi submetida a análises de RMN para possível elucidação da substância isolada.

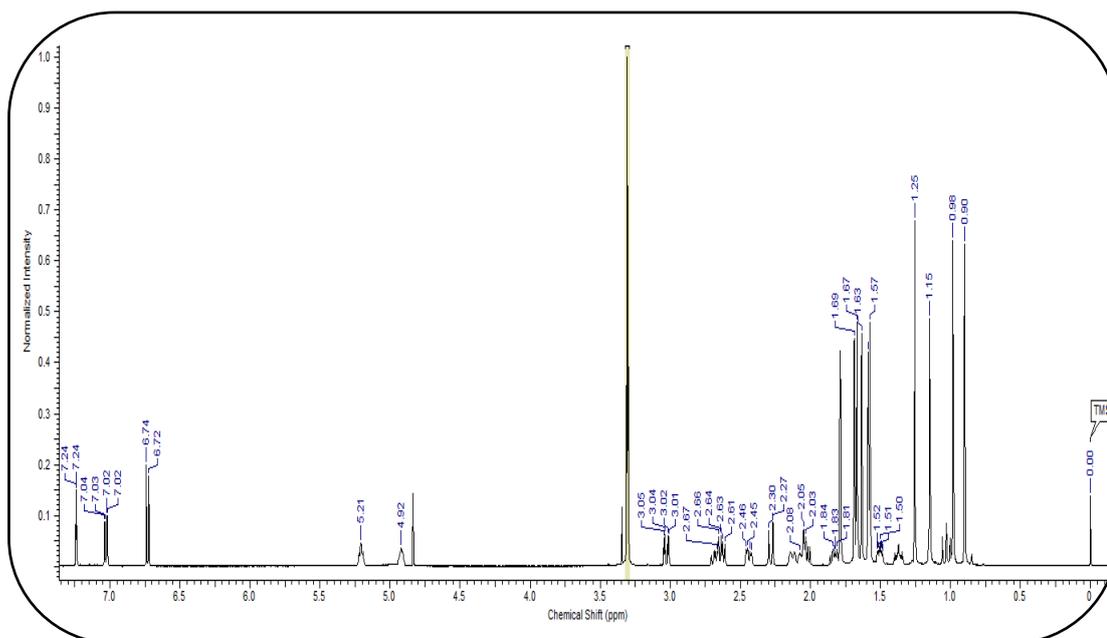


Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H da substância 6a1 solubilizada em CD_3OD a 500,13 MHz.

O espectro de RMN de ^1H foi analisado e pode-se notar a presença de três sinais com deslocamentos referentes à região de aromático: 6,73 ppm (d, 8), 7,03 ppm (dd, 8;2) e 7,24 (d, 2). Apresentou também dois sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 em cadeias abertas: 4,92 ppm (m) e 5,21 ppm (m), além de dez simpletos na região de metilas: 0,90 ppm, 0,98 ppm, 1,15 ppm, 1,25 ppm, 1,58 ppm, 1,59 ppm, 1,64 ppm, 1,67 ppm, 1,68 ppm e 1,69 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C complementa as informações obtidas no espectro de hidrogênio apresentando sinais com deslocamentos típicos de carbonos de um anel aromático: 116,3 ppm, 115,78 ppm e 124,3 ppm, além de sinais de carbonos no anel aromático ligados à hidroxila: 146,8 ppm e 152,7 ppm. Outros sinais importantes para a elucidação da molécula são os característicos a presença de três grupos carbonila com deslocamentos de 194 ppm, 196 ppm e 208 ppm.

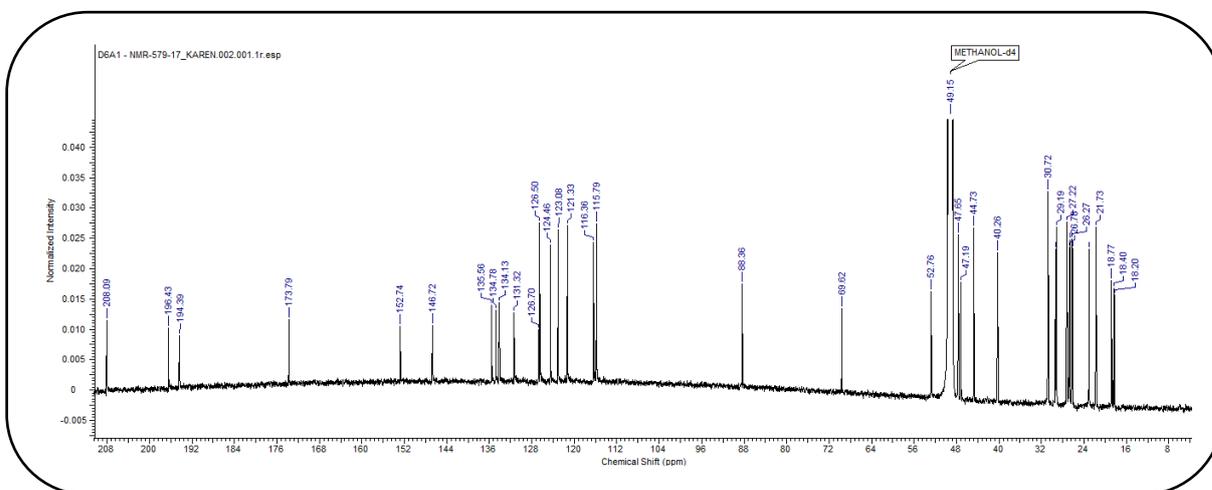


Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6a1 solubilizada em CD_3OD a 125,76 MHz.

Com a análise dos mapas de correlação de HSQC e HMBC foi possível concluir as informações e verificar a presença de mais uma benzofenona prenitada.

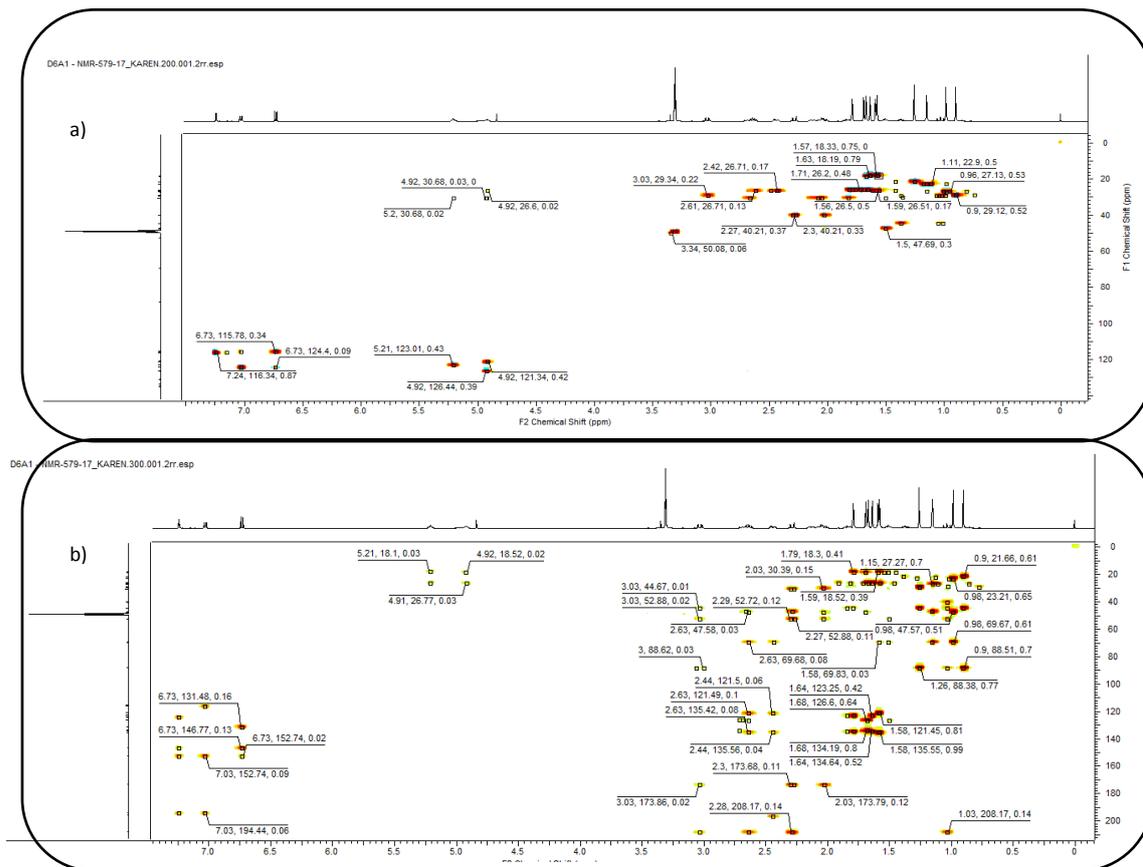


Figura 63 – Mapas de correlação de HSQC (a) e de HMBC (b) da substância 6a1 solubilizada em CD₃OD.

Os dados obtidos a partir da substância isolada foram analisados, comparados com dados existentes na literatura e listados na tabela 15, assim, foi possível identificar a substância conhecida comumente como 30-*epi*-cambogina (FULLER *et al.*, 1999).

Posição	30- <i>epi</i> -cambogina			30- <i>epi</i> -cambogina FULLER <i>et al.</i> , 1999	
	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm)	HMBC	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm)
1	---	173,6	H7	---	173,9
2	---		---	---	110,2
3	---	196,58	---		196,3
4	---	69,6	H6, H17, H21		69,6
5	---	47,1	---		46,7
6	1,50 (m)	47,6	H7, H22, H23	1,50 (m)	47,5
7	H = 2,03 (d, 14,7) H = 2,28 (d, 14,7)	40,21	---	2,02 (dd, 14.5, 7.4) 2,28 (d, 14)	40,0
8	---	52,8	H7, H29	---	52,6
9	---	208,1	H7, H29		208,0
10	---	194,4	H12, H16		194,3
11	---	131,74	H15		131,2
12	7,24 (d, 2)	116,3	H16	7,24 (d, 2)	116,3
13	---	146,85	H12, H15		146,8
14	---	152,7	H12, H15, H16		152,5
15	6,73 (d, 8)	115,78	---	6,73 (d, 8)	115,6
16	7,03 (dd, 8,3; 2)	124,3	---	7,02 (dd, 8.2)	124,4
17	H = 2,63 (dd, 13,8) H = 2,44 (dd, 13,4)	26,7	H18	2,43 (dd, 13.5, 5) 2,63 (13.8, 8)	26,5
18	4,92 (m)	121,3	H17, H21	4,91 (m)	121,1
19	---	135,55	H17, H21		135,3
20	1,59 (s)	26,59	H21	1,58 (s)	26,3
21	1,58 (s)	18,52	H20	1,57 (s)	18,2
22	1,15 (s)	22,9	H23	1,14 (s)	22,8
23	0,98 (s)	27,23	H22	0,98 (s)	27,0
24	H = 2,08 (m) H = 2,67 (m)	30,68	H7	2,12 (m) 2,67 (m)	30,5
25	4,92 (m)	126,9	H6	4,91 (m)	126,2
26	---	134,6	---		133,5
27	1,69 (s)	26,2	H28	1,68 (s)	26,1
28	1,67 (s)	18,7	H27	1,66 (s)	18,5
29	H = 1,03 (t, 13) H = 3,03 (dd, 14)	29,34	---	1,01 (dd, 14, 14) 3,02 (dd, 14, 3)	29,0
30	1,37 (m)	44,7	H29, H32, H33, H34	1,36 (m)	44,7
31	---	88,3	H29, H32, H33		88,1
32	0,90 (s)	29,12	H33	0,90 (s)	29,0
33	1,25 (s)	21,72	H32	1,25 (s)	21,3
34	H = 1,82 (m) H = 2,08 (m)	30,68	---	1,83 (m) 2,05 (m)	30,5
35	5,21 (m)	123,01	H34, H37	5,20 (m)	122,8
36	---	134,1	H34, H37, H38		134,6
37	1,67 (s)	26,2	H35, H38	1,78 (s)	26,1
38	1,64 (s)	18,2	H35	1,63 (s)	17,8

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) da 30-*epi*-cambogina (CD_3OD).

Essa substância também é bastante comum nas plantas da família Clusiaceae, porém, ainda não havia sido relatada a presença desta em *Platonia insignis*.

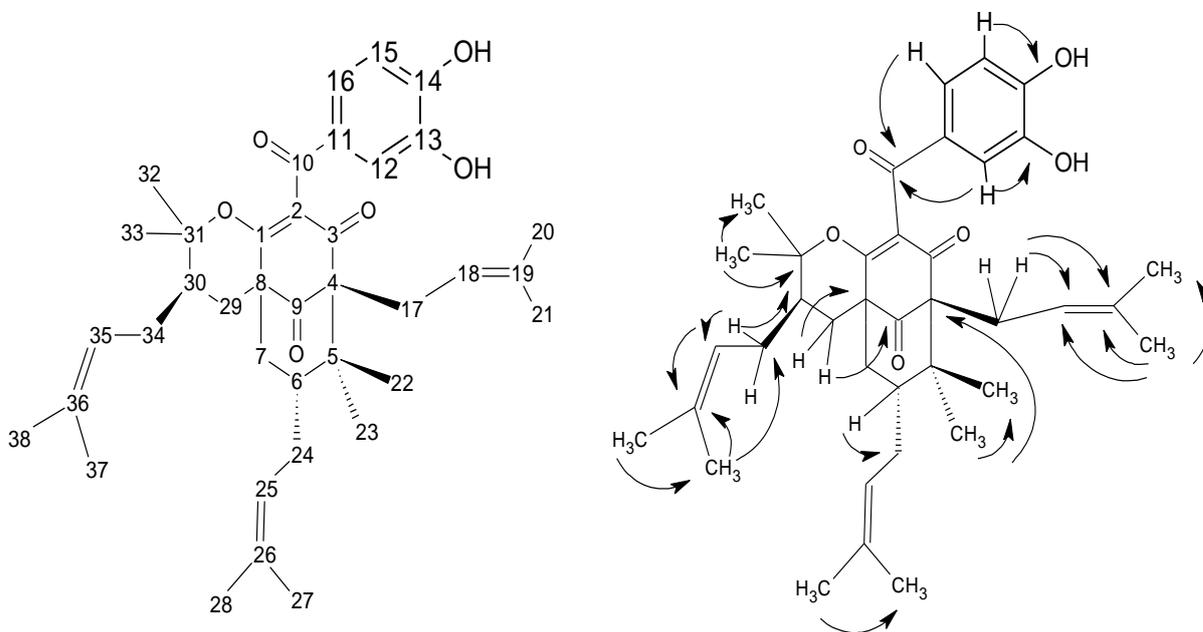


Figura 64 - Estrutura da 30-*epi*-cambogina, nome comum da substância, que recebe o seguinte nome oficial: 2*H*-4*a*,8-Metano-9*H*-cicloocta[*b*]piran-9,11-diona,10-(3,4-dihidroxibenzoil)-3,4,5,6,7,8-hexahidro-2,2,7,7-tetrametil-3,6,8-tris(3-metil-2-buten-1-il)-, (3*R*,4*aS*,6*R*,8*R*)-

Espectros de RMN ampliados referentes à substância 30-*epi*-cambogina:

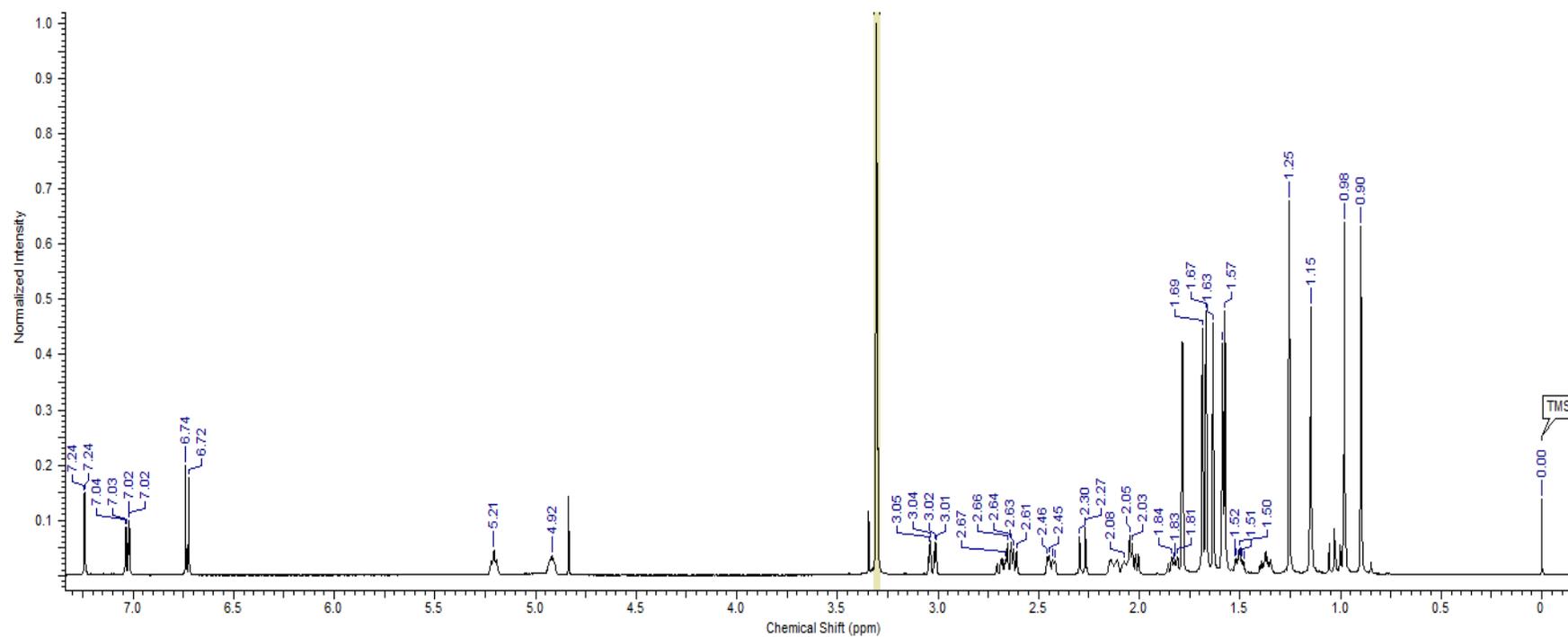


Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H da substância 6a1 solubilizada em CD_3OD a 500,13 MHz.

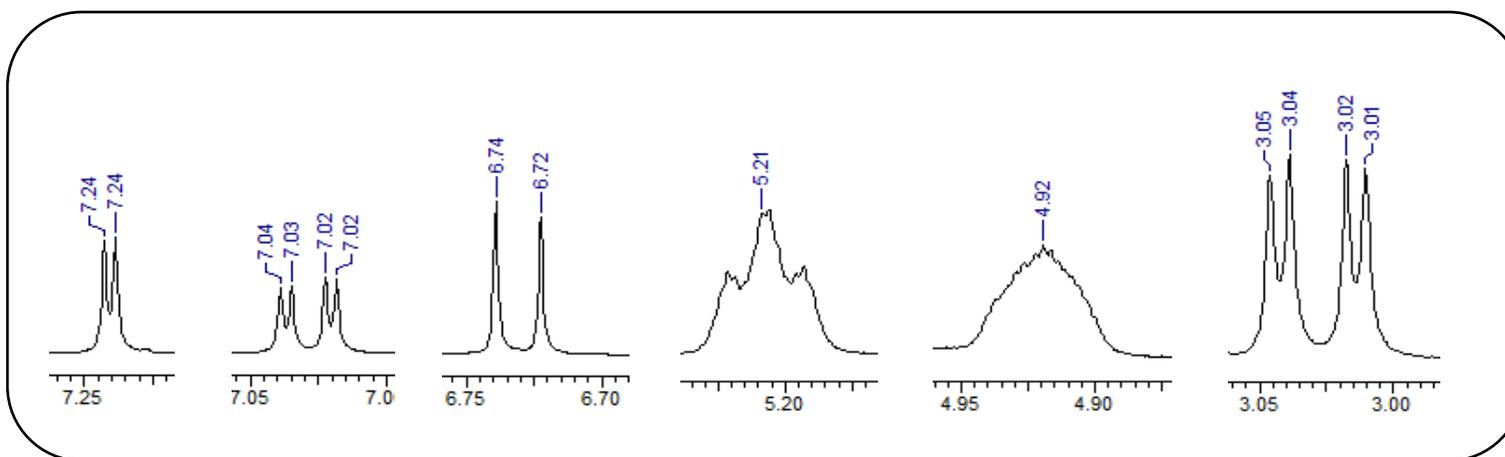


Figura 66 - Ampliação dos sinais de RMN de ^1H da substância 6a1 nas regiões de 7,25 a 3,00 ppm.

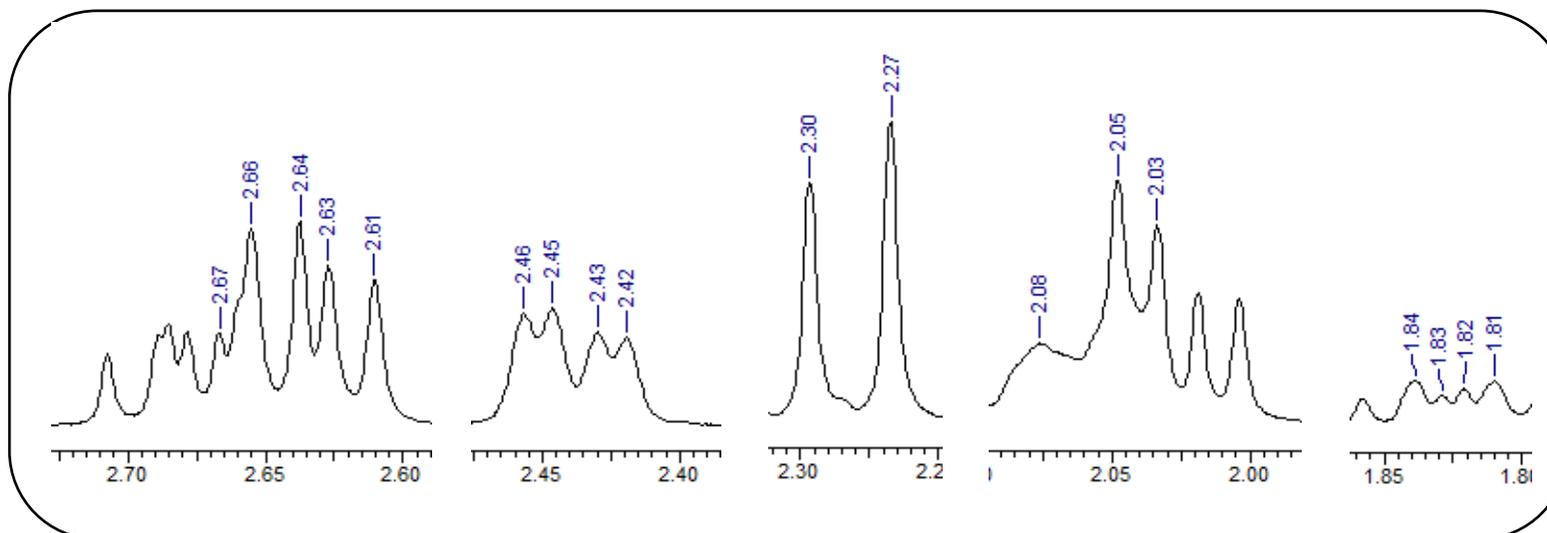


Figura 67 - Ampliação dos sinais de RMN de ^1H da substância 6a1 nas regiões de 2,70 a 1,80 ppm.

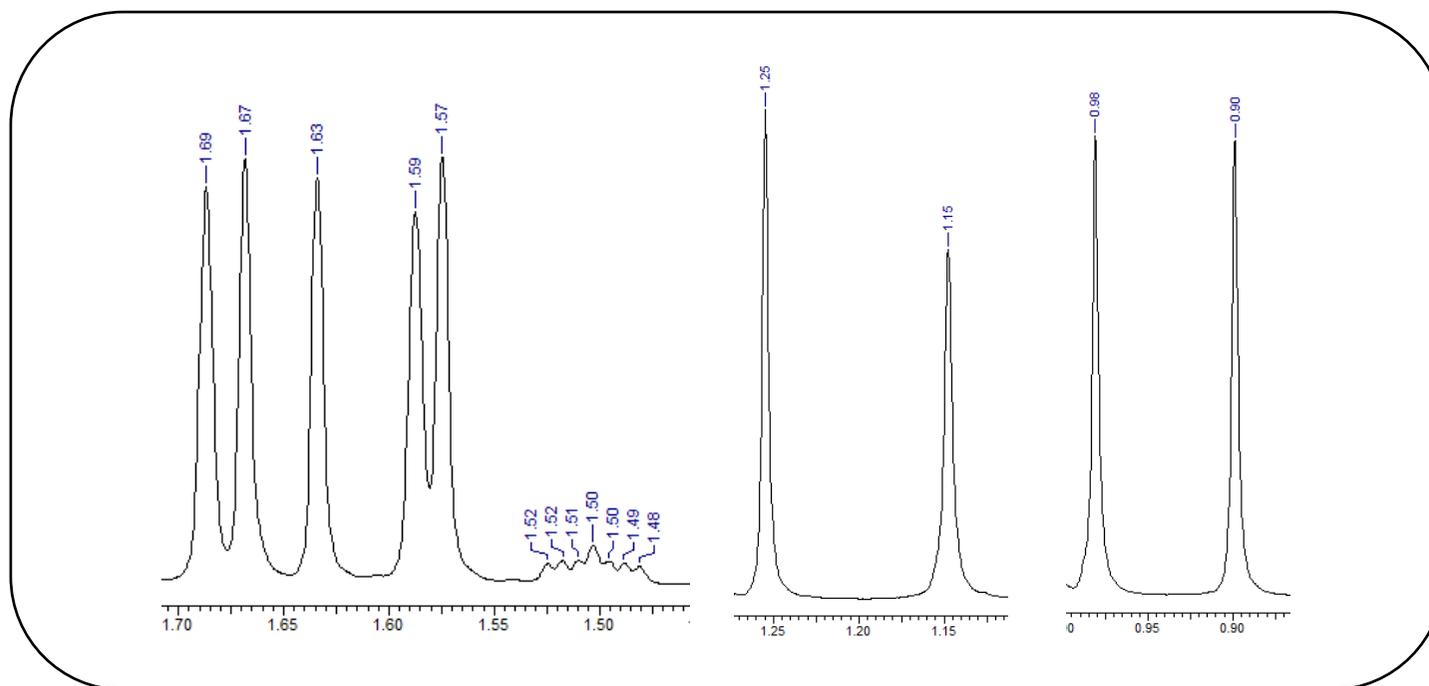


Figura 68 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹H da substância 6a1 nas regiões de 1,70 a 0,90 ppm.

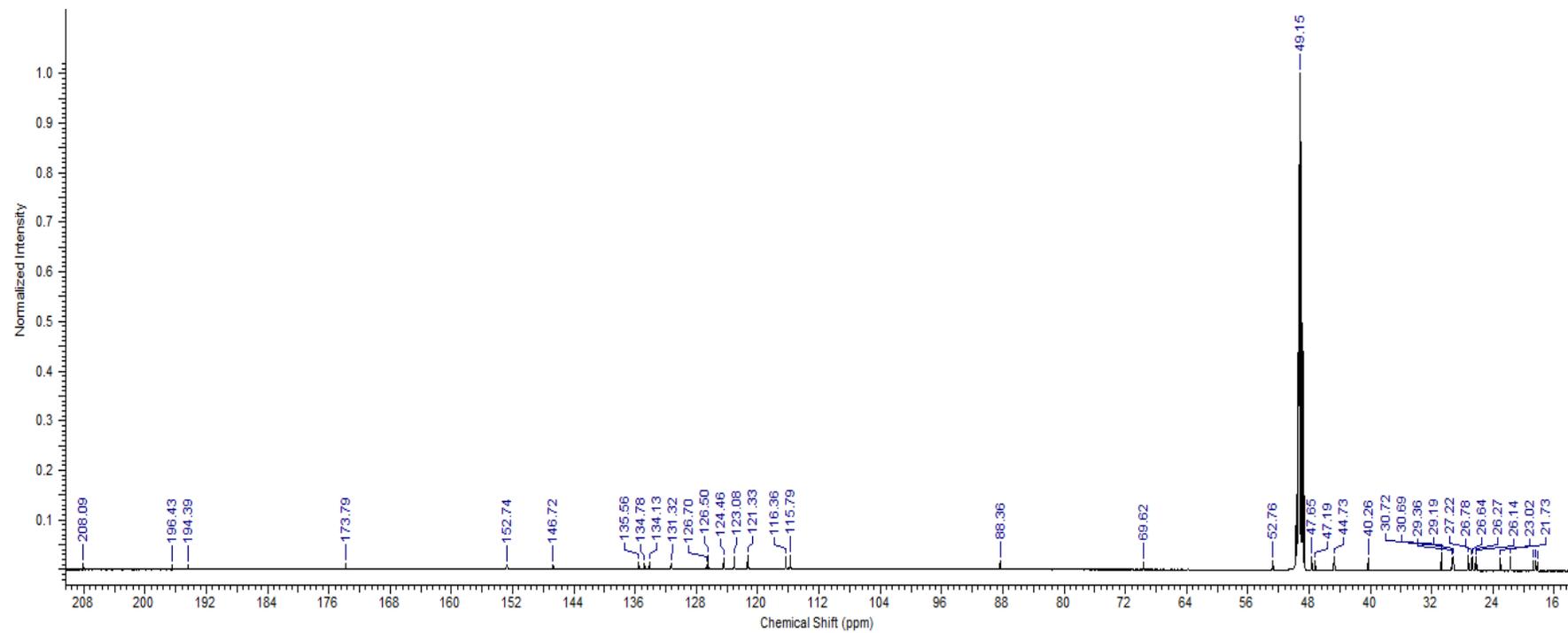


Figura 69 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6a1 solubilizada em CD_3OD a 125,76 MHz.

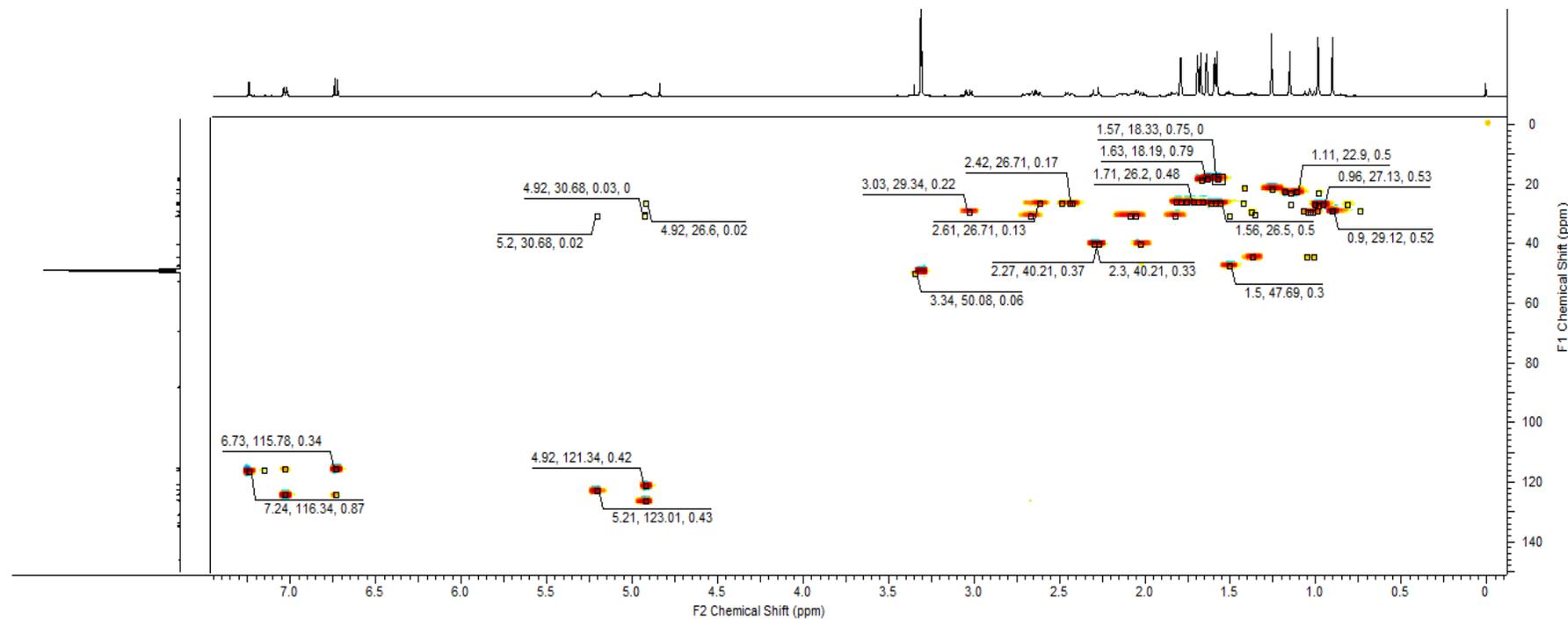


Figura 70 – Mapa de correlações de HSQC da substância 6a1 solubilizada em CD_3OD .

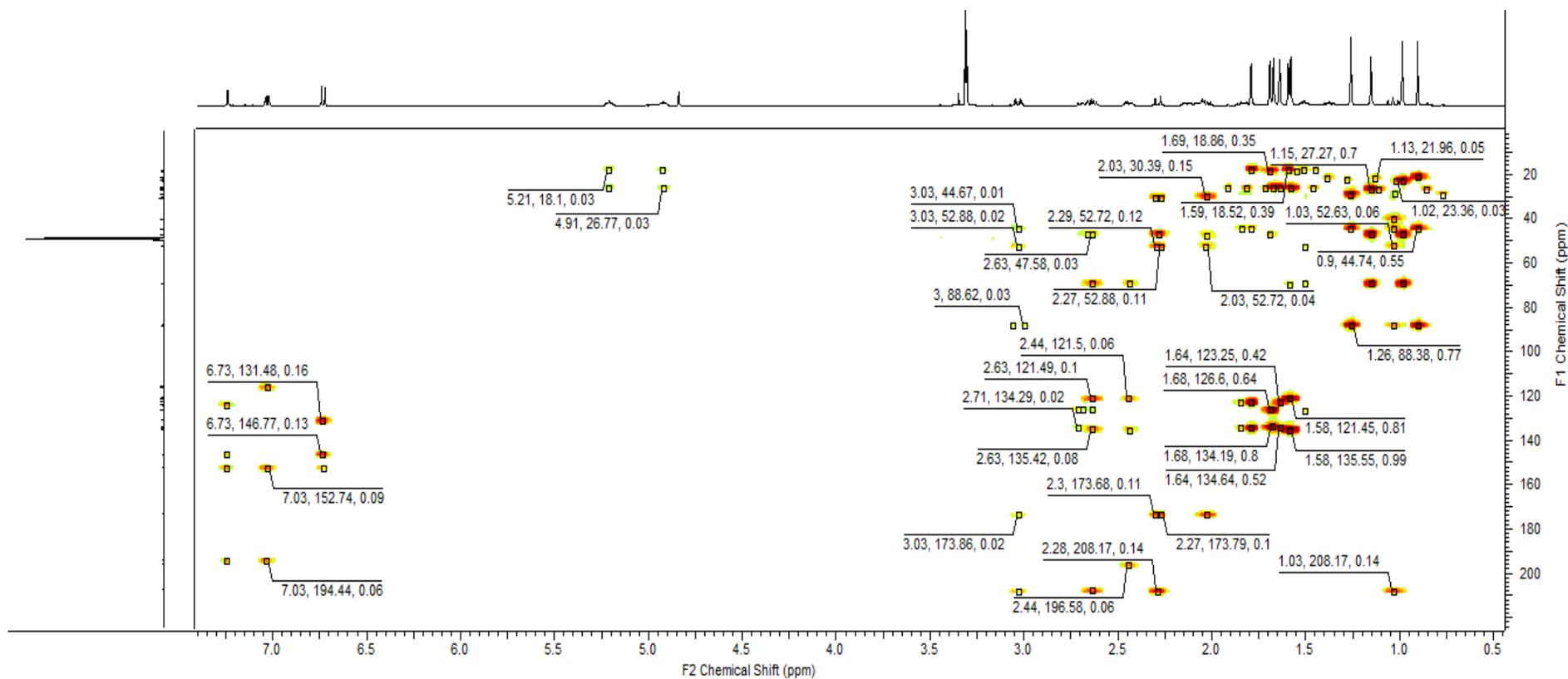


Figura 71 - Mapa de correlações de HMBC da substância 6a1 solubilizada em CD₃OD.

5.8 Isolamento da amostra 7a1

A amostra 7a1 apresentou-se na forma de um sólido amorfo amarelo, com massa igual a 35 mg, $R_f = 0,50$, quando eluída em Hex/DCM/AcOEt (2:1:7), de coloração alaranjada quando revelada em vanilina sulfúrica e em UV em 366 nm, uma mancha escura em UV 254 nm e coloração amarela em NP-PEG. Com base em informações obtidas na literatura essas são características de substâncias fenólicas.

5.8.1 Caracterização da substância 7a1 por EM

A amostra foi submetida a análises por espectrometria de massas onde foi obtido o seguinte espectro:

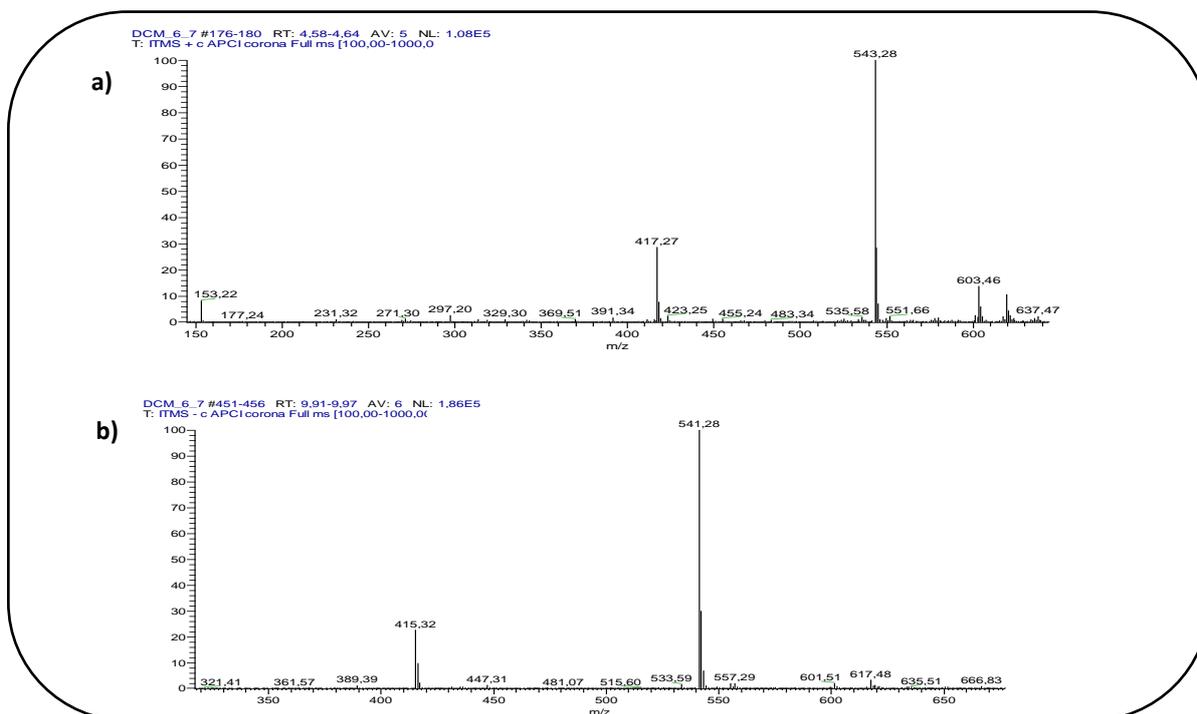


Figura 72 - Espectro de massas da amostra 7a1 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).

Pode-se observar que pico do íon molecular foi em m/z 543, no modo positivo e em m/z 541 no modo negativo. Então foi realizada a fragmentação do pico no modo negativo apenas, considerando que esta pode se tratar de uma substância fenólica.

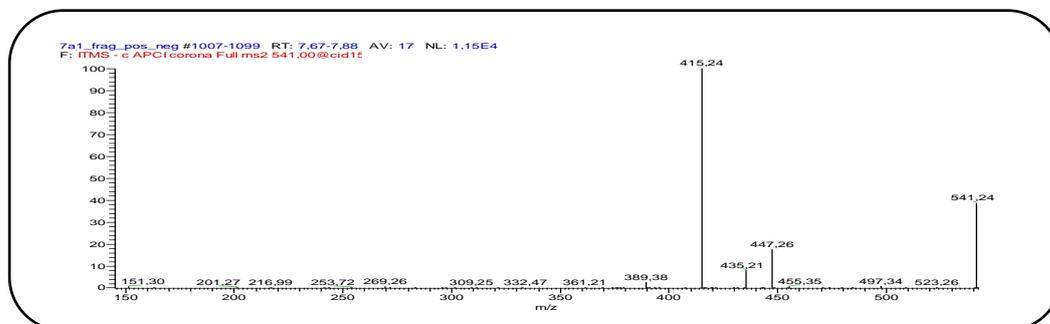


Figura 73 - Espectro de MS2 de m/z 541 da amostra 7a1 na fonte APCI modo negativo.

Ao serem analisadas as fragmentações observa-se que tanto o íon molecular em m/z 541 quanto em m/z 543 apresentam perda de 126 Da de massa que é referente à perda de floroglucinol como pode ser observado na proposta de fragmentação na figura 74.

A substância foi submetida a análises por RMN, porém, não foi possível finalizar a elucidação estrutural da molécula.

Contudo, observando as análises cromatográficas, os espectros de massas e o levantamento bibliográfico realizado em relação aos constituintes químicos do bacuri pode-se sugerir que esta substância seja um do biflavanoide morrelloflavona do tipo flavanona-(3→8'')-flavona que já foi isolado nos extratos de bacuri.

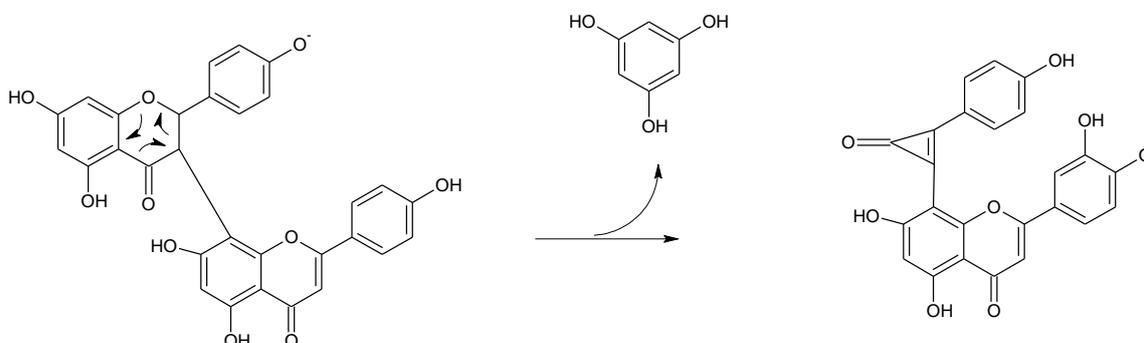


Figura 74 - Proposta de fragmentação para as morrelloflavonas. Fonte: Adaptado do trabalho de BURGOS (2010)

5.9 Isolamento da amostra 7c1

A amostra 7c1 é bastante parecida com a 7a1. Também se apresentou na forma de um sólido amorfo amarelo com $R_f = 0,45$ quando eluída em Hex:DCM:AcOEt (2:1:7), de coloração alaranjada quando revelada em vanilina sulfúrica e em UV 366 nm, uma mancha escura em UV 254 nm e coloração amarela em NP-PEG.

5.9.1 Identificação da substância 7c1 por EM e RMN

A amostra foi submetida a análises por espectrometria de massas e apresentou íon molecular em m/z 557 no modo positivo e, no modo negativo, em m/z 555, massas bem similares as da substância 7a1.

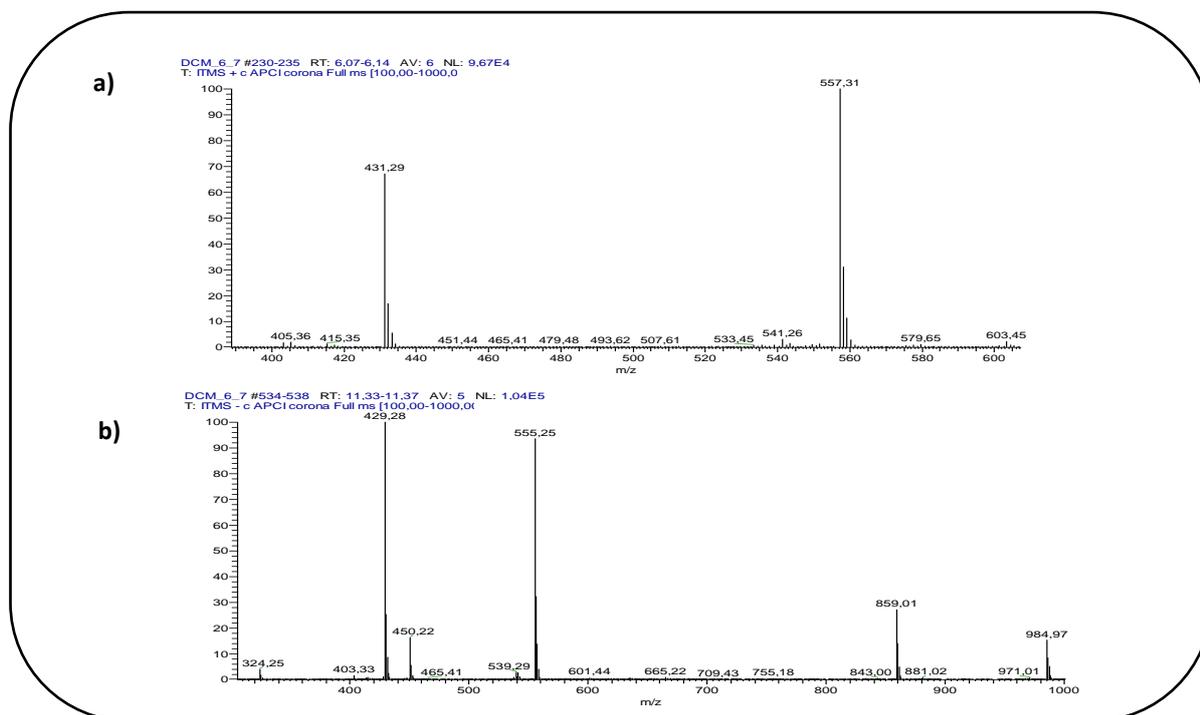


Figura 75 - Espectro de massas da amostra 7c1 na fonte APCI no modo positivo (a) e negativo (b).

A fragmentação também foi realizada apenas no modo negativo.

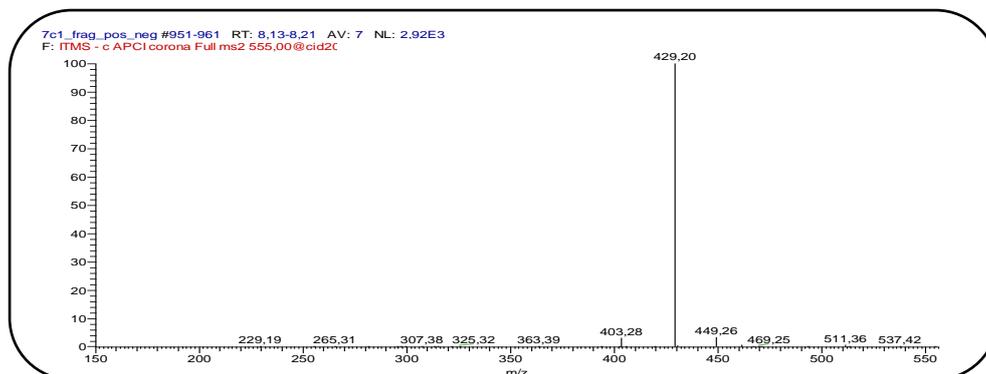


Figura 76 - Espectro de MS2 de m/z 555 da amostra 7c1 na fonte APCI modo negativo.

Pode-se observar também a perda do floroglucinol que é característica de biflavonoides, menos 126 Da, representado pelo pico m/z 429 de maior abundância.

Então a substância foi submetida a análises por RMN onde se pode obter o seguinte espectro de RMN de ^1H :

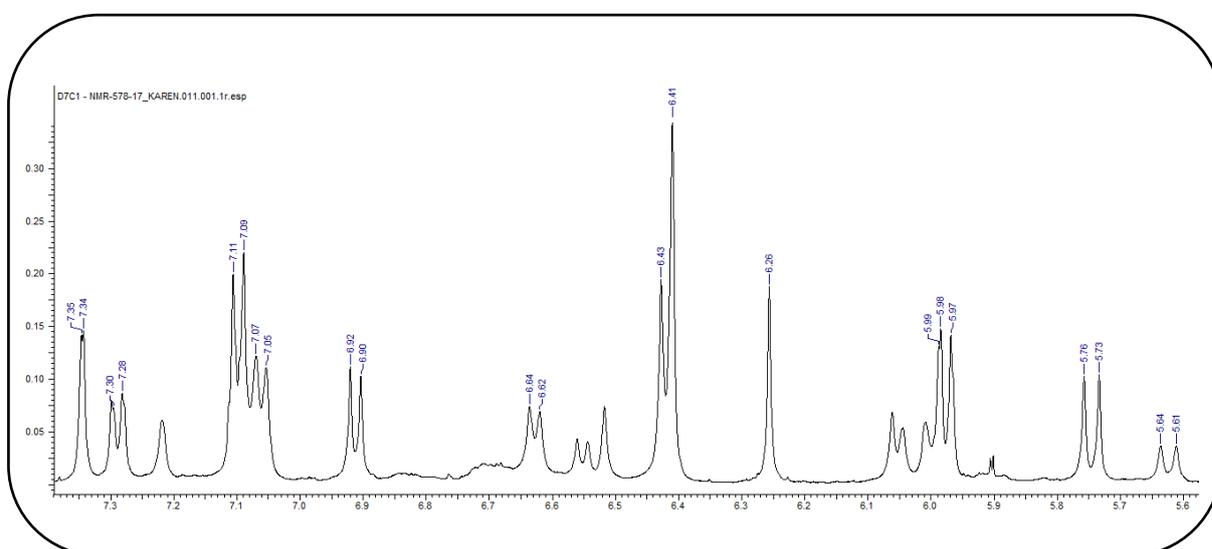


Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H da substância 7c1 solubilizada em CD_3OD a 500,13 MHz.

Nos espectros de RMN foi possível observar sinais de ^1H em δ 5,62 (d 12 Hz), 5,74 (d 12 Hz) que são característicos de uma flavanona, assim como, sinais de ^1H em δ 6,41 (s)

referentes à presença de uma flavona em relação as correlações com os átomos de RMN de ^{13}C .

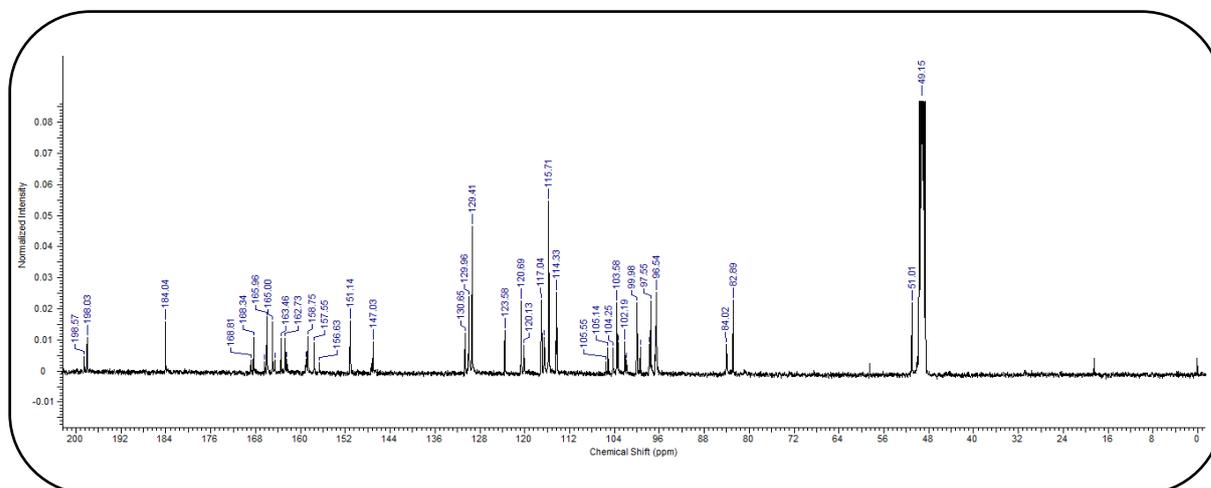


Figura 78 - Espectro de ^{13}C da substância 7c1 solubilizada em CD_3OD a 125,76 MHz.

Foi possível observar a presença de deslocamento de ^{13}C em δ 83,7 e 82,61 e ^{13}C em δ 103,3 característicos de flavanona e flavona, assim também como os carbonos carbonílicos com deslocamentos em δ 197,6 e 183. Analisando os espectros bidimensionais foi possível elucidar a substância.

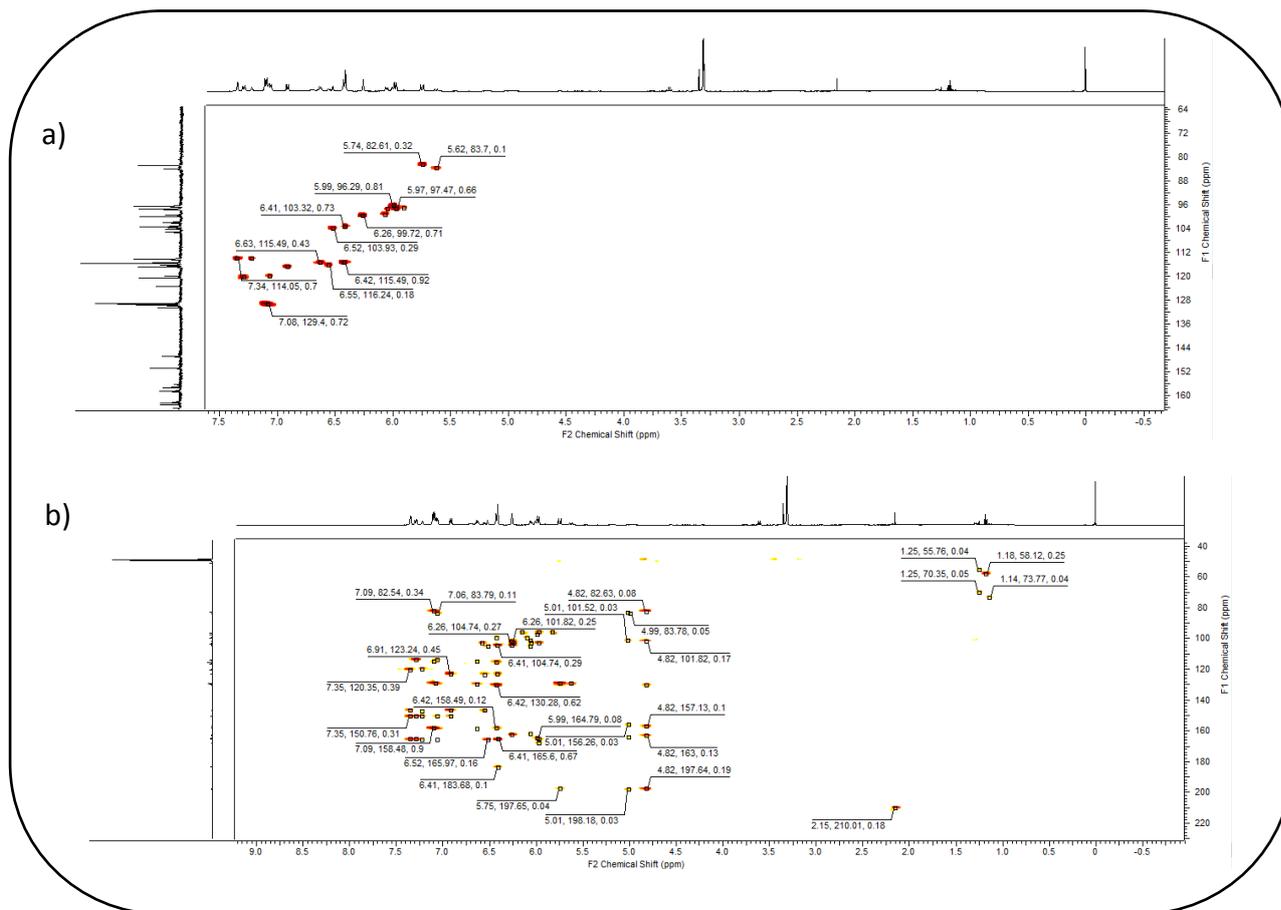


Figura 79 – Mapas de correlações de HSQC (a) e de HMBC (b) da substância 7c1 solubilizada em CD₃OD.

A amostra 7c1 apresentou-se como sendo um composto de fórmula molecular C₃₀H₂₀O₁₁ com massa molecular de 556, sendo identificado em comparação com dados da literatura como um biflavonoide do tipo flavanona-(3→8'')-flavona, conhecida como morelloflavona. Biflavonoides são muito comuns em plantas da família Cluseaceae (BURGOS, 2010).

A análise dos espectros de RMN foi realizada em comparação com dados da literatura com os quais se pode confirmar que se trata de um biflavonoide conhecido como morelloflavona, também chamado de fukugetin e, segundo a plataforma de pesquisa SciFinder, recebe o nome de [3,8'-Bi-4*H*-1-benzopiran]-4,4'-diona, 2'-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-

dihidro-5,5',7,7'-tetrahydroxi-2-(4-hidroxifenil)-, (2R,3S)- (ELFITA, *et al.*, 2009; GONTIJO *et al.*, 2012).

Posição	Morelloflavona – Fukugetin			Morelloflavona - Fukugetin ELFITA, <i>et al.</i> , 2009 (a) GONTIJO <i>et al.</i> , 2012 (b)	
	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm)	HMBC	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm)
2	5,62 d (12)	83,7	H2'	5,89 d (12,6)	82,0 (b)
3	5,74 d (12)	82,6	H6'	4,93 d (12,6)	49,9 (b)
4	---	197,6	H3	---	197,64 (a)
5	---	102	---	---	164,82 (b)
6	5,99 d (1,7)	96,3	H8	5,98 (sl)	96,51 (a)
7	---	164,8	H6	---	165,72 (a)
8	5,97 d (1,8)	97,5	H6	5,93 (sl)	97,70 (a)
9	---	165,4	H8	---	162,33 (b)
10	---	102	---	---	103,32 (a)
1'	---	129,5	H2';H3';H6'	---	130,39 (a)
2'	7,06 d (8,1)	119,9	---	7,10 d (8,1)	129,4 (a)
3'	6,63 d (8,1)	115,4	H5';H6'	6,35 d (8,1)	115,46 (a)
4'	---	158	H5';H6'	---	158,4 (a)
5'	6,42 d (8,6)	115,3	H3'	6,35 d (8,1)	115,46 (a)
6'	7,09 d (8,6)	129,4	H2	7,10 d (8,1)	129,40 (a)
2''	---	165,6	H2''';H3''';H6'''	---	166,1 (a)
3''	6,41 s	103,3	---	6,38 (s)	103,5 (a)
4''	---	183	H3''	---	183,9 (a)
5''	---	159,02	---	---	162,7 (a)
6''	6,26 s	99,2	---	6,62 (s)	99,5 (a)
7''	---	162,6	H6''	---	161,6 (a)
8''	---	103,8	---	---	104,1 (a)
9''	---	156,6	---	---	156,6 (a)
10''	---	104,7	H3'';H6''	---	106,4 (a)
1'''	---	123,2	H3''';H5'''	---	123,0 (a)
2'''	7,34 d (1,7)	114,0	H6'''	7,31 (sl)	114,3 (a)
3'''	---	147	H2''';H5'''	---	146,7 (a)
4'''	---	150	H2''';H5''';H6'''	---	151,1 (a)
5'''	6,91 d (8,6)	116,7	---	6,87 d (8,3)	116,8 (a)
6'''	7,29 d (8,6)	120,3	H2'''	7,26 d (8,3)	120,8 (a)

Tabela 16 - Dados de RMN de 1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância 7c1 - morelloflavona (CD_3OD).

Os sinais de carbonos quaternários nas posições 10, 5'' e 9'' não puderam ser observados pelas correlações do HMBC, porém, foram observados no espectro de RMN de ^{13}C e atribuídos conforme a faixa de deslocamento característico e por comparação com os dados da literatura.

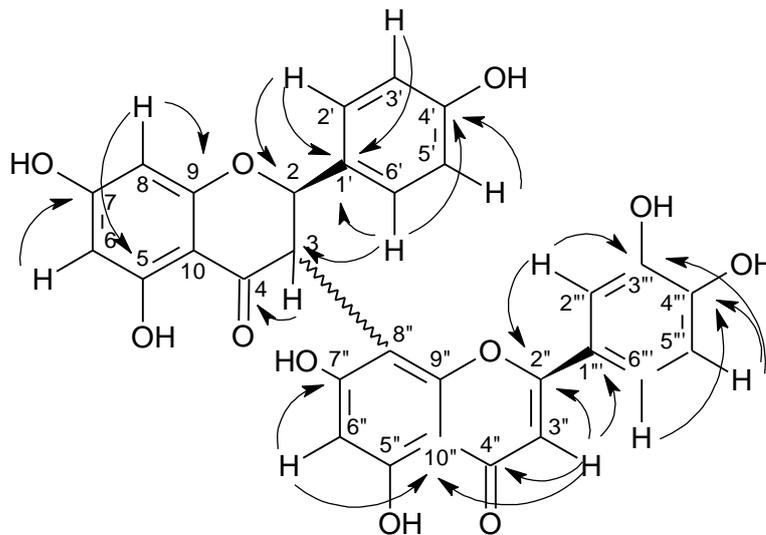


Figura 80 - Estrutura da morelloflavona ([3,8'-Bi-4*H*-1-benzopiran]-4,4'-diona, 2'-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dihidro-5,5',7,7'-tetrahidroxi-2-(4-hidroxifenil)-, (2*R*,3*S*)-)

Espectros de RMN ampliados referentes à morelloflavona.

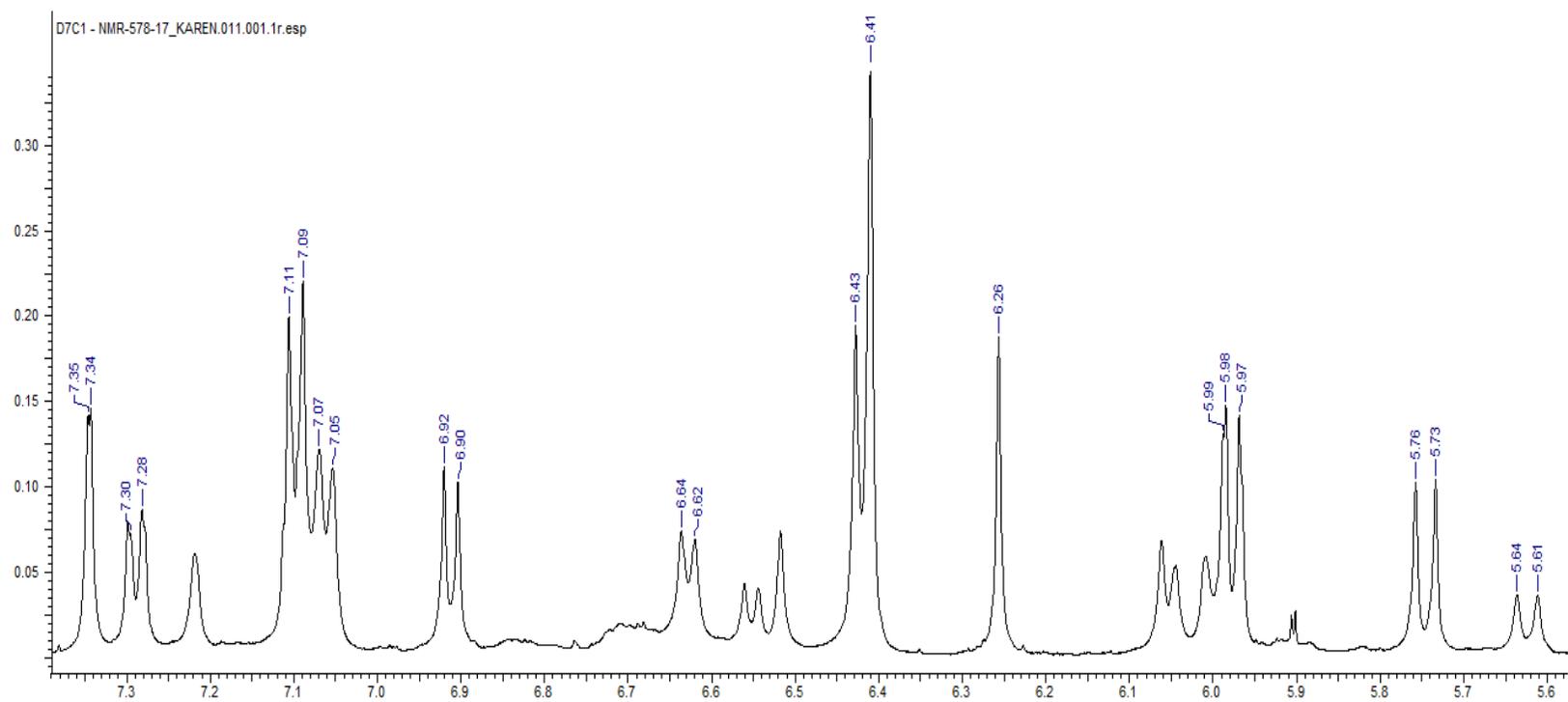


Figura 81 - Espectro de RMN de ^1H da substância 7c1 solubilizada em CD_3OD a 500,13 MHz.

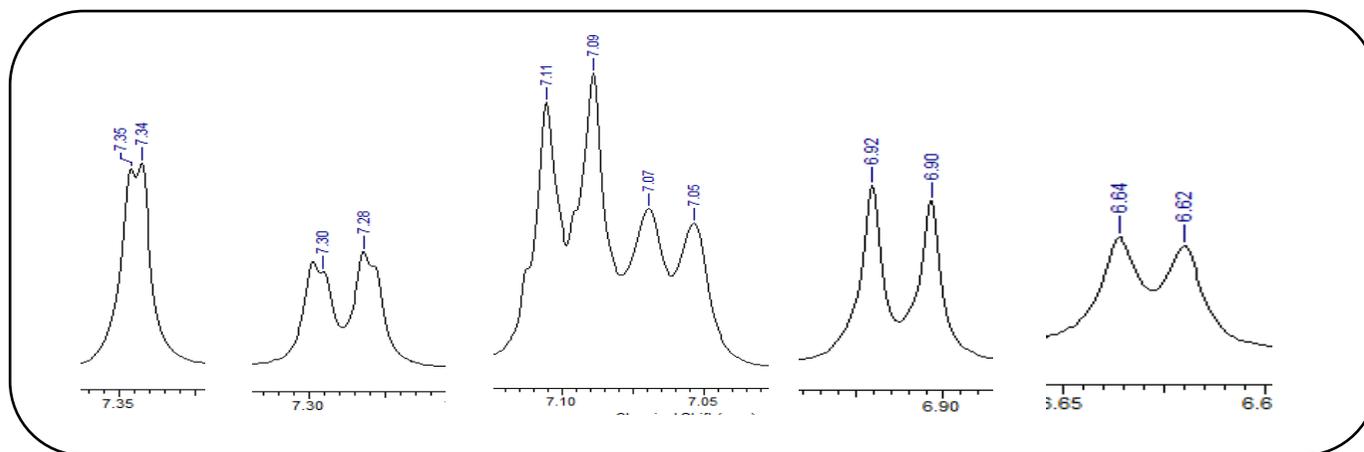


Figura 82 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹H da substância 7c1 nas regiões de 7,35 a 6,62 ppm.

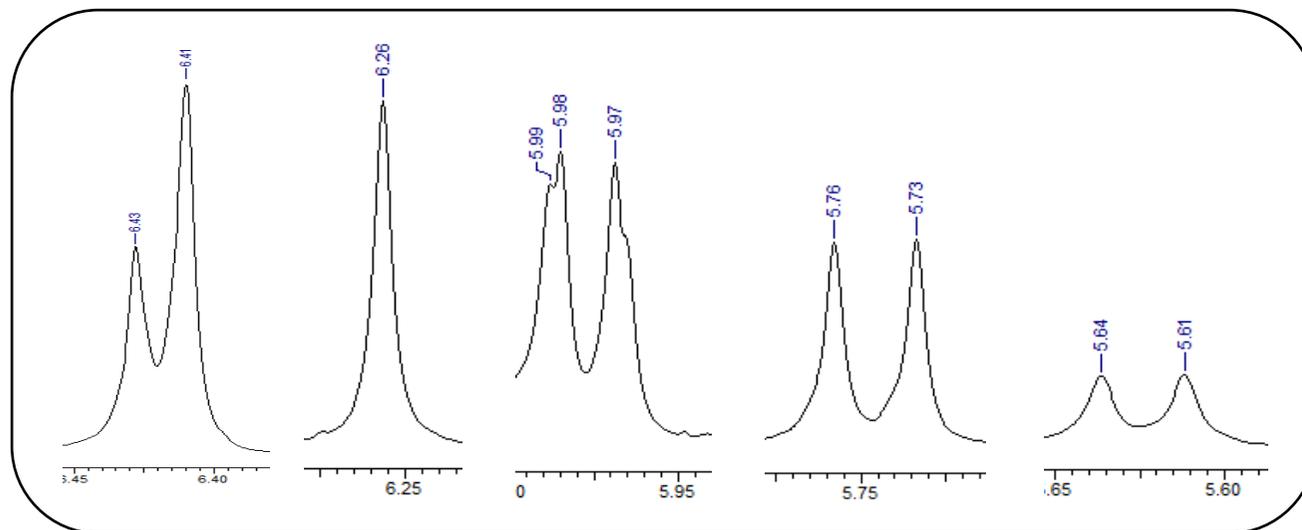


Figura 83 - Ampliação dos sinais de RMN de ¹H da substância 7c1 nas regiões de 6,43 a 5,61 ppm.

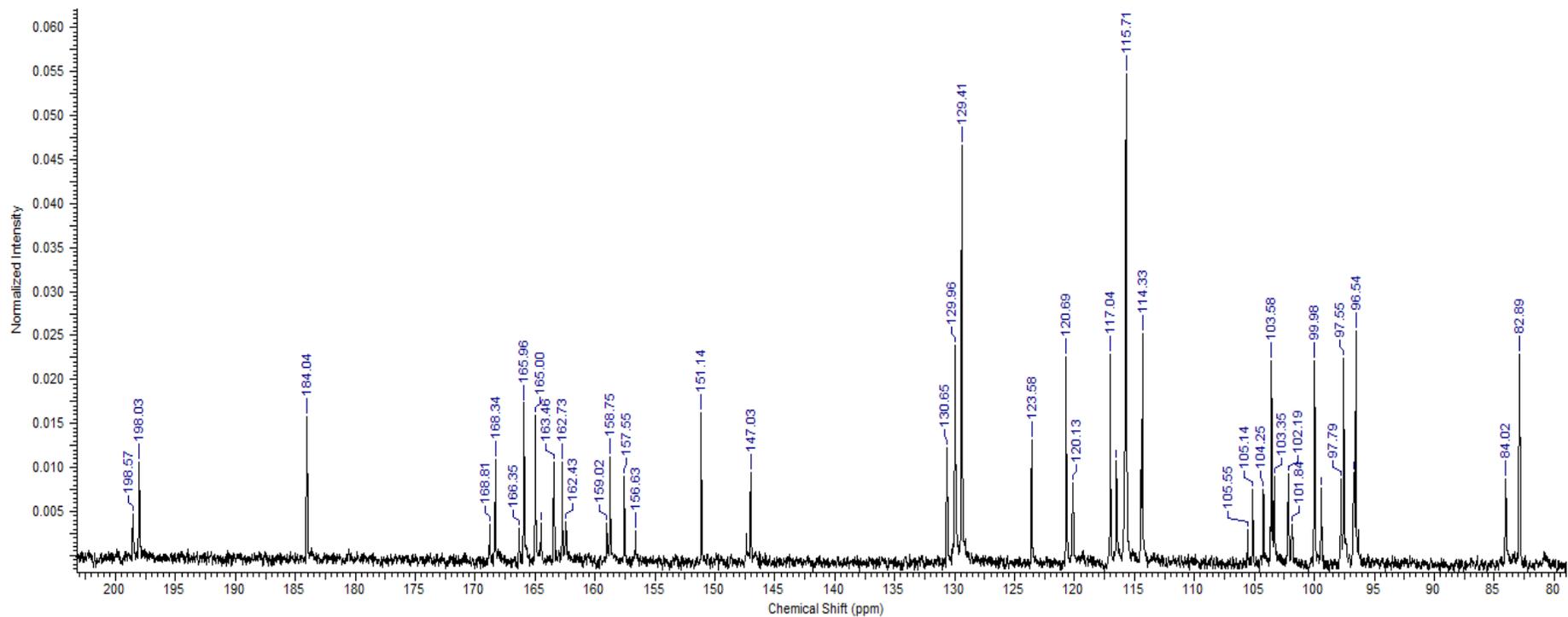


Figura 84 - Espectro de RMN de ¹³C da substância 7c1 solubilizada em CD₃OD a 125,76 MHz.

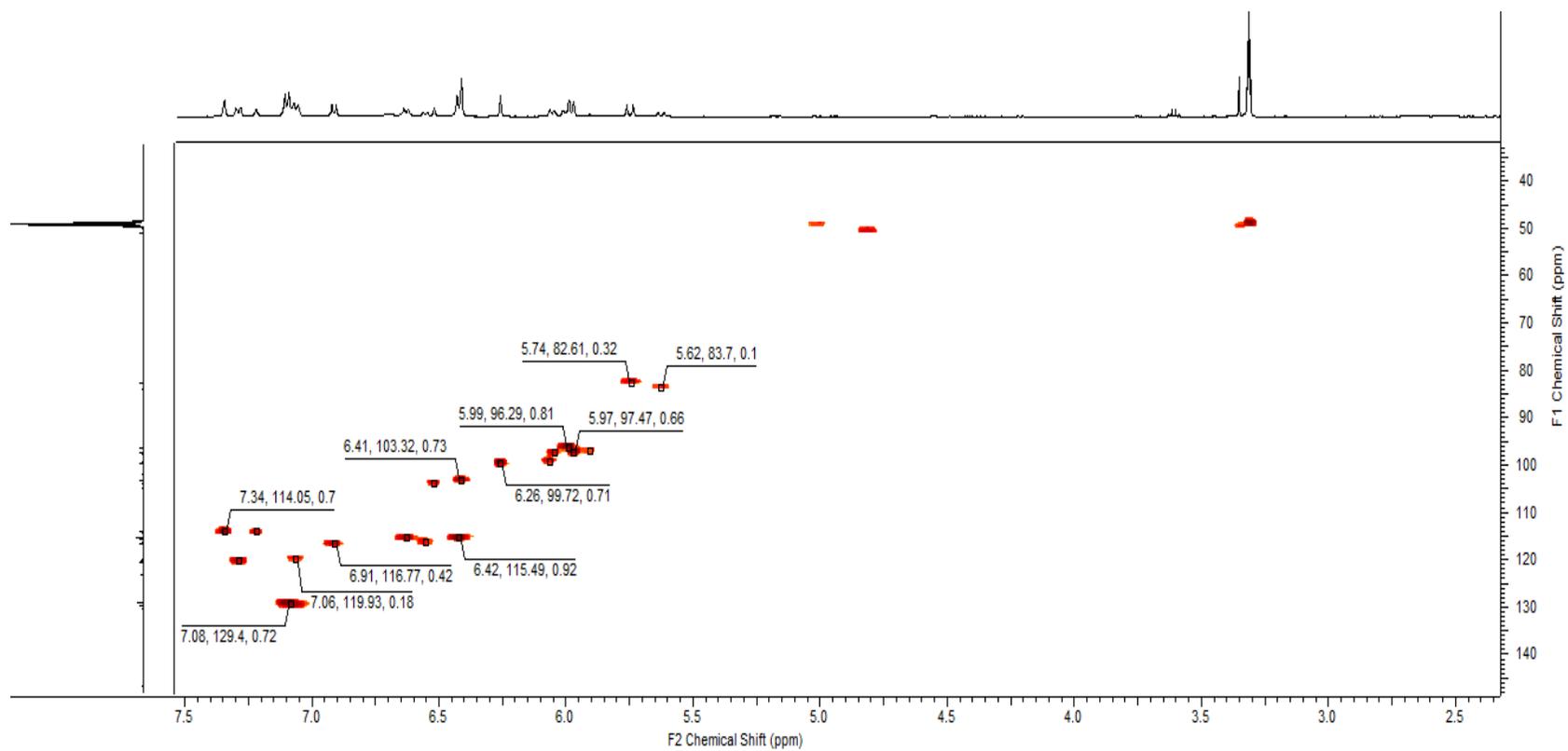


Figura 85 – Mapa de correlação de HSQC da substância 7c1 solubilizada em CD₃OD.

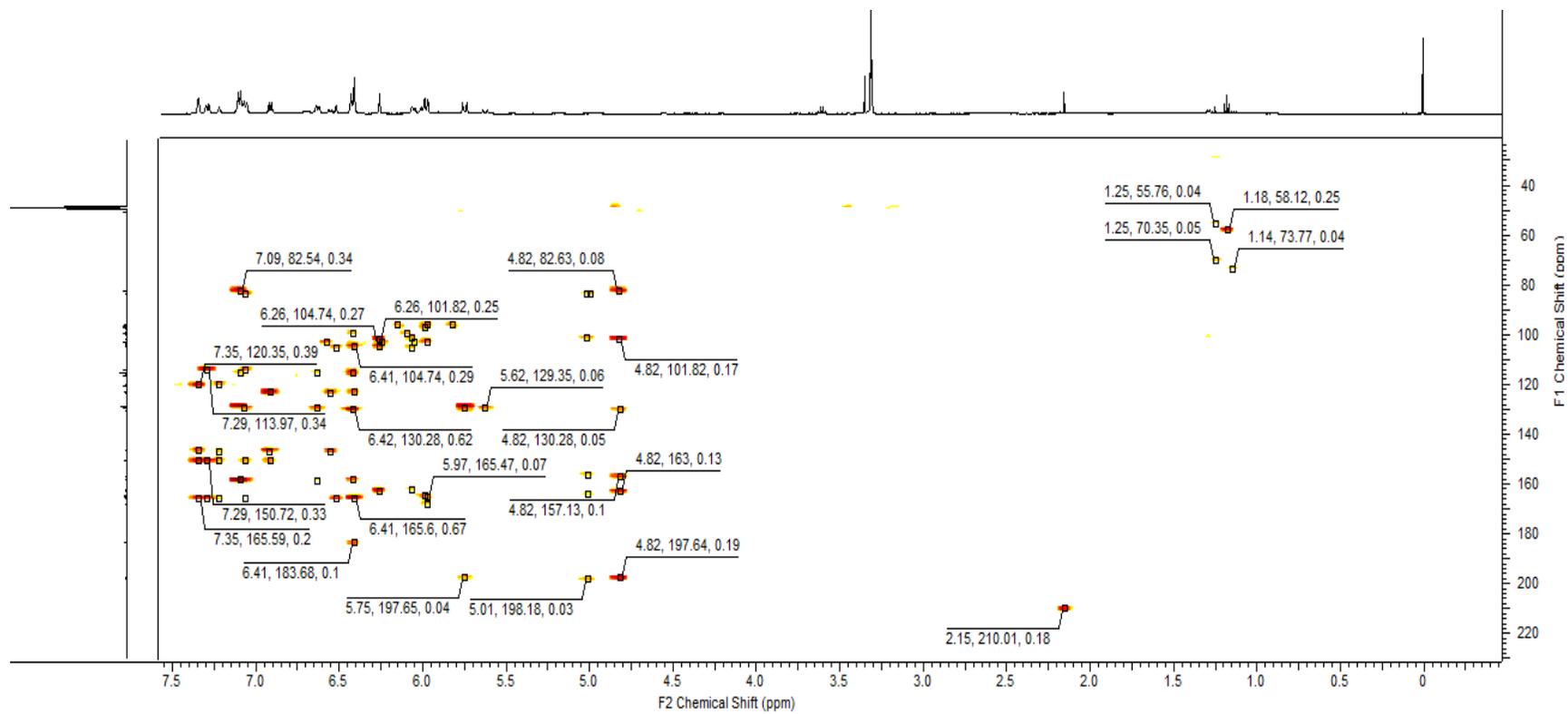


Figura 86 – Mapa de correlação de HMBC da substância 7c1 solubilizada em CD₃OD.

5.10 Avaliação da atividade antiplasmódica das substâncias isoladas

As substâncias isoladas e as purificadas foram submetidas à avaliação da atividade antimalárica utilizando a mesma metodologia citada anteriormente quando os extratos foram testados. O cálculo da concentração inibitória mínima destas substâncias foi tabelado para melhor visualização. Como citado anteriormente, substâncias com valor de CI_{50} abaixo de 10 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas como tendo boa atividade antimalárica, as que apresentam CI_{50} entre 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ são substâncias com atividade moderada e, as que apresentam CI_{50} acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentam baixo potencial antiplasmódico (AMARANTE, *et al.*, 2011).

Amostra	Atividade antiplasmódica CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HC24 – Garcinielliptona FC	38,19
7A1	2,75
7c1 – Fukugetin (Morelloflavona)	10,48
HE129	19,82

Tabela 17 - Valores de CI_{50} apresentados pelas substâncias isolados referentes à atividade antiplasmódica.

Podemos observar que as substâncias HC24, 7c1 e HE129 apresentam atividade antimalárica moderada tendo as substâncias 7c1 e HE129 valores muito próximos aos considerados valores de substâncias que apresentam boa atividade antiplasmódica. A substância 7a1 foi a que se destacou tendo apresentado valor de CI_{50} muito baixo em relação aos valores das outras substâncias analisadas sendo considerada como tendo boa atividade antimalárica, porém, esta substâncias não está isolada, como citado anteriormente, o que pode levar a ideia de que esse valor seja na verdade referente a mistura de substâncias presentes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou informações que confirmam e complementam as que já estão relatadas na literatura sobre os resíduos do fruto bacuri. Observou-se, pela análise dos rendimentos de extratos e frações, que os resíduos do bacuri possuem uma maior porcentagem de substâncias de baixa polaridade tendo as frações hexânicas representado cerca de 50% de rendimento. Ao avaliar o perfil cromatográfico por CCD e o isolamento das substâncias pode-se obter informações referentes às classes de substâncias majoritárias nos extratos estudados, confirmando assim, a presença majoritária de substâncias fenólicas no bacuri.

Pela análise de dados de espectros de massa e de RMN foi possível caracterizar e identificar algumas substâncias confirmando a presença de esteróis comuns e substâncias fenólicas das quais a família Clusiaceae é rica, como as benzofenonas preniladas e biflavonoides.

Na fração hexânica dos extratos de cascas foi possível confirmar a presença de Garcinielliptona FC, uma benzofenona prenilada já relatada na literatura como constituinte químico dos extratos de bacuri. Também foi possível verificar que na fração em diclorometano das sementes está presente mais um isômero dessa benzofenona, a 30-*epi*-cambigina, substância que ainda não havia sido relatada no fruto e, considerando que as benzofenonas são conhecidas na literatura como substâncias que apresentam diversas atividades biológicas, sugere-se que seria interessante dar continuidade aos estudos voltados para isolamento, identificação e quantificação de benzofenonas preniladas nos resíduos desse fruto.

Em relação as atividades biológicas testadas pôde-se verificar um destaque para os resultados da atividade antiplasmódica considerando que as substâncias isoladas e frações com substâncias purificadas apresentaram bons valores no cálculo da concentração inibitória mínima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, U.M.; JANCOVSKI, N.; EDWARD J. KENNELLY, E.J. Polyisoprenylated Benzophenones from Clusiaceae: Potential Drugs and Lead Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, New York, USA. Vol. 9, No. 16, 1560-1580, 2009.
- AGUIAR, L.P.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R.E.; MAIA, G.A.; SOUZA, V.A.B. Caracterização física e físico-química de frutos de diferentes genótipos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, V.28, No.2, p. 423-428, abr.-jun. 2008.
- ALVES, S.M.; JENNINGS, W.G. Volatiles composition of certain Amazonian fruits. *Food Chemistry*, Califórnia – Davis, Vol.4, pp.149-159, jun., 1979.
- ANGELO, P. M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revistas Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, Vol. 66, n.1, pp.1-9, 2007.
- AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. .; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazônica*, Vol. 41, n.3, p. 431-434, 2011.
- ARCANJO, D.D.R.; COSTA JÚNIOR, J.S.; MOURA, L.H.P.; FERRAZ, A.B.F.; ROSSATTO, R.R.; DAVID, J.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; OLIVEIRA, R.C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; OLIVEIRA, A.P. Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. *Natural Product Research*, Vol. 28, No. 12, 923–927, 2014.
- BASTOS, I.S. Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e composto obtidos de plantas da região amazônica. 2015. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) – Faculdade de Ciências Biológica, Universidade Federal do Pará, Manaus, AM.
- BENTES, M. H. S.; SERRUYA, H.; ROCHA FILHO, G. N.; GODOY, R. L. O.; CABRAL, J. A. S. Estudo químico das sementes de bacuri. *Acta Amazônica*, Vol. 16, p. 363-368, 1986.
- BORTOLOMEAZZI, R.; DE ZAN M.; PIZZALE, L.; CONTE, L. S. Mass Spectrometry Characterization of the 5 α -, 7 α -, and 7 β -Hydroxy Derivatives of β -Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol, and Brassicasterol. *Journal of Agriculture. Food Chemistry*. Vol. 47, No 8, p. 3069–3074, 1999.
- BOULANGER, R.; CHASSAGNE, D.; CROUZET. J.; Free and bound components of Amazonian fruits.1: Bacuri. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. 14, p. 303-311, 1999.
- BURGOS, R. C. R.; Detecção in silico, isolamento e caracterização estrutural dos constituintes micromoleculares antimaláricos e antioxidantes em galhos e folhas de *Garcinia gardneriana* (Clusiaceae). 2010. 150f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O.; PARTATA, A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. Revista Científica do ITPAC, Araguaína, Vol.4, n.3, Julho, 2011.

CALZAVARA, B.B.G.; Fruteiras: abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, biribazeiro, cupuaçuzeiro. IPEAN, Séries Culturas da Amazônia, Belém, p.63-68, 1970.

CANUTO, G.A.B., XAVIER, A.A.O., NEVES, L.C., BENASSI, M.T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, Vol. 32, n. 4, p. 1196-1205, dezembro 2010.

CARVALHO, J.E.U.; ALVES, S.M.; NASCIMENTO, W.M.O.; MÜLLER, C.H. Características físicas e químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* mart.) sem sementes. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, Vol. 24, n. 2, p. 573-575, agosto, 2002.

CARVALHO, J.E.U.; NAZARÉ, R.F.F.; NASCIMENTO, W.M.O. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* mart.) com rendimento industrial superior. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, Vol. 25, n. 2, p. 326-328, agosto, 2003.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validade. São Carlos, Ed. UFSCar, 2001, p.5, 27.

CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia. 6ª ed. Belém – Pa. (Coleção Adolpho Ducke), CNPq/ Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996. 279p.

CLERECI, M.T.P.S. & CARVALHO-SILVA, L.B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. Food Research International, Vol. 44, n. 7, p. 1658 -1670, agosto, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. E.; BONATO, P. S. Introdução à métodos cromatográficos. 7ª ed. Campinas – SP. Editora da UNICAMP, 1997.

COSTA JÚNIOR, J. S. ; ALMEIDA, A. A. C. ; TOMÉ, A. R. ; CITÓ, A. M. G. L. ; SAFFI, J. ; FREITAS, R. M. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. Epilepsy & Behavior, Vol. 22, p. 678-684, 2011a

COSTA JÚNIOR, J. S. ; FERRAZ, A. ; FEITOSA, C. M. ; CITÓ, A.M.G.L.; SAFFI, J. ; FREITAS, R. M. Evaluation of effects of dichloromethane fraction from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 21, n. 6, pp. 1104-1110, 2011c

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A.M.G.L.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FREITAS, R. M.; SPEROTO, A.R.M.; PERES, V.F.; MOURA, D.J.; SAFFI, J. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, Vol.112, p. 34-41, 2013.

COSTA JUNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; FILHO, B.A.B.; FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; FREITAS, R.M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidante effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 5, n.2, p.293-299, 2011b.

COSTA JUNIOR, J.S.; ALMEIDA, A.A.C.; FERRAZ, A.B.F.; ROSSATTO, R.R.; SILVA, T.G.; SILVA, P.B.N.; MILITÃO, G.C.G.; CITO, A.M.G.L.; SANTANA, L.C.L.R.; CARVALHO, F.A. A.; FREITAS, R.M. Citotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. Natural Product Research, Vol.27, n.4-5, p. 470-474, 2012.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. Química Nova na Escola, n.7, p.21-25, maio, 1998.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2ª ed. John Wiley & Sons LTD. ISBN 0471496405 (cased) – ISBN 0471496413 (pbk). 2002. Págs.: 7, 8.

ELFITA, E.; MUHARNI M.; LATIEF, M.; DARWATI, D.; WIDIYANTORO, A.; SUPRIYATNA, S.; BAHTI, H. H.; DACHRIYANUS, D.; COS, P.; MAES, L.; FOUBERT, K.; APERS, S.; PIETERS, L. Antiplasmodial and other constituents from four *Indonesian Garcinia* spp. Phytochemistry, Vol. 70, p. 907-912, 2009.

FAO - Food and agriculture organization of the united nations, Forestry paper 163. Global Forest Resources Assessment, Rome, 2010.

FERREIRA, R.O.; CARVALHO, M.G.; SILVA, T.M.S.; Ocorrência de biflavonoides em clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. Química Nova, Vol. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A.; Protetores solares. Química Nova, Vol. 30, n. 1, p.153-158, 2007.

FULLER, R. W.; BLUNT, J. W., BOSWELL, J. L., CARDELLINA II, J. H.; BOYD, M. R. Guttiferone F, the First Prenylated Benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. Journal of Natural Products, Vol. 62, n.1, p. 130-132, 1999.

GONTIJO, V. S.; SOUZA, T. C.; ROSA, I. A.; SOARES, M. G.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, M. H. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. Food Chemistry, 132, p. 1230-1235, 2012.

GUIMARÃES, A.D.G.; MOTA, M.G. da C.; NAZARÉ, R.F.R. de. Coleta de germoplasma de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) na Amazônia. I. Microrregião Campos do Marajó (Soure/Salvaterra). Belém: Embrapa-CPATU, 1992. 23p. (Boletim de Pesquisa, 132).

HARBOME, J.B. Phytochemical Methods - A guide to modern techniques of plant analysis. 3ª ed. Published by Chapman & Hall, an imprint of Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London SE18HN, UK,1998.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass spectrometry : principles and applications. – 3a ed. John Wiley & Sons Ltd., 2007.

HOMMA, A.K.O.; CARVALHO, J.E.U.; MENEZES, A.J.E.A MATOS, G.B. Manejo de rebrotamento de bacurizeiros nativos no Estado do Pará: recuperação de áreas degradadas com geração de renda e emprego. *Inclusão Social*, Brasília, DF, Vol. 6, n. 2, p.77-83, jan./jun, 2013.

HOMMA, A.K.O.; CARVALHO, J.E.U.; MENEZES, A.J.E.A. Fruta Amazônica em ascensão: Bacuri. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, Vol. 46, n. 271, p. 41, jun., 2010.

HUBER, K.; QUEIROZ, J.H.; MOREIRA, A.V.B.; RIBEIRO, S.M.R.; Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga ubá (*mangifera indica* l.): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Paraná – Brasil, Vol. 06, n. 01, p. 640-654, 2012.

KOBAYASHI, Y.; SAIKI, K.; WATANABE, F. Characteristics of Mass Fragmentation of Steroids by Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 16, n. 11, p. 1175 – 1178, nov., 1993.

LANÇAS, M.F. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, Vol. 1, n. 2, 2009.

LIMA, L. A. M. Avaliação química e biológica de extratos obtidos de espécies vegetais da flora Amazônica como novos agentes antimaláricos. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

LOPEZ, B. G. C.; “Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana”. 2014. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

LUSTOSA, A.K.M.F.; ARCANJO, D.D.R.; RIBEIRO, R.G.; RODRIGUES, K.A.F.; PASSOS, F.F.B.; PIAUILINO, C.A.; SILVA-FILHO, J.C.; ARAÚJO, B.Q.; LIMA-NETO, J.S.; COSTA-JÚNIOR, J.S.; CARVALHO, F.A.A.; CITÓ, A.M.G.L. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, p. 77–82, 2016.

MANSUR, J. S., BREDER, M. V. R., MANSUR, M. C. A., AZULAY, R. D. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Vol. 61, p. 167-172, 1986.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M.C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of immunological methods*, Vol. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NASCIMENTO, J.L.; COELHO, A.G.; BARROS, Y.S.O.; SILVA, O.A.; FREITAS, R.M.; ROCHA, M.S.; DAVID, J.M.; COSTA JÚNIOR, J.S.; ARCANJO, D.D.R.; OLIVEIRA, R.C.M.; CITÓ, A.M.G.L. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina. Boletim Informativo Geum, Vol. 5, n. 2, p. 44-53, abr./maio, 2014.

NASCIMENTO, W.M.O.; CARVALHO, J.E.U.; MÜLLER, C.H.; Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. Comunicação científica. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, Vol. 29, n. 3, p. 657-660, dezembro, 2007.

OMS - Organização Mundial da Saúde - Comunicado de Imprensa conjunto da OMS/FAO 32, 23 de Abril de 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. & VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. 4ª ed. São Paulo. Cengage Learning, 2015. p. 15, 101, 365, 400 e 401.

PAZ, M.; GULLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A.P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. Food Chemistry, Vol. 172, p. 462-468, 2015.

PEREIRA, C.V.L. Extratos bioativos de frutos amazônicos por química verde: extração por líquido pressurizado (Ple) e fluido supercrítico (Sfe). 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

PICCINELLI, A. L.; CAMPONE, L.; DAL PIAZ, F.; CUESTA-RUBIO, O.; RASTRELLI, Fragmentation Pathways of Polycyclic Polyisoprenylated Benzophenones and Degradation Profile of Nemorosone by Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry. Journal American Society for Mass Spectrometry. Vol. 20, p. 1688–1698, 2009.

POMPEU, D. R. Adsorção de três famílias de compostos fenólicos em resinas sintéticas macroporosas. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.

ROBERTS, J.C. Naturally occurring xanthenes. *Chem. Rev.* 61(6): 591- 605, 1961.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). European Food Research and Technology, Vol. 218, p. 380-384, 2004.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food Chemistry, Kidlington, Vol. 121, p. 996-1002, 2010.

SANTOS JÚNIOR, R.Q.; SOARES, L.C.; MAIA FILHO, A.L.M.; ARAÚJO, K.S.; SANTOS, I.M.S.P.; COSTA JÚNIOR, J.S.; SAFFI, J. Estudo histológico da cicatrização de

feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis*). ConScientia e Saúde, Vol, 9, n. 4, p. 575-581, 2010.

SANTOS, P.R.P.S.; CARVALHO R.B.F.; COSTA JÚNIOR, J.S.; FREITAS R.M. & FEITOSA, C.M. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. Uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 94, n. 2, p. 161-168, 2013.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. Food Chemistry, Vol. 101, n. 3, p. 1012–1018, 2007.

SILVA, A. P.; SILVA, M. P.; OLIVEIRA, C. G.; MONTEIRO, D. C.; PINTO, P. L.; MENDONÇA, R. Z.; COSTA JÚNIOR, J. S.; FREITAS, R. M.; MORAES, J. Garcinielliptone FC: Antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells. Toxicology in Vitro, Vol. 29, p. 681–687, 2015.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2ª ed. New York. John Wiley and Sons, 1979. p. 3-5; 351-360.

SOARES, A.G. Caracterização físico-química do resíduo agroindustrial dos frutos do bacurizeiro (*platonia insignis* Mart.) com objetivo de produção de insumos para indústria de alimentos e química. 2010. 104f. - Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional de compostos antioxidantes em resíduos de polpas tropicais. Ciências e agrotecnologia, Vol. 35, n.3, p.554-559, 2011.

SOUZA, A. C.; CARVALHO, F. A. A.; CARNEIRO, S. M. P.; CHAVES, M. H.; SOUSA, C. M. M. Avaliação de extratos e frações obtidas da casca do fruto de *Platonia insignis* Mart. (bacuri) sobre *Leishmania amazonenses*. 2010. Iniciação Científica (Graduando em Farmácia) - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Universidade Federal do Piauí, Piauí.

VIOLANTE, I.M.P.; SOUZA, I.M.; VENTURINI, C.L.; RAMALHO, A.F.S.; SANTOS, R.A.N.; FERRARI M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.1, p. 452-457, 2009.

WAGNER, H. & BLADT. S. Plant drugs analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas. 2ª ed. New York. Springer-Verlan Berlin Heidelberg, 2001.

YAHIA, E. M. The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. In: ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ AGUILAR A; G.A. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. Hoboken: Wiley-Blackwell, p. 3-51, 2010.

YAMAGUCHI, K. K. L.; SANTARÉM, L. S.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Avaliação in vitro da Atividade Fotoprotetora de resíduos de Frutas

Amazônicas. Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>, Scientia Amazonia, Vol. 5, n.1, p. 109-116, 2016.

YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, C.V.L.; LIMA, E.S.; VEIGA JUNIOR, V.F. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). Revista on-line <http://www.scientia.ufam.edu.br>, Scientia Amazonia, Vol. 3, n.2, p. 39-46, Mai-Ago 2014.

YAMAGUCHI, K.L.K. Caracterização de substâncias fenólicas de resíduos de frutos amazônicos e avaliação para o uso biotecnológico. 2015. 198f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.