



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

---

---

**ESTUDOS QUÍMICOS DE EXTRATOS BIOATIVOS DE  
PIQUIÁ (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.)**

---

---

KAREN MEDEIROS MACIEL

MANAUS

2018



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

KAREN MEDEIROS MACIEL

**ESTUDOS QUÍMICOS DE EXTRATOS BIOATIVOS DE PIQUIÁ**  
**(*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química Orgânica, na linha de Pesquisa Produtos Naturais e Biomoléculas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior  
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).

M152e Maciel, Karen Medeiros  
Estudos químicos de extratos bioativos de piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.) / Karen Medeiros Maciel. 2018  
137 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior  
Coorientador: Anderson Cavalcante Guimarães  
Dissertação (Mestrado em Química - Orgânica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Caryocar villosum* (piquiá). 2. atividade antibacteriana. 3. atividade antiplasmódica. 4. citotoxicidade. 5. ácidos fenólicos. I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

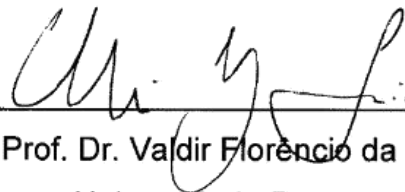
**"Estudos químicos de extratos  
bioativos de piquiá (*Caryocar  
villosum* (Aubl.)Pers)"**

**Karen Medeiros Maciel**

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.

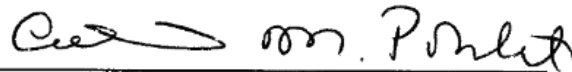
Aprovado, em 24 de abril de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



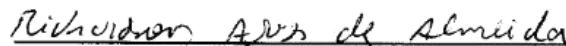
---

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



---

Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit  
Membro INPA



---

Prof. Dr. Richardson Alves Almeida  
Membro Externo

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

*Dedico à minha família:  
meus pais Ulisses Martins e Cecília Regina, minha  
irmã Káiny Maciel e ao meu filho Kauã Maciel  
pelo amor, apoio e incentivo durante toda a  
realização desta dissertação.*

## AGRADECIMENTOS

---

---

Primeiramente à Deus, pela eterna companhia em toda a minha caminhada, por me reerguer quando estava desanimada e ser meu alicerce de fé, força e encorajamento nas situações mais desafiadoras e, principalmente, gratidão pelas oportunidades, pelos momentos bons e amizades conquistadas.

Em especial, aos meus pais Ulissis Martins e Cecília Regina pelo amor, carinho, apoio, compreensão, incentivo moral e financeiro e, principalmente, pela ajuda inestimável com a criação e educação do Kauã. Esta conquista é nossa, pois sem vocês não seria possível chegar até aqui e serei eternamente grata. À minha irmã Kaíny, por sempre estar ao meu lado apoiando ou colaborando de alguma maneira e a toda família Medeiros e Maciel.

Ao meu filho Kauã Maciel Batista, meu melhor motivo. É um amor que só a maternidade é capaz de despertar e apenas o seu sorriso alegre muda o astral. Obrigada por todos os momentos divertidos e descontraídos quando estava fisicamente e mentalmente cansada, e ainda pela compreensão nos momentos que não pude estar presente.

Ao Prof. Dr. Valdir Veiga pelas orientações, incentivos e todo o suporte necessário para realização deste projeto. Obrigada pelos conhecimentos e aprendizados transmitidos durante esses anos, foram muito importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. É admirável seu amor pela ciência.

Ao Prof. Dr. Anderson Guimarães pela co-orientação, pelas conversas científicas e por todas as contribuições para aprimoramento do projeto.

Ao grupo de pesquisa Q-BiomA pela acolhida carinhosa, que sem dúvida se tornou uma segunda família durante esses dois anos, onde compartilhamos experiências e convivemos a maior parte do tempo no laboratório com aprendizado mútuo e descontração.

Às minhas amigas Karen Alves e Renata Duarte pelo companheirismo, amizade, pelas experiências laboratoriais e conhecimentos científicos, pelos conselhos pessoais, pelas palavras amigas sempre uma encorajando a outra para seguir em frente e superar os desafios. Enfim, por todos os momentos difíceis e bons compartilhados.

Aos colegas de turma de disciplinas de Pós-graduação e às amigas desde a graduação Bruna Ribeiro, Airi Santos e Paula Suellen pelas contribuições, ajuda nos procedimentos laboratoriais e incentivos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFAM e INPA pelos conhecimentos adquiridos durante as disciplinas.

Ao Prof. Dr. Felipe Moura pela colaboração nas análises de HPLC. E ao Msc. Magno pela grande ajuda nas análises de LC/MS realizadas no LTQPN/INPA.

À Central Analítica pelo espaço e realização das análises espectrométricas e espectroscópicas.

À FIOCRUZ pela realização dos ensaios de atividades biológicas.

À UFAM pela oportunidade de desenvolvimento profissional.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro durante o período de mestrado.

À todos que contribuíram indireta ou diretamente para construção deste projeto e minha formação profissional.

## RESUMO

---

Os resíduos de frutos amazônicos são fontes promissoras de constituintes químicos e metabólitos que são responsáveis por diversas atividades biológicas. Muitas dessas substâncias são capazes de inibir o crescimento de microorganismos causadores de doenças infecciosas. Dentre esses frutíferos, o piquiá (*Caryocar villosum*) é um fruto nativo da Floresta amazônica, uma espécie pertencente à família *Caryocaraceae*, bastante apreciado por sua polpa carnosa e ótima qualidade de sua madeira. Estudos recentes descrevem substâncias bioativas em extratos etanólicos e hidroalcoólicos de cascas e sementes que possuem atividades antioxidantes, enzimáticas e capacidade fotoprotetora. O presente trabalho estudou a composição química dos extratos bioativos de cascas e sementes de piquiá. Após limpeza, secagem e trituração, as cascas e sementes pulverizadas foram extraídas por maceração e Soxhlet com etanol e, comparativamente, com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol). Os extratos etanólicos foram submetidos à partição líquido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Todos os extratos e frações foram submetidos a testes na Fiocruz para avaliação da atividade antibacteriana pela técnica de difusão em ágar contra bactérias Gram positivas e negativas e para avaliação antiplasmódica por citometria de fluxo. Em testes de atividade biológica, a fração FASP mostrou-se moderadamente ativa frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (12 mm), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (12 mm) e *Shigella flexneri* (15 mm), enquanto que as amostras FHCP, EMCP, EMSP e EACP apresentaram baixa atividade frente à bactéria *Shigella flexneri* com halos de inibição 11 mm, 11 mm, 10 mm e 9 mm, respectivamente. Na avaliação antiplasmódica apenas o extrato EACP apresentou inibição significativa do parasita *Plasmodium falciparum*, com porcentagem de inibição parasitária acima de 60% em todas as concentrações testadas. O estudo fitoquímico das amostras bioativas foi realizado por técnicas cromatográficas e a identificação das substâncias foi realizada por técnicas espectrométricas e espectroscópicas. Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD) das amostras, observou-se bandas com coloração característica de compostos fenólicos, flavonoides, saponinas e terpenos. A amostra FHCP foi analisada por CCD e fracionada por cromatografia em coluna *flash*, uma das frações foi identificada como mistura dos fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol pelas análises espectrométricas em comparação dos dados com a literatura. Dados cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos da fração FASP e dos extratos EMCP/EMSP/EACP em comparação com os dados literários permitiram identificar a presença de derivados de ácidos gálico e elágico e podem ser os principais compostos responsáveis pela bioatividade dos extratos e frações do fruto.

Palavras-chave: *Caryocar villosum*, atividade antibacteriana, atividade antiplasmódica, citotoxicidade, ácidos fenólicos.



## ABSTRACT

---

The amazonian fruit residues are promising sources of chemical and metabolites constituents that are responsible for various biological activities. Many of these substances are able to inhibit the growth of microorganisms that cause infectious diseases. Among these fruits, the piquiá (*Caryocar villosum*) is a native fruit of the Amazonian Forest, a species belonging to the family *Caryocaraceae*, much appreciated for its pulpy flesh and excellent quality of its wood. Recent studies describe bioactive substances in ethanolic and hydroalcoholic extracts of bark and seeds that have antioxidant, enzymatic and photoprotective properties. The present work studied the chemical composition of the bioactive extracts of peels and seeds of piquiá. After cleaning, drying and grinding, the peels and pulverized seeds were extracted by maceration and Soxhlet with ethanol and, comparatively, with increasing polarity solvents (hexane, ethyl acetate and methanol). The ethanolic extracts were submitted to the liquid-liquid partition with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. All the extracts and fractions were submitted to tests in Fiocruz to evaluate the antibacterial activity by agar diffusion technique against Gram positive and negative bacteria and for antiplasmodial evaluation by flow cytometry. In biological activity tests, the FASP fraction was moderately active against the bacteria *Staphylococcus aureus* (12 mm), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (12 mm) and *Shigella flexneri* (15 mm), while the FHCP, EMCP, EMSP and EACP samples showed low activity against the bacterium *Shigella flexneri* with inhibition halos 11 mm, 11 mm, 10 mm and 9 mm, respectively. In the antiplasmodial evaluation only the EACP extract showed significant inhibition of the parasite *Plasmodium falciparum*, with a percentage of parasite inhibition above 60% in all concentrations tested. The phytochemical study of the bioactive samples was performed by chromatographic techniques and the identification of the substances was performed by spectroscopic and spectroscopic techniques. In the thin layer chromatography (TLC) analyzes of the samples, bands with characteristic coloration of phenolic compounds, flavonoids, saponins and terpenes were observed. The FHCP sample was analyzed by TLC and fractionated by flash column chromatography, one of the fractions was identified as a mixture of the phytosterols  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol by the spectrometric analyzes in comparison of the data with the literature. Chromatographic, spectroscopic and spectrometric data of the FASP fraction and the EMCP / EMSP / EACP extracts compared to the literature data allowed to identify the presence of gallic and ellagic acid derivatives and may be the main compounds responsible for the bioactivity of extracts and fractions of the fruit.

Keywords: *Caryocar villosum*, antibacterial activity, antiplasmodial activity, cytotoxicity, phenolic acids.

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Esquema de uma placa cromatográfica.....	25
Figura 2. Esquema básico de um equipamento de CLAE. ....	28
Figura 3. Faixas de deslocamentos químicos aproximados de RMN de <sup>13</sup> C.....	32
Figura 4. Esquema da instrumentação básica de um espectrômetro de massas .....	33
Figura 5. Vias biossintéticas dos metabólitos secundários.....	35
Figura 6. Estruturas de ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico .....	38
Figura 7. Estruturas de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico .....	39
Figura 8. Estrutura básica dos flavonoides.....	40
Figura 9. Estruturas de alguns carotenoides encontrados nas plantas .....	41
Figura 10. Núcleos mais usuais das saponinas triterpênicas .....	43
Figura 11. Mapa de distribuição da família <i>Caryocaraceae</i> . ....	43
Figura 12. Árvore, folha e fruto da espécie <i>Caryocar villosum</i> .....	48
Figura 13. Fruto piquiá inteiro e suas partes internas.....	49
Figura 14. Estruturas químicas dos ácidos majoritários presentes na polpa de piquiá.....	50
Figura 15. Estruturas de cariocarosídeos encontrados no extrato metanólico de polpa de piquiá .....	52
Figura 16. Estruturas de agliconas hederageninas (6) e baiogeninas (7) encontradas na fração do extrato metanólico de cascas de piquiá.....	53
Figura 17. Estruturas químicas de saponinas triterpênicas encontradas na casca do caule de piquiá. ....	54
Figura 18. Estruturas de glicosídeos fenólicos encontrados nas frações do extrato metanólico de cascas de caule de piquiá. ....	55
Figura 19. Estruturas químicas de compostos fenólicos da polpa de piquiá. ....	56
Figura 20. Estruturas químicas de carotenoides encontrados na polpa de piquiá .....	57
Figura 21. Sistema do extrator Soxhlet. ....	61
Figura 22. Sistema de cromatografia em coluna utilizando sílica <i>flash</i> . ....	65
Figura 23. Esquema do teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). ..	70
Figura 24. Esquema do teste de <i>P. falciparum</i> em placa de 96 poços.....	72
Figura 25. Placas cromatográficas dos extratos em hexano, acetato e metanol de cascas (1) e sementes (2).....	78

Figura 26. Placas com halos de inibição da fração FASP contra três bactérias. (a) <i>Staphylococcus aureus</i> (b) <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina - MRSA (c) <i>Shigella flexneri</i> .....	81
Figura 27. Placas com halos de inibição das quatro amostras ativas contra <i>Shigella flexneri</i> .	81
Figura 28. Resultado do teste para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM). (1) Controle de esterilidade; (2) Controle de crescimento; (3) Controle reagente (DMSO 10%).	82
Figura 29. Inibição antimalárica de EACP em todas as concentrações testadas.....	84
Figura 30. Esquema do estudo fitoquímico bioguiado. ....	87
Figura 31. Placas cromatográficas da fração FHCP revelada em diferentes reveladores. ....	88
Figura 32. Coluna <i>flash</i> FHCP com sistema de eluição gradiente. ....	89
Figura 33. Placa cromatográfica das 60 frações obtidas da coluna <i>flash</i> . ....	89
Figura 34. Placas cromatográficas das frações reunidas. A: Reagente vanilina; B: UV-366 nm; C: UV-254 nm. ....	90
Figura 35. Estruturas dos esteroides $\beta$ - sitosterol e estigmasterol.....	91
Figura 36. Espectro APCI/MS da F7 em modo positivo.....	92
Figura 37. Possíveis perdas do esqueleto esteroidal.....	92
Figura 38. Espectro de MS <sup>2</sup> do íon em $m/z$ 395. ....	93
Figura 39. Espectro de MS <sup>2</sup> do íon em $m/z$ 397. ....	93
Figura 40. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) da Fr. 7. Os fragmentos ampliados destacam as regiões de $\delta$ típicos de esqueleto esteroidal.....	94
Figura 41. Espectros de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) da Fr. 7. Os fragmentos ampliados destacam as regiões de $\delta$ típicos de esqueleto esteroidal.....	96
Figura 42. Algumas correlações de HMBC para os esteroides.....	97
Figura 43. Espectro de RMN 2D HSQC ( <sup>1</sup> H: 500 MHz, <sup>13</sup> C: 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) da amostra F7 FHCP e ampliações das correlações.....	98
Figura 44. Espectro de RMN 2D HMBC ( <sup>1</sup> H: 500 MHz, <sup>13</sup> C: 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) da amostra F7 FHCP e ampliações das correlações. ....	99
Figura 45. Placas cromatográficas da fração FASP revelada em diferentes reveladores.....	102
Figura 46. Espectro ESI/MS de FASP em modo positivo.....	103
Figura 47. Espectro ESI/MS de FASP em modo negativo.....	103
Figura 48. Fragmentação dos íons $m/z$ 169, 301, 469, 633. ....	104
Figura 49. Cromatograma da fração FASP em CLAE/DAD. ....	105
Figura 50. Cromatograma das 12 frações obtidas da Fração FASP em CLAE semi-preparativo. ....	106

Figura 51. Espectro de MS da fração FASP 11 ( $m/z$ 447).....	107
Figura 52. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) da FASP 11.....	108
Figura 53. Espectro de RMN HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz, $^{13}\text{C}$ : 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) da FASP 11.....	108
Figura 54. Ampliação das correlações de HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz, $^{13}\text{C}$ : 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) de FASP 11.....	109
Figura 55. Estrutura do ácido elágico ramnosídeo .....	110
Figura 56. Sistema de extração para SPE.....	111
Figura 57. Cromatograma do padrão de ácido gálico CL/EM.....	112
Figura 58. Espectros de ultravioleta (em cima) e de massas (embaixo) do padrão de ácido gálico.....	112
Figura 59. Cromatograma do padrão de ácido elágico CL/EM.....	113
Figura 60. Espectros de ultravioleta (em cima) e de massas (embaixo) do padrão de ácido elágico.....	113
Figura 61. Cromatograma de sobreposição dos picos dos extratos EMCP e EMSP.....	114
Figura 62. Cromatograma de EMCP em CL/EM.....	114
Figura 63. Cromatograma de EMSP em CL/EM.....	115
Figura 64. Espectro EM/EM do íon $m/z$ 331.....	116
Figura 65. Espectro EM/EM do íon $m/z$ 169.....	117
Figura 66. Espectro EM/EM do íon $m/z$ 301.....	117
Figura 67. Espectro EM/EM do íon $m/z$ 633.....	118
Figura 68. Espectro EM/EM do íon $m/z$ 625.....	118
Figura 69. Perfil cromatográfico da EACP com diferentes reveladores.....	119
Figura 70. Coluna filtrante de EACP com sistema de eluição gradiente.....	120
Figura 71. Placas cromatográficas das 6 frações obtidas da coluna filtrante de EACP.....	120
Figura 72. Placa cromatográfica obtida por placa preparativa da F1 EACP.....	121

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Compostos químicos encontrados na polpa de piquiá liofilizada.....	58
Tabela 2. Dados de massas e volumes utilizados em cada extração. ....	61
Tabela 3. Dados de massas e volumes utilizados nas extrações do material vegetal armazenado na geladeira.....	62
Tabela 4. Relação entre diâmetro da coluna e quantidade da amostra na cromatografia em coluna.....	65
Tabela 5. Relação das cepas bacterianas Gram-positivas e negativas.....	68
Tabela 6. Resultados da atividade antimicrobiana das espécies analisadas .....	75
Tabela 7. Resultados dos halos de inibição (mm) de <i>Caryocar villosum</i> .....	76
Tabela 8. Critério de avaliação para atividade antimicrobiana. ....	76
Tabela 9. Rendimentos dos extratos de cascas e sementes de Piquiá.....	77
Tabela 10. Rendimentos das partições de extratos etanólicos.....	79
Tabela 11. Halos de inibição dos extratos e frações bioativas. Legenda: FASP - Fração em acetato de sementes de piquiá; FHCP – Fração em hexano de cascas de piquiá; EMCP - Extrato metanólico de cascas de piquiá; EMSP – Extrato metanólico de sementes de piquiá; MRSA - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	80
Tabela 12. Percentual de morte celular em linhagens celulares VERO e HeP-2. ....	85
Tabela 13. Reunião e massa das frações da coluna <i>flash</i> FHCP. ....	90
Tabela 14. Dados de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz em CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de estigmasterol e β-sitosterol (δ em ppm) em comparação com a literatura. ....	95
Tabela 15. Correlações HSQC e HMBC para o β-sitosterol.....	100
Tabela 16. Correlações HSQC e HMBC para o estigmasterol.....	101
Tabela 17. Rendimentos das frações de FASP por CLAE semi-preparativo. ....	106
Tabela 18. Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e HSQC ( <sup>1</sup> H: 500 MHz, <sup>13</sup> C: 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD, TMS) da fração 11. ....	110
Tabela 19. Modo de eluição CL/EM. ....	112
Tabela 20. Dados referentes aos picos selecionados por CL/EM da amostra EMCP. ....	115
Tabela 21. Dados referentes aos picos selecionados por CL/EM da amostra EMSP.....	116
Tabela 22. Rendimentos das frações da coluna filtrante EACP. ....	120
Tabela 23. Rendimentos das frações obtidas por CCD preparativa da F1 EACP.....	122

## LISTA DE QUADROS

---

---

Quadro 1. Classificação dos compostos fenólicos com base no esqueleto básico.....	36
Quadro 2. Espécies dos gêneros <i>Caryocar</i> e <i>Anthodiscus</i> .....	44
Quadro 3. Utilidades de algumas partes da árvore e do fruto de piquiá.....	50

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

---

**ABTS** - ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico

**AcOEt** – acetato de etila

**CC** – cromatografia em coluna

**CCD** – cromatografia em camada delgada

**CCDAE** – cromatografia em camada delgada de alta eficiência

**CCDP** – cromatografia em camada delgada preparativa

**CI<sub>50</sub>** – concentração inibitória em 50% de parasitomia total

**CIM** – concentração inibitória mínima

**CL/EM** – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

**CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência

**CLSI** – National Committees for Clinical Laboratory Standards

**CS<sub>50</sub>** – capacidade de sequestro em 50% dos radicais livres

**DAD** – detector de arranjo de diodo

**DCM** – diclorometano

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

**DXR** – doxorrubicina

**EACP** – extrato em acetato de cascas de piquiá

**EASP** – extrato em acetato de sementes de piquiá

**EECP** – extrato etanólico de cascas de piquiá

**EESP** – extrato etanólico de sementes de piquiá

**EH** – extrato hidroalcoólico

**EHCP** – extrato hexânico de cascas de piquiá

**EHSP** – extrato hexânico de sementes de piquiá

**EM** – espectrometria de massas

**EMCP** – extrato metanólico de cascas de piquiá

**EMSP** – extrato metanólico de sementes de piquiá

**EtOH** – solvente etanol

**FACP** – fração em acetato de cascas de piquiá

**FASP** – fração em acetato de sementes de piquiá

**FDCP** – fração em diclorometano de cascas de piquiá

**FDSP** – fração em diclorometano de sementes de piquiá

**FHCP** – fração hexânica de cascas de piquiá  
**FHSP** – fração hexânica de sementes de piquiá  
**FIOCRUZ** – Fundação Instituto Oswaldo Cruz  
**FM** – fração metanólica  
**FMCP** – fração metanólica de cascas de piquiá  
**FMSP** – fração metanólica de cascas de piquiá  
**FWHM** – half width at half maximum  
**HCT116** – adenocarcinoma do cólon humano  
**HEPES** – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanolsulfônico  
**Hex** – hexano  
**HHDP** – hexahidroxidifenil  
**i-PrOH** – isopropanol  
**LB** – Luria Bertani  
**MCF-7** – adenocarcinoma da mama humana  
**Me<sub>2</sub>CO** – propanona  
**MeCOEt** – butanona  
**MM** – massa molecular  
**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina  
**ORAC** – oxygen radical absorbance capacity  
**Q-biomA** – Química de biomoléculas da Amazônia  
**RMN** – ressonância magnética nuclear  
**SKMELL19** – melanona humano  
**UV** – ultravioleta  
**UV-VIS** – ultravioleta - visível



## SUMÁRIO

---

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. OBJETIVOS .....	20
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos .....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	21
3.1. Resíduos de frutos amazônicos como fonte de substâncias bioativas .....	21
3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana e antimalárica. ....	22
3.3. Técnicas cromatográficas .....	24
3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	24
3.3.2. Cromatografia líquida (CL) .....	26
3.4. Técnicas espectroscópicas .....	29
3.4.1. Espectroscopia de ultravioleta (UV) .....	29
3.4.2. Espectroscopia em infravermelho (IV) .....	30
3.4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	31
3.5. Técnicas espectrométricas .....	32
3.6. Metabólitos vegetais .....	34
3.6.1. Principais classes químicas presentes nas espécies de <i>Caryocar</i> . ....	35
3.7. Família <i>Caryocaraceae</i> .....	43
3.8. Piquiá ( <i>Caryocar villosum</i> ).....	47
3.9. Estudos químicos e biológicos de <i>Caryocar villosum</i> .....	50
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	60
4.1. Coleta e processamento do material vegetal.....	60
4.2. Preparação dos extratos .....	60
4.3. Partição líquido-líquido dos extratos etanólicos.....	62
4.4. Codificação dos extratos e frações.....	63
4.5. Análise cromatográfica das substâncias bioativas .....	63
4.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	63
4.5.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	64
4.5.3. Cromatografia em coluna aberta (CC).....	64

4.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	65
4.5.5. Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massas (CL/EM) .....	66
4.6. Análises espectrométricas e espectroscópicas .....	66
4.6.1. Espectrometria de massas (EM).....	66
4.6.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	67
4.7. Atividade antimicrobiana.....	67
4.7.1. Teste de difusão em ágar.....	67
4.7.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	69
4.8. Atividade antimalárica.....	71
4.8.1. Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	71
4.8.2. Análise de inibição de crescimento.....	71
4.9. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.1. Resultados preliminares.....	75
5.2. Rendimentos e perfil cromatográfico dos extratos de cascas e sementes de piquiá .....	77
5.3. Análises biológicas .....	80
5.3.1. Atividade antibacteriana .....	80
5.3.2. Atividade antimalárica .....	83
5.3.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	84
5.4. Estudo fitoquímico bioguiado.....	86
5.4.1. Fração em hexano de cascas (FHCP).....	87
5.4.2. Fração em acetato de etila de sementes (FASP) .....	102
5.4.3. Extrato metanólico de cascas e sementes (EMCP/EMSP) .....	111
5.4.4. Extrato em acetato de cascas (EACP).....	119
6. CONCLUSÃO .....	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	125

## 1. INTRODUÇÃO

---

A resistência de microorganismos aos antimicrobianos vem crescendo diariamente preocupando o quadro clínico de muitas doenças infecciosas, considerado um dos principais problemas de saúde mundial. Existem vários estudos com o uso de produtos naturais como matéria-prima para síntese de diferentes substâncias antimicrobianas para tratamento dessas doenças. As plantas, como produtos naturais, possuem vias metabólicas secundárias que dão origem a diversas classes como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos e poliacetilenos que podem ser específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies (Simões et al., 2007).

As frutas amazônicas, como, por exemplo, o cupuaçu, tucumã, açáí, buriti e bacuri, apresentam grande potencial para produção dos mais variados tipos de alimentos, tendo excelentes características de aroma, sabor e textura, que são resultantes da presença de substâncias químicas. E esses constituintes se concentram majoritariamente nas cascas e sementes, que são descartadas durante o beneficiamento destas frutas e os quais poderiam ser utilizados para minimizar o desperdício de alimentos, beneficiando o homem e o meio ambiente (Kobori e Jorge, 2005).

O grupo de pesquisas Q-BiomA (Química de Biomoléculas da Amazônia) vem desenvolvendo estudos no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), visando a investigação de resíduos de frutos amazônicos como fontes de substâncias químicas e biologicamente ativas para fins biotecnológicos e farmacológicos. Em trabalhos realizados por Pereira (2015), propôs-se a prospecção, identificação e extração de substratos dos resíduos de 17 espécies frutíferas amazônicas com interesses comerciais. Em seus resultados, os extratos de cascas e sementes de piquiá destacaram-se pela presença de compostos fenólicos e flavonoídicos propiciando resultados positivos para atividades

antioxidantes por DPPH e inibitória das enzimas digestivas lipase,  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase, possibilitando um amplo campo de pesquisa.

Esses resultados motivaram os estudos realizados por Yamaguchi (2015), com o intuito de caracterizar os compostos fenólicos dos resíduos de frutos amazônicos e avaliar o uso dos mesmos no âmbito biotecnológico. A análise dos extratos de cascas e sementes de piquiá demonstraram que os extratos etanólicos e hidroalcoólicos do fruto apresentaram melhores percentuais de substâncias fenólicas e flavonoídicas, e os melhores resultados para capacidade fotoprotetora, bem como um destaque maior aos extratos etanólicos de casca de piquiá por apresentar uma capacidade de inibição do descoramento do  $\beta$ - caroteno, atividade antioxidante, maior que de outras dezoito amostras analisadas no projeto.

Estudos realizados por Bastos (2015) descreveram a avaliação da atividade antimicrobiana de 25 espécies de plantas da Região Amazônica, incluindo os extratos etanólicos e hidroalcoólicos de piquiá obtidos no projeto anterior citado (Yamaguchi, 2015), que apresentaram excelentes resultados frente a bactérias Gram-positivas e negativas, como *Streptococcus pyogenis*, *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella arizonae*, mostrando que extratos deste fruto são ricos em substâncias químicas capazes de inibir o crescimento de microorganismos.

O bom desempenho das pesquisas preliminares realizadas no grupo de pesquisas Q-biomA e os resultados antimicrobianos relatados para os extratos de piquiá demonstram a necessidade de avanços na investigação química desses compostos bioativos presentes no fruto. Portanto, o presente trabalho visa estudar a composição química de extratos e frações de sementes e cascas de piquiá bioativos em ensaios de atividade antibacteriana e antiplasmódica.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. Geral**

Contribuir para o conhecimento da composição química e atividade biológica dos extratos bioativos de sementes e cascas de piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.)

### **2.2. Específicos**

- ❖ Estudar o perfil cromatográfico dos extratos.
- ❖ Utilizar técnicas cromatográficas para realizar fracionamento bioguiado.
- ❖ Identificar as substâncias de interesse por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- ❖ Avaliar as atividades antibacteriana e antiplasmódica dos extratos e frações.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---

---

#### **3.1. Resíduos de frutos amazônicos como fonte de substâncias bioativas**

A floresta amazônica apresenta grande diversidade e riqueza de seus frutos. Estima-se que são aproximadamente 220 espécies de frutíferos comestíveis, representando cerca de 44% da diversidade frutífera brasileira. Essas frutas podem ser consideradas excelentes fontes de macro e micronutrientes, valorizadas no contexto atual como alimentos saudáveis ou alimentos naturais e são comumente usadas pela população para fins terapêuticos e alimentícios (Neves et al., 2012).

A alta ingestão destes frutos tem sido associada à baixa incidência de doenças degenerativas. Este efeito está associado não apenas à presença de antioxidantes como as vitaminas A, C e E, mas também a outras substâncias naturais, como carotenoides, flavonoides e outros compostos fenólicos, que mostram capacidade de eliminação de radicais livres (Barreto et al., 2009).

O consumo e despulpamento desses frutos geram uma quantidade relevante de resíduos orgânicos que são descartados aleatoriamente causando problemas ambientais. Porém, segundo Demajorovic (1995) esses resíduos sólidos diferenciam-se do termo lixo pois apresentam valores nutricionais e econômicos que podem ser reaproveitados no próprio processo produtivo.

Estudos têm demonstrado uma ampla utilização desses resíduos orgânicos, cascas e sementes, que podem ser reaproveitados para fins biotecnológicos e agroindustriais como, por exemplo, em produção de adubos, rações, barras de cereais, biocombustíveis, enzimas microbianas e como alimentos para ruminantes (Santos et al., 2014; Miller et al., 2013; Silva et al., 2009; Barbosa et al., 2009; Nascimento et al., 2017; Giordani Junior et al., 2014).

Na literatura há relatos de várias substâncias bioativas encontradas em resíduos de frutos amazônicos que estão relacionadas às atividades farmacológicas. Dentre elas, Yamaguchi e colaboradores (2014) descrevem a presença de constituintes químicos nos resíduos de bacuri (*Platonia insignis*), nas cascas foram detectados biflavonoides e grande quantidade de pectina, nas sementes detectou-se diterpenos de esqueletos caurano e lábdano, xantonas, álcoois e ácidos graxos, substâncias associadas às atividades antibacteriana, anti-inflamatória e antiparasitária. Souza (2014) descreve o elevado potencial antioxidante de açaí (*Euterpe oleracea*), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) e castanha (*Bertholletia Excelsa*) que se deve à alta concentração de polifenóis, as antocianinas presentes nas sementes de açaí, os carotenoides nas cascas de tucumã e os tocoferóis nos resíduos da castanha. Segundo Yang et al. (2003), as sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) apresentam alto potencial antioxidante pois são fontes de compostos fenólicos como catequina, quercetina, caempferol, entre outros.

### **3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana e antimalárica.**

Devido à variedade da flora amazônica com potenciais substâncias bioativas, várias pesquisas estão voltadas para o estudo e a avaliação de produtos naturais com propriedades farmacológicas, no intuito de descobrir compostos candidatos que apresentem atividade antimicrobiana e possível desenvolvimento de novas drogas (Duarte et al., 2006).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais geralmente é avaliada por meio da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Ostrosky et al., 2008).

Os métodos de rastreio atualmente disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais se dividem em três grupos: os métodos bioautográfico,

difusão e diluição. Os métodos de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas, em vez que estes métodos só fornecem uma ideia da presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Por outro lado, métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, uma vez que é possível determinar a concentração inibitória mínima (Valgas et al., 2007).

O método de difusão é uma técnica que não requer dispersão homogênea em água, chamado de método de ágar usando um disco, furo ou cilindro como reservatório. O reservatório que contém a amostra a ser testada é colocado em contato com um meio inoculado e, após incubação, o diâmetro da zona clara em torno do reservatório (diâmetro de inibição) é medida. Este método foi originalmente concebido para monitorar a quantidade de substâncias antibióticas no extrato bruto. A fim de diminuir o limite de detecção, o sistema inoculado pode ser mantido a uma baixa temperatura antes de incubação, o que favorece a difusão através do meio de cultura, o que aumenta o diâmetro de inibição (Rios et al., 1988).

A avaliação da atividade antimalárica de produtos naturais, em geral, é feita por testes *in vitro* e *in vivo*, que são complementares. No primeiro caso, empregam-se animais na experimentação, enquanto que o segundo é realizado em culturas de *Plasmodium falciparum*, um dos agentes causadores da malária, sendo isento de risco ao paciente nos tipos de ensaios (Nogueira e Rosário, 2010).

Os testes de sensibilidade do plasmódio às drogas consistem na medição do efeito das drogas sobre o crescimento e o desenvolvimento dos parasitas. O sistema de monitoramento de sensibilidade não sofre influências confusas de fatores relacionados ao hospedeiro, como a imunidade do hospedeiro e a farmacocinética do medicamento (Chaijaroenkul et al., 2005).

Um método para testar extratos que podem ser tóxicos para plasmódio utiliza microorganismos radiomarcados em um ensaio de infecção de eritrócitos com pratos de microtitulação. Os eritrócitos parasitizados são incubados com e sem substâncias de teste, e o



número de organismos de *Plasmodium* após o período de incubação é quantificado (Cowan et al., 1999).

Os produtos naturais apresentam uma grande diversidade molecular para descoberta e desenvolvimento de drogas. Uma das estratégias para obtenção de novas substâncias líderes consiste no isolamento guiado por bioatividade na qual ensaios biológicos ou farmacológicos são utilizados para identificar extratos e suas frações ativas e dirigir os estudos fitoquímicos por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas (Pieters e Vlietinck, 2005).

### **3.3. Técnicas cromatográficas**

As técnicas cromatográficas permitem separar, caracterizar e purificar compostos de determinado extrato ou fração. Podem ser utilizadas para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura. A cromatografia trata-se de um método físico-químico de separação dos componentes, empregando duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, a separação resulta da migração diferencial dos componentes da mistura.

A fase estacionária pode ser empregada em superfície planar ou disposta em um tubo cilíndrico, dessa forma, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna (Collins, 1997).

#### **3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A cromatografia em camada delgada trata-se de uma técnica cromatográfica simples e econômica afim de uma separação rápida e com identificação visual. Este método consiste na separação de componentes de uma mistura sólido-líquido, onde a fase móvel líquida migra

sobre a camada delgada de adsorvente retido em uma superfície plana (fase estacionária/sólido). Como fase estacionária, a sílica é o adsorvente mais empregado na separação de compostos lipofílicos, aldeídos, cetonas, alcaloides, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, terpenoides e esteroides (Collins, 1997).

O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o fator de retenção (Rf), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel (Figura 1). Os valores ideais para Rf estão entre 0,4 e 0,6 (Degani et al., 1998).

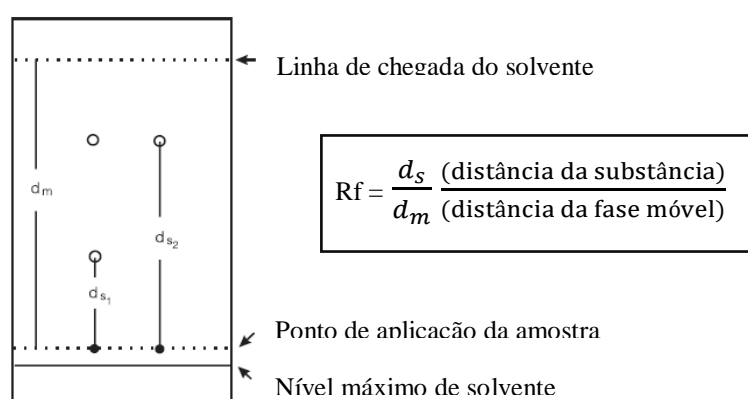


Figura 1. Esquema de uma placa cromatográfica. Fonte: Degani et al. (1998)

A CCD pode ser usada tanto na escala analítica quanto na preparativa. Placas analíticas usualmente têm 10 cm x 2,5 cm e preparativas 20 cm x 20 cm. Podem ser preparadas sobre placas de vidro, com espessura de 3 a 4 mm ou encontrá-las pré-fabricadas, as quais apresentam a fase estacionária depositada sobre uma lâmina de material plástico ou de alumínio, sendo estas de maior eficiência (Degani et al., 1998).

Para analisar o resultado e o desempenho da separação alcançado pelo sistema faz-se necessária a revelação das manchas por processos destrutivos (reagentes ou soluções que causam oxidação dos compostos) e/ou processos não destrutivos (câmaras de luz ultravioleta) (Jork et al., 1990).

A revelação de compostos fenólicos em CCD pode ser realizada utilizando uma mistura aquosa fresca de 1% de ferricianeto de potássio e 1% de cloreto férrico, os fenóis

simples apresentam colorações verde intenso, roxo, azul ou preto. Também são detectados em reagentes como vanilina – HCl ou vanilina – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> revelando uma gama de cores cor-de-rosa com resorcinol e derivados de floroglucinol. Os taninos podem ser detectados em luz ultravioleta curta como manchas violetas escuras (Harborne, 1984).

A separação de saponinas por CCD podem ser aplicadas em gel de sílica em solventes como acetona – hexano (4:1), clorofórmio-acetato de etila (1:1), entre outros. Nas placas são detectadas como mancha rosa a púrpura quando pulverizadas com cloreto de antimônio em HCl concentrado e aquecimento a 110 °C durante 10 min (Harborne, 1984). Quando reveladas com o reagente Vanilina – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentam-se com manchas azuis, azul-violeta e às vezes vermelhas ou amarelo-castanhas no visível (Schenkel et al., 2004).

### **3.3.2. Cromatografia líquida (CL)**

A cromatografia líquida pode ser dividida em dois grupos: a cromatografia líquida clássica, que utiliza colunas em tubos de vidro e sob pressão atmosférica, por força da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência, que utiliza colunas cilíndricas de aço com micropartículas e por bombas de alta pressão (Collins, 1997).

#### **3.3.2.1. Cromatografia líquida em coluna (CC)**

A cromatografia líquida em coluna é uma das técnicas mais utilizadas para a separação ou isolamento de constituintes de extratos vegetais, pois utiliza colunas de tipos e tamanhos diferentes, possibilitando um amplo sistema de fases estacionárias e móveis.

A coluna cromatográfica é constituída por um tubo de vidro, em posição vertical, a extremidade superior é aberta e a inferior é afilada terminando numa torneira, que permitirá o controle da vazão da fase móvel (Collins, 1997). A escolha do eluente segue os princípios discutidos em CCD. Se, por exemplo, a amostra é constituída por duas substâncias, uma apolar e outra polar, utiliza-se primeiramente um eluente apolar e em seguida um eluente polar. O

volume das frações a serem recolhidas é função da quantidade de amostra e do grau de dificuldade da separação (Degani et al., 1998).

A cromatografia *flash* é um tipo de cromatografia de coluna que fornece um método rápido e barato para a separação preparativa de misturas que requerem apenas uma resolução moderada. Além da coluna de vidro, é empregada uma válvula para controle de fluxo de ar de média pressão.

Resumidamente, o procedimento para a coluna *flash* consiste em: 1) Escolha do melhor sistema de eluição; 2) Preenchimento da coluna com sílica de gel de sílica, 40 a 63  $\mu\text{m}$ , a seco ocupando 5 a 6 polegadas; 3) Introdução do solvente e em seguida do ar de média pressão para empurrar todo o ar do solvente; 4) Aplicação da amostra e reaplicação dos eluentes com taxa de fluxo de 2 in/min (Still et al., 1978).

### **3.3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A cromatografia líquida de alta eficiência possui a instrumentação mais moderna que as empregadas em cromatografia líquida clássica. A principal diferença é a utilização de colunas com micropartículas esféricas e por serem menos permeáveis tornou-se necessária a utilização de bombas para eluição da fase móvel. Possui a capacidade de separar e analisar grande quantidade de compostos presentes em várias amostras, em curto tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Lanças, 2009).

A CLAE é uma técnica moderna que utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados (Figura 2). É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas com materiais preparados e uma fase móvel que é eluída sob pressão por bombas. Existem uma gama de detectores mas a luz ultravioleta UV-VIS é o mais utilizado. Os registros de dados são obtidos por computador. Esses dados geram cromatogramas,

representações gráficas da separação referida por meio de picos correspondendo cada componente químico (Collins, 1997).

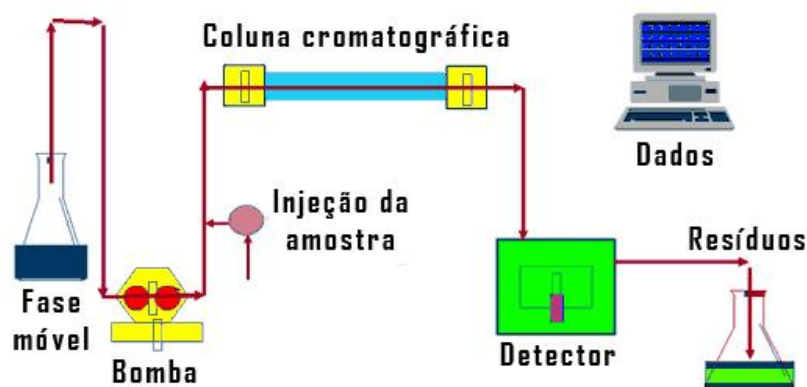


Figura 2. Esquema básico de um equipamento de CLAE.

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar. Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a fase C18 (octadecilsílica) a mais usada (Degani et al., 1998).

As análises podem ser realizadas em escala analítica quando se pretende conhecer o perfil cromatográfico da amostra ou em escala preparativa que permite o isolamento dos compostos químicos. A escolha do mecanismo de separação depende da natureza, peso molecular e das interações entre soluto e as fases estacionária e móvel.

Para avaliação e otimização da separação são necessários ajustes nos parâmetros cromatográficos em busca da resolução necessária. A resolução mede a qualidade da separação e pode ser melhorada aperfeiçoando os parâmetros de fator de retenção, eficiência e seletividade (Cass e Degani, 2001).

O cromatógrafo líquido combinado a um espectrômetro de massas (CL/EM) melhora a performance das duas técnicas sem afetar as características de cada instrumento. CL/EM é

uma técnica hifenada eficaz para um rastreio rápido de misturas na qual os dados de absorção de luz obtidos e as massas são informações importantes para a possível identificação da estrutura (Chiaradia et al., 2008).

As formas de ionização mais utilizadas no acoplamento CL/MS, as quais operam 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”) (Lanças, 2009).

### **3.4. Técnicas espectroscópicas**

#### **3.4.1. Espectroscopia de ultravioleta (UV)**

Muitas moléculas orgânicas e grupos funcionais são visíveis nas porções de um espectro eletromagnético nas regiões de ultravioleta (UV) e visível (VIS), que são regiões com comprimento de ondas entre 190 nm e 800 nm. Consequentemente, a utilização da absorção espectroscópica é limitada pelo alcance dos comprimentos de ondas.

Um espectroscópio UV-VIS consiste de uma fonte de luz, um monocromador e um detector. A fonte de luz é usualmente uma lâmpada de deutério que emite radiação eletromagnética na região ultravioleta de um espectro e uma segunda fonte de luz, uma lâmpada de tungstênio, que é usada para comprimentos de onda na região visível de um espectro. O monocromador é uma rede de difração, sua função é difundir o feixe de luz para dentro do comprimento de onda dos componentes. O detector é geralmente um tubo fotomultiplicador, em instrumentos modernos são usados detectores de diodos posicionados lado a lado num cristal de silício (Pavia et al., 2009).

O espectro de absorção no ultravioleta é importante para revelar a presença de certos grupos funcionais e a posição dos substituintes existentes no esqueleto da molécula. A maioria dos compostos fenólicos (e especialmente os flavonoides) pode ser detectada em

cromatogramas por suas cores ou fluorescências à luz UV, as cores sendo intensificadas ou alteradas queimando os papéis com vapor de amônia. Os pigmentos fenólicos são visivelmente coloridos e são assim particularmente facilmente monitorizados durante o seu isolamento e purificação. Os compostos fenólicos são todos aromáticos, de modo que todos eles mostram intensa absorção na região UV do espectro. Os fenóis absorvem no UV curto e podem ser detectados à luz no comprimento de onda 253 nm como pontos absorventes escuros em placas que se espalham com gel de sílica contendo o indicador fluorescente (Harborne, 1984).

Todos os flavonoides causam extinção da fluorescência em UV - 254 nm e dependendo do tipo estrutural apresentam coloração amarelo-escuro, verde ou azul, que pode ser intensificada com o uso de reveladores (Wagner e Bladt, 1995). Os espectros de carotenoides são bastante característicos entre 400 a 500 nm, com um pico majoritário cerca de 450 nm e dois picos minoritários (Harborne, 1984).

#### **3.4.2. Espectroscopia em infravermelho (IV)**

Esta técnica permite indicar a existência de insaturações de sistemas aromáticos e de bandas características dos grupos funcionais específicos na molécula. A obtenção de um espectro igual ao do padrão possibilita confirmar o tipo de estrutura do composto em análise (Cunha e Roque, 2005a).

A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situado entre as regiões do visível e das micro-ondas. A porção de maior utilidade para a química orgânica está situada entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$  (Silverstein et al., 2007). Compostos aromáticos são detectados com intensidade forte em uma frequência de  $3150 - 3050\text{ cm}^{-1}$ ; fenóis apresentam bandas de estiramento entre  $3400$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$ .

De acordo com Harborne (1984), a espectroscopia IV não é muito útil para identificação de carotenoides, mas avaliada para detecção de certas características estruturais, como grupos ceto- ou acetilênicos em alguns pigmentos.

### 3.4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica valiosa para a determinação do esqueleto da estrutura de compostos orgânicos. Para obtenção dos espectros de ressonância, submete-se a amostra a um campo magnético externo, de forma que os núcleos com número de massa ímpar entram em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, de acordo com a sua vizinhança química (Simões et al., 2007).

Os espectros de RMN de hidrogênio e carbono <sup>13</sup> são os mais utilizados e sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética (Simões et al., 2007).

Para interpretação dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H é importante considerar três aspectos dos espectros: 1) deslocamento químico ( $\delta$ ) – localização dos sinais no eixo x, indicando a presença de núcleo em um ambiente magnético diferente; 2) área do pico – a área sob cada sinal é proporcional ao número de átomos de H (integração); 3) desdobramento de sinal – efeito sob os hidrogênios equivalentes produzindo um sinal com picos múltiplos (acoplamento) (Solomons e Fryhle., 2011).

Nos espectros de RMN os hidrogênios em grupos metilas (hidrocarbonetos saturados ou alifáticos) apresentam deslocamentos químicos em 0,7 – 1,3 ppm, frequência mais baixa em relação aos prótons metilênicos (1,2 – 1,4 ppm) e os hidrogênios metínicos com deslocamentos químicos em 1,4 – 1,7 ppm. Os hidrogênios de grupos aromáticos possuem 2 tipos característicos: hidrogênios de anel aromáticos, deslocamento alto próximo de 6,5 – 8,0 ppm e hidrogênios benzílicos apresentam deslocamento químico entre 2,3 – 2,7 ppm (Pavia et al., 2009).



Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  não existe desdobramento de sinais, cada átomo de carbono único produz apenas um pico. Átomos de carbonos de hidrocarbonetos são blindados do campo magnético e os sinais aparecem em campo alto (menor ppm), enquanto que os átomos de carbonos ligados aos grupos eletronegativos, grupo hidroxila são desblindados e os sinais aparecem em campo baixo (maior ppm), por exemplo, os grupos aromáticos apresentam deslocamentos químicos entre 110 – 175 ppm. A Figura 3 mostra as faixas aproximadas de deslocamentos químicos para diferentes carbonos substituídos (Pavia et al., 2009).

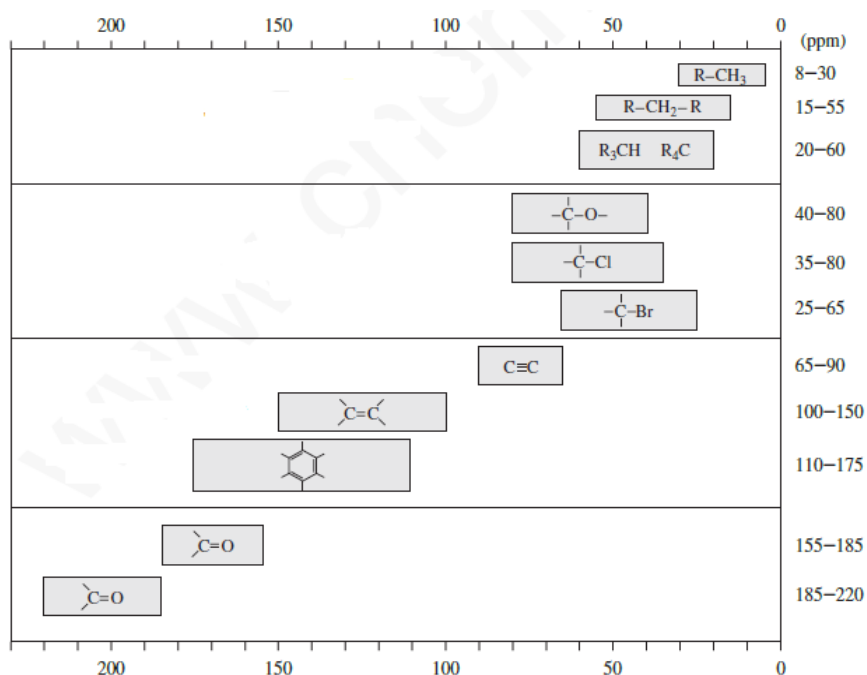


Figura 3. Faixas de deslocamentos químicos aproximados de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Fonte: Pavia et al. (2009)

### 3.5. Técnicas espectrométricas

Espectrometria de Massas (EM) é uma técnica físico-química que fornece indicações sobre a massa molecular e o padrão de fragmentação que podem contribuir para a localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais (Cunha e Roque, 2005a).

Um espectro de massa em conjunto com outras técnicas permite a identificação de estruturas de compostos orgânicos. Atualmente o uso dessas técnicas acopladas às cromatografias modernas, permitem análises mais eficientes e rápidas.

A instrumentação de um espectrômetro de massas é formada por quatro componentes: entrada da amostra, tipo de ionização, método de separação de íons e o detector. A amostra é introduzida na fonte de íons, onde o composto é ionizado, os íons são separados na base da razão massa/carga e o número de íons que corresponde a cada “unidade” de massa/carga é registrado em um sistema de dados e os dados são fornecidos na forma de um espectro de massa (Figura 4) (Silverstein et al., 2007).

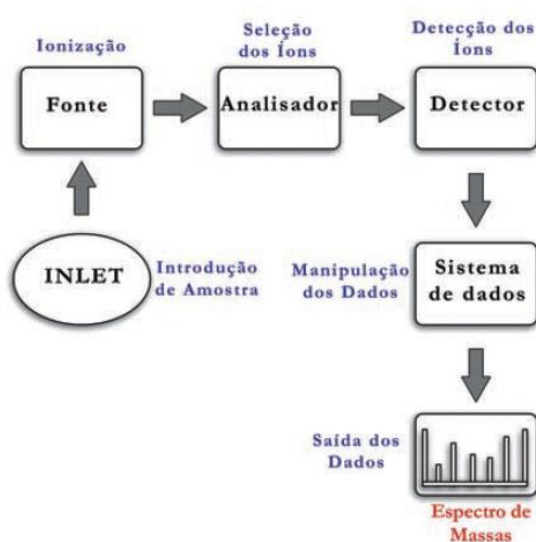


Figura 4. Esquema da instrumentação básica de um espectrômetro de massas. Fonte: Lanças (2009)

As fontes de ionização utilizadas e disponíveis no Bloco da Central Analítica da UFAM são: Ionização por Eletrospray (ESI) e Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI), as quais operam à pressão atmosférica.

A fonte de ionização por eletrospray (ESI) exerce melhor desempenho no acoplamento cromatografia líquida e espectrometria de massa (CL-EM). O processo de ionização ocorre em pressão atmosférica. A amostra é dissolvida em um solvente, usualmente, não polar, e pressurizada em um tubo capilar feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (são

dessolvatadas) e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (Lanças, 2009). É uma técnica ideal para análises de moléculas polares e com massa molecular grande, mas não se limita ao estudo de grandes biomoléculas, pois moléculas pequenas com peso molecular na faixa de 100-1500 podem ser estudadas por ESI-MS (Pavia et al., 2009).

Outra fonte de ionização muito utilizada é a ionização química à pressão atmosférica (APCI), empregada na análise de moléculas não polares e/ou mais voláteis, as quais não apresentam as características desejáveis para serem convertidas em íons na fase gasosa a partir de uma fase condensada – como um líquido em HPLC. Na técnica APCI, os analitos provenientes da coluna de cromatografia líquida são introduzidos na sonda cuja extremidade é circundada por um sistema de aquecimento e dentro da qual um gás adicional passa continuamente para volatilizar a amostra e solvente. Próximo à sonda, é instalada uma agulha metálica, denominada de eletrodo de descarga tipo corona, que, submetido a um potencial de alguns milhares de volts, provocará o aparecimento do denominado efeito corona. Utilizando-se uma interface do tipo APCI, pode-se operar tanto no modo positivo, quanto no modo negativo. O sucesso do processo dependerá basicamente da afinidade protônica do analito (Lanças, 2009).

### **3.6. Metabólitos vegetais**

As plantas e microorganismos apresentam um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias, não necessariamente relacionadas diretamente à manutenção da vida do organismo produtor, todo esse conjunto é chamado de metabólito secundário. O aparecimento desses metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas e microorganismos conduz à síntese de

metabólitos vegetais como funções de defesa ou atração. Por serem fatores de interação entre organismos, apresentam atividade biológicas interessantes (Simões et al., 2007).

Os blocos de construção para os metabólitos secundários não ocorrem de um mesmo produtor. Uma parte da via biossintética é derivada de metabólitos primários a partir dos intermediários acetil-coenzima A (acetil-coA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e fosfato deoxixilulose (Dewick, 2002). O esquema do ciclo biossintético dos metabólitos vegetais pode ser observado na Figura 5.

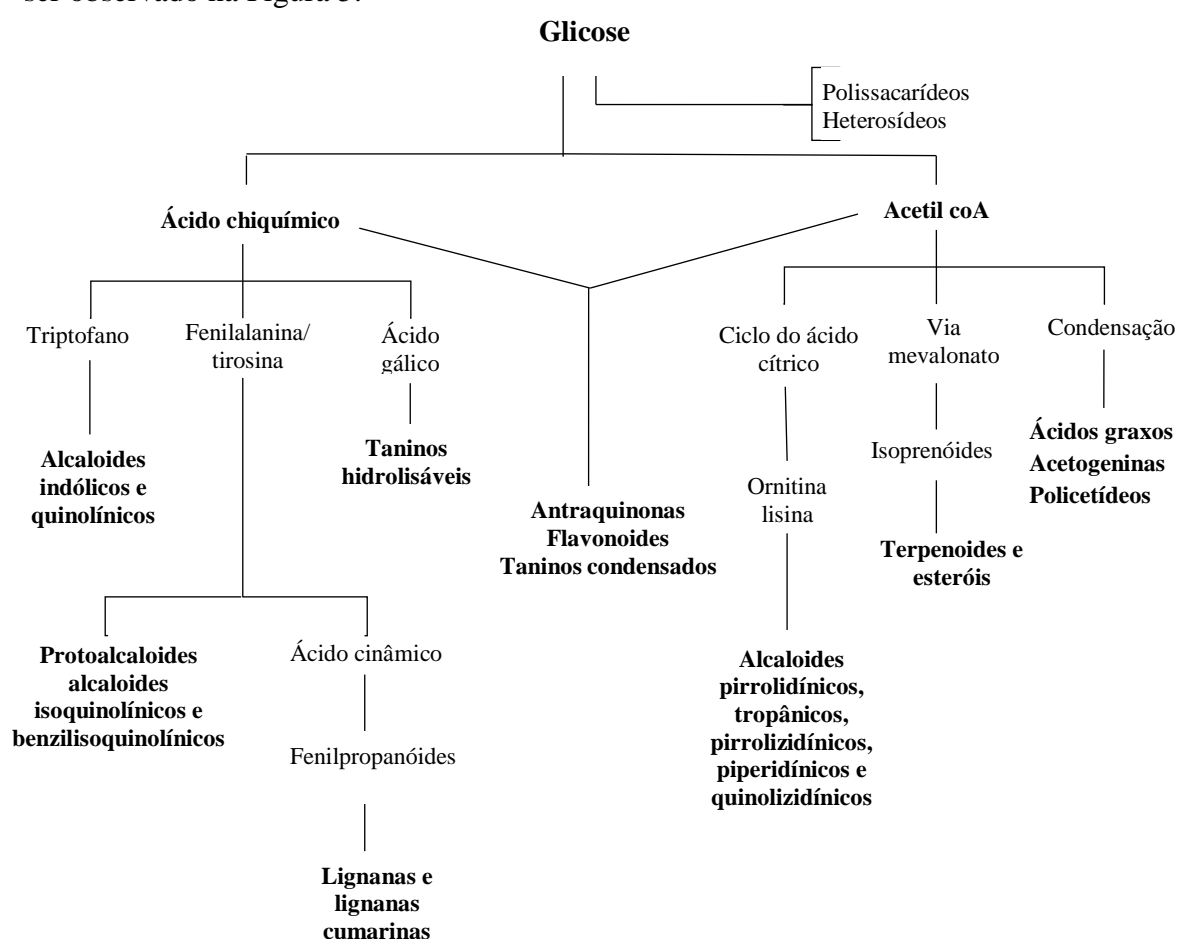


Figura 5. Vias biossintéticas dos metabólitos secundários. Fonte: Simões et al. (2007)

### 3.6.1. Principais classes químicas presentes nas espécies de *Caryocar*.

#### 3.6.1.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos englobam uma vasta diversidade de substâncias vegetais das quais possuem em comum um anel aromático possuindo um ou mais substituintes hidroxilas.

Alguns compostos fenólicos não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais. São aqueles presentes sob a forma de polímeros, na qual estão os taninos e as ligninas. Essas substâncias tendem a ser solúveis em água, já que ocorrem mais frequentemente combinado com açúcar (glicosídeos) e são geralmente localizadas no vacúolo celular (Harborne, 1984).

Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal (Quadro 1), onde C6 corresponde ao anel benzênico e CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono e também podem ser classificados de acordo com a ocorrência desses compostos no reino vegetal, podendo ser divididos em compostos amplamente distribuídos e compostos fenólicos de distribuição restrita (Carvalho et al., 2004).

<b>Esqueleto básico</b>	<b>Classe de substâncias fenólicas</b>
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6 – C1	ácidos fenólicos
C6 – C2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6 – C3	fenilpropanóides, ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas.
C6 – C4	Naftoquinonas
C6 – C1 – C6	Xantonas
C6 – C2 – C6	estilbenos, antraquinonas
C6 – C3 – C6	flavonoides e isoflavonoides
(C6 – C3) <sub>2</sub>	Lignanais
(C6 – C3 – C6) <sub>2</sub>	Diflavonoides
(C6) <sub>n</sub>	melaninas vegetais
(C6 – C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6 – C1) <sub>n</sub>	taninos hidrolisáveis
(C6 – C3 – C6) <sub>n</sub>	taninos condensados

Quadro 1. Classificação dos compostos fenólicos com base no esqueleto básico. Fonte: Carvalho et al. (2004)

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos. Em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução, além de atuarem como agentes antipatogênicos e contribuírem na pigmentação. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. Além desses compostos, especialmente

os flavonoides, as vitaminas C e E e os carotenoides são bons antioxidantes, capazes de absorver radicais livres e inibir a cadeia de iniciação ou interromper a cadeia de propagação das reações de oxidação, sendo muito eficientes na prevenção de autooxidação (Angelo e Jorge, 2007).

No processo bioquímico da planta, fenóis de plantas possuem capacidade de complexar com proteína por ligação. Quando os constituintes das células da planta se reúnem e as membranas são destruídas durante os procedimentos de isolamento, os fenóis rapidamente formam complexos com a proteína e como resultado muitas vezes há inibição da atividade enzimática em extratos de plantas brutas. Por outro lado, os fenóis são muito susceptíveis à oxidação enzimática e a substância fenólica pode ser perdida durante os procedimentos de isolamento, devido à ação de enzimas fenolases específicas presentes em todas as plantas (Harborne, 1984).

A origem biossintética dos compostos fenólicos deriva de duas vias metabólicas: a via do chiquimato e a via do acetato. A via do ácido chiquimato tem origem neste ácido, cuja biossíntese se faz a partir da condensação do fosfoenolpiruvato com a 4-fosfo-eritose. Do ácido chiquímico originam-se ácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), que cuja desaminação forma o ácido cinâmico e seus derivados. A via do acetato origina ácidos  $\beta$ -policetometilênicos de comprimento variável, que por ciclização via condensação aldólica ou reação de Claisen formam compostos fenólicos (Cunha e Roque, 2005b).

#### **3.6.1.1.1. Ácidos fenólicos**

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (Angelo e Jorge, 2007). A atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo –

CO<sub>2</sub>H em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (Silva et al., 2010).

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, *o*-hidroxibenzoico (salicílico), protocatecuico, vanílico e siríngico (Figura 6), que têm estrutura comum, C<sub>6</sub> – C<sub>1</sub> e são encontrados em morango, uva, laranja, limão e tangerina (Angelo e Jorge, 2007).

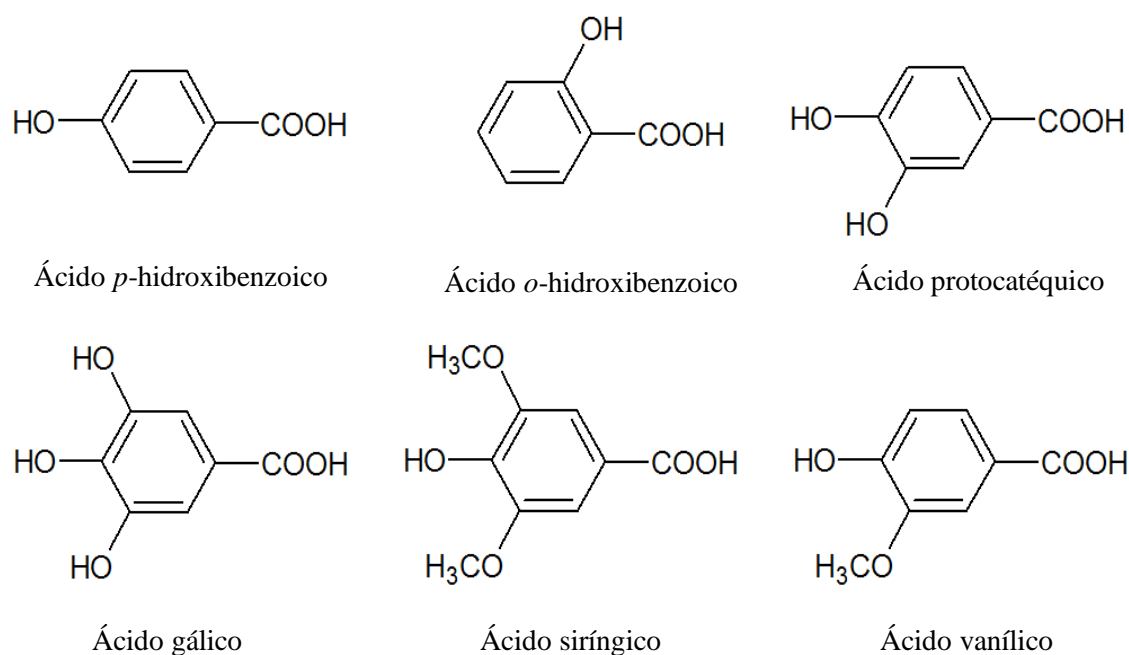


Figura 6. Estruturas de ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico. Fonte: Carvalho et al. (2004).

Os ácidos fenólicos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub>), como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (Figura 7), sendo os mais comuns que estão presentes em alimentos como maçã, pêra, cereja e damasco (Angelo e Jorge, 2007).

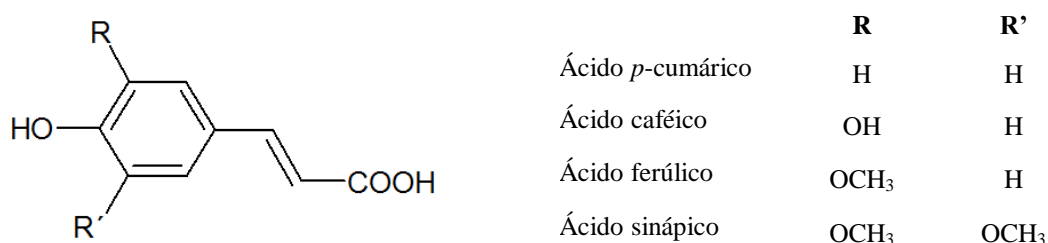


Figura 7. Estruturas de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico. Fonte: Carvalho et al. (2004).

### 3.6.1.1.2. Flavonoides

Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nas plantas, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, isoflavonoides, flavanonas, antocianos e chalconas. Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e especialmente chá preto, que contém sobretudo catequinas em sua composição (Silva et al., 2010). Os flavonoides de origem natural apresentam-se oxigenados ou conjugados com açúcares, chamados de heterosídeos. Quando esta conjugação se liga por intermédio de uma hidroxila denomina-se *O* - heterosídeo e quando a ligação ocorre com um átomo de carbono denomina-se *C* – heterosídeo. Quando o composto encontra-se sem açúcar é chamado de aglicona ou genina, sendo denominado de forma livre (Zuanazzi e Montanha, 2004).

Os flavonoides são compostos com baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, organizados na configuração C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub>. A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anéis A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 8) (Angelo e Jorge, 2007).



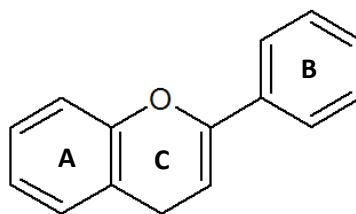


Figura 8. Estrutura básica dos flavonoides. Fonte: Angelo e Jorge (2007).

O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfonação (Angelo e Jorge, 2007).

### 3.6.1.2. Carotenoides

Carotenoides, são tetraterpenoides amplamente distribuídos que compreendem os pigmentos lipossolúveis e são encontrados em todos os tipos de plantas, em bactérias simples e compósitos de flor amarela. Em plantas, carotenoides possuem duas principais funções: como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e como corantes em flores e frutos. Nas flores, aparecem na maior parte como cores amarelas e quando nas frutas, podem igualmente ser laranja ou vermelho (Harborne, 1984).

Esses compostos existentes nos legumes e frutos possuem grande capacidade de fixar oxigênio durante os processos fotoquímicos e agem como antioxidantes exercendo ação preventiva sobre as afecções degenerativas.

Estruturalmente podem ser acíclicos (licopeno) ou possuírem ciclos com 5 ou 6 membros nas extremidades de uma cadeia carbonada ( $\gamma$  e  $\beta$ -caroteno, denominado pró-vitamina A) (Cunha e Roque, 2005d).

Os carotenoides podem ser divididos em dois grandes grupos: (a) carotenos ou carotenoides hidrocarbonetos: compostos apenas de carbono e hidrogênio (ex.  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno e licopeno) e (b) xantofilas: que são derivados oxigenados dos carotenos e contém pelo menos uma função hidroxila, ceto, epóxi, metoxi ou ácido carboxílico (ex. luteína, zeaxantina e astaxantina) (Silva et al., 2010).

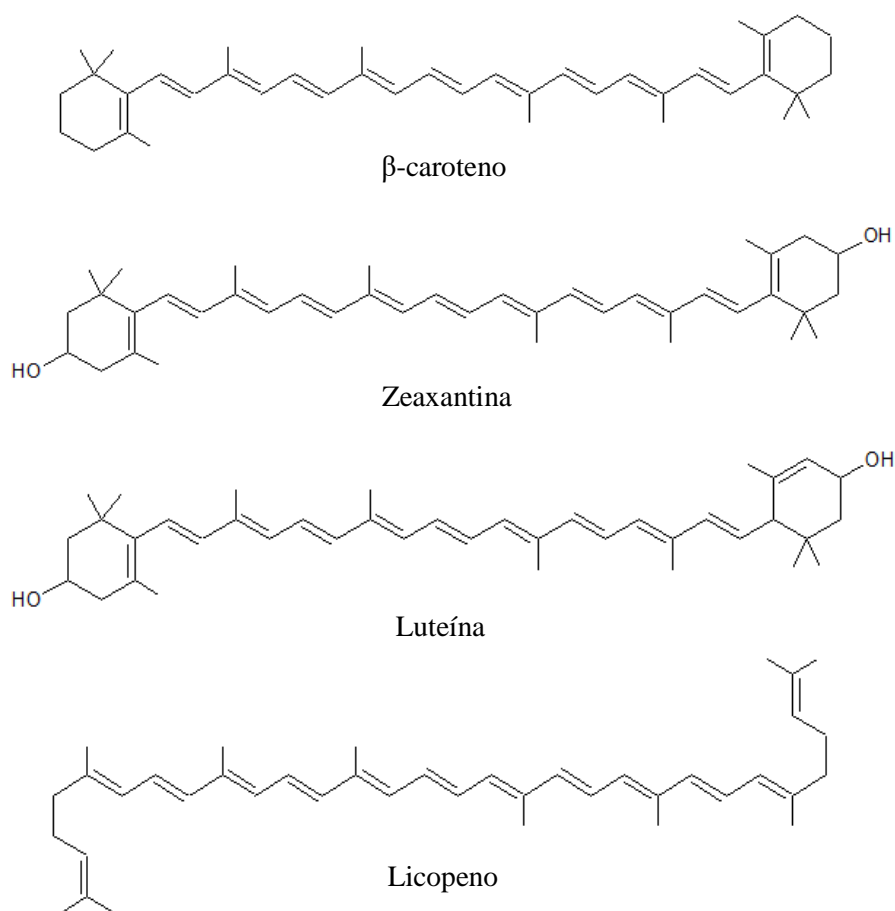


Figura 9. Estruturas de alguns carotenoides encontrados nas plantas. Fonte: Silva et al. (2010).

### 3.6.1.3. Saponinas

As saponinas são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal. Elas agem como uma barreira química ou escudo no sistema de defesa da planta para combater

patógenos e herbívoros. A descoberta de atividades biológicas de saponinas não se limita apenas aos usos tradicionais, mas também em aplicações farmacêuticas. Foram encontradas saponinas possuindo propriedades farmacêuticas de agentes hemolíticos, moluscidas, antiinflamatórios, antifúngicos ou antienvhecimento, antibacterianos ou antimicrobianos, antiparasitários, antitumorais e antivirais (Cheok et al., 2014).

Saponinas são glicosídeos de esteroides ou de triterpenos com elevada massa molecular (600 a 2000) que possuem a característica de reduzir a tensão superficial da água, o que explica a sua ação emulsificante, detergente e a sua elevada toxicidade para os peixes. Estruturalmente possui uma parte lipofílica (esteroides) e outra parte hidrofílica (açúcares). Em modo geral, ocorrem em forma de complexos sendo difíceis em processos de isolamento e elucidação estrutural (Cunha e Roque, 2005c). O comportamento anfifílico e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídios determinam a variedade de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se pela sua ação sobre membranas celulares, alterando a permeabilidade, ou causando sua destruição (Schenkel et al., 2004).

A formação de espumas persistentes durante a extração de plantas ou durante a concentração de extratos de plantas é característico de saponinas. De fato, se grande quantidade de saponina ocorre numa planta, é difícil concentrar com êxito extratos alcoólicos aquosos, mesmo quando se utiliza um evaporador rotativo (Harborne, 1984).

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou ainda, pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. Assim, quanto a aglicona, podem ser classificadas em saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas (Figura 10). O caráter ácido é explicado pela presença de um grupo carboxílico na aglicona e/ou na cadeia de açúcares. O caráter básico deriva da presença de uma amina secundária ou terciária como os glicosídeos nitrogenados esteroidais (Schenkel et al., 2004).

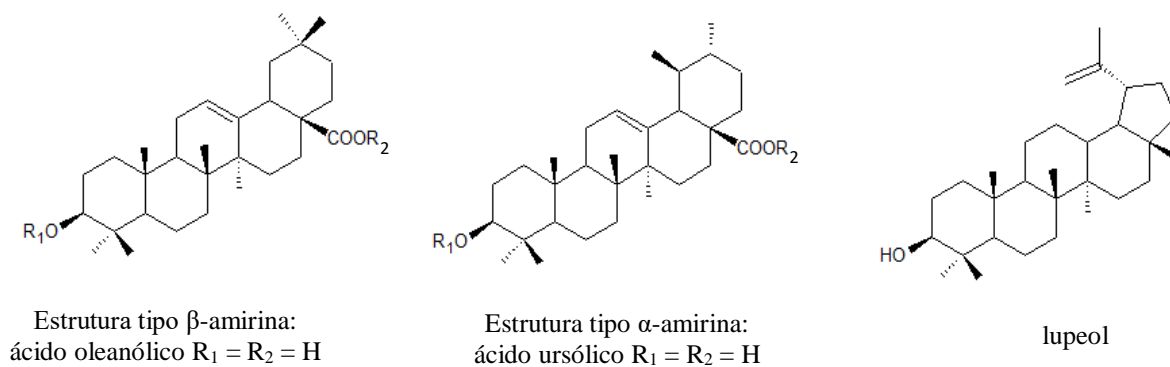


Figura 10. Núcleos mais usuais das saponinas triterpênicas. Fonte: Schenkel et al. (2004).

### 3.7. Família *Caryocaraceae*

*Caryocaraceae* é uma família botânica exclusivamente neotropical, composta por 25 espécies distribuídas entre os gêneros *Caryocar* e *Anthodiscus*, ocorrendo comumente nas Guianas e na Bacia Amazônica (Figura 11). O gênero *Caryocar* ocorre na Amazônia Central enquanto *Anthodiscus* se restringe à parte norte da Amazônia (nas Guianas, Venezuela), à região andina da Venezuela, Colômbia e Peru, e à Mata Atlântica da Bahia (Prance & Silva, 1999).



Figura 11. Mapa de distribuição da família *Caryocaraceae*.  
Fonte: [www.mobot.org](http://www.mobot.org)

O gênero *Caryocar* possui o nome derivado do grego *karyon* (noz) e do latim *caro* (carne), em referência ao fruto carnoso. Esse gênero é constituído por 16 espécies e são muito bem estudados, especialmente porque eles são boas fontes de óleos e madeira, este último sendo

de boa qualidade devido a sua dureza, resistência à umidade e aos ataques de insetos (Prance & Silva, 1999). As sementes e o mesocarpo interno produzem um óleo que se diz ser excelente para cozinhar e usar como um substituto para a manteiga. Devido à riqueza de sua polpa em sabor, vitaminas, óleos e proteínas, o fruto é comumente usado para saborear arroz, frango e doces caseiros. A polpa também é usada para fazer um licor alcoólico e as frutas não adequadas para cozinhar são matérias-primas para fabricação de sabonetes caseiros (Araújo, 1995).

As espécies do gênero *Caryocar* e *Anthodiscus* são listadas no Quadro 2. Em Manaus, três espécies do gênero estão localizadas na Reserva Ducke: *Caryocar glabrum*, *Caryocar villosum* e *Caryocar pallidum* (Prance & Silva, 1999).

<i>Caryocar</i>	<i>Anthodiscus</i>
<i>Caryocar amygdaliferum</i> Mutis	<i>Anthodiscus amazonicus</i> Gleason
<i>Caryocar amygdaliforme</i> G. Don.	<i>Anthodiscus chocoensis</i> Prance
<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.	<i>Anthodiscus fragrans</i> Sleumer
<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	<i>Anthodiscus klugii</i> Standl.
<i>Caryocar costaricense</i> J. D. Smith	<i>Anthodiscus montanus</i> Gleason
<i>Caryocar cuneatum</i> Wittm.	<i>Anthodiscus obovatus</i> Benth.
<i>Caryocar dentatum</i> Gleason	<i>Anthodiscus peruanus</i> Baill.
<i>Caryocar edule</i> Casar	<i>Anthodiscus pilosus</i> Ducke
<i>Caryocar glabrum</i> (Aubl.) Pers	<i>Anthodiscus trifolius</i> G. Mey.
<i>Caryocar gracile</i> Wittm	
<i>Caryocar harlingii</i> Prance	
<i>Caryocar microcarpum</i> Ducke	
<i>Caryocar montanum</i> Prance	
<i>Caryocar nuciferum</i> L	
<i>Caryocar pallidum</i> A. C. Smith	
<i>Caryocar villosum</i> Pers.	

Quadro 2. Espécies dos gêneros *Caryocar* e *Anthodiscus*. Fonte: Ascari et al. (2013).

Na literatura existem vários trabalhos com as espécies do gênero *Caryocar* visando o estudo químico e biológico. A seguir, são citadas algumas dessas referências.

Os frutos do gênero *Caryocar* são considerados fontes de óleos vegetais pois possuem alta concentração de lipídeos. Os trabalhos de Costa e colaboradores (2011) com óleo da polpa de *Caryocar coriaceum* mostraram a composição de ácidos predominantes na fração lipídica

como oleico, palmítico, heptadecenóico, linoleico e esteárico. O ácido oleico, encontrado em vários óleos e muito predominante na composição lipídica das espécies de *Caryocar*, mostrou uma atividade anticâncer interessante, demonstrado por si só ou combinado com trastuzumab, anticorpos monoclonais utilizados no tratamento contra linhas celulares do câncer de mama. Ensaio antibacterianos *in vitro* demonstraram que o óleo de polpa de *C. coriaceum* pode atuar como um inibidor do crescimento contra quase todas as bactérias testadas, com exceção de *K. pneumonia* e *E. coli*. Os melhores resultados foram obtidos contra *S. choleraesuis* e *S. aureus*, com halos de inibição de 15 e 13 mm, respectivamente, o primeiro também representando a menor percentagem para concentração inibitória mínima (CIM) com 1,25%.

Estudos realizados por Araruna e colaboradores (2013) descrevem a composição e identificação química de compostos fenólicos de extrato hidroalcoólico (EH) e fração metanólica (FM) das folhas de *Caryocar coriaceum* e avaliação das atividades antimicrobianas e modulatórias. A análise qualitativa revela a presença de classes de metabólitos como taninos hidrolisáveis e pirogálicos, compostos fenólicos e flavonoides (flavonas, flavonóis e xantonas). A quantificação dos compostos fenólicos por CLAE-DAD demonstrou a presença de ácido gálico (EH:  $19.0 \pm 0.15$  mg/g, FM:  $11.2 \pm 0.34$  mg/g), ácido clorogênico (EH:  $31.4 \pm 0.26$  mg/g, FM:  $56.8 \pm 0.16$  mg/g), ácido cafeico (EH:  $18.7 \pm 1.02$  mg/g, FM:  $7.5 \pm 0.09$  mg/g), rutina (EH:  $68.1 \pm 0.04$  mg/g, FM:  $32.5 \pm 0.05$  mg/g) e quercetina (EH:  $26.9 \pm 0.17$  mg/g, FM:  $18.5 \pm 0.03$  mg/g). As amostras demonstraram uma CIM  $\geq 1024$   $\mu$ g/mL contra todas as cepas bacterianas e fúngicas, não demonstrando atividade antimicrobiana clinicamente relevante. Contudo, o extrato e a fração mostraram um efeito modulador antibiótico quando combinados com os aminoglicósídeos utilizados.

Macedo et al. (2011) relata em seus estudos a caracterização química da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) mostrando a seguinte composição nutricional: 27,70% de amido, 21,38% de proteínas, 19,70% de fibras, 3,82% de cinzas, 3,60% de lipídeos e 16,97% de

umidade. Enquanto na amêndoa contém principalmente proteínas (64,41%) e umidade (16,50%).

Pesquisas sobre os constituintes voláteis de pequi (*Caryocar brasiliense*) por Maia et al. (2008), reportaram uma mistura de ésteres carboxílicos, ácidos graxos saturados, hidrocarbonetos e terpenos de cadeia longa saturada. Os componentes essenciais para o aroma do pequi são: o hexanoato de etila (52,9%), octanoato de etila (4,6%), álcool tetra-hidrofurfurílico (4,3%), butanoato de etila (4,1%), palmitato de butila (3,7%), estearato de isobutila (2,6%) e ácido 3-metilvalérico (2,6%).

Em estudos realizados por Bezerra et al. (2002), o extrato etanólico bruto a partir de cascas e folhas da árvore de *Caryocar brasiliense* apresentou atividade tóxica contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, o agente causador da esquistossomose. Na concentração de 100 ppm, de ambos os extratos etanólicos de cascas e folhas apresentaram elevada toxicidade contra *B. glabrata*, atingindo 90% de mortalidade após 48 horas. A uma concentração mais baixa (50 ppm), observou-se uma diminuição drástica da toxicidade de folhas, apresentando 20% de mortalidade e os extratos de cascas mataram apenas 10% dos parasitas ao fim de 48 horas.

Em outros estudos, os extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. brasiliense* foram testados contra promastigotas de *L. amazonenses*, algumas bactérias patogênicas e espécies de fungos e, também foi investigada a atividade antioxidante. Os extratos inibiram a proliferação de forma promastigotas de *L. amazonenses*, apresentando um efeito significativamente superior para o efeito mostrado por glucantime (antimoniato de meglumina), um medicamento utilizado para tratamento de leishmaniose. A melhor atividade bactericida foi observada contra a *Pseudomonas aeruginosa* ( $1,5 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ ) e *Staphylococcus aureus* ( $2,0 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ ). A atividade antioxidante do extrato apresentou bons resultados, os valores na concentração de 1,0

mg/mL foram muito próximos dos apresentados pela vitamina C e rutina, considerados ótimos antioxidantes (Paula-Junior et al., 2006).

As folhas de *Caryocar microcarpum* apresentaram atividade repelente/toxicidade contra formigas cortantes conhecidas por causar danos extensivos às culturas tropicais. Essas folhas também são usadas pelos índios do noroeste da Amazônia como veneno de peixe. Esta aplicação está relacionada à presença de taninos e saponinas nesta parte da planta (Kawanishi & Raffauf, 1986).

### 3.8. Piquiá (*Caryocar villosum*)

*Caryocar villosum* é uma espécie nativa da Região Amazônica, comumente conhecido como piquiá, uma palavra indígena originária do tupi que significa “casca espinhosa”. Possui como sinônimas: *Caryocar butyrosom* (Aubl.) Willd., *Caryocar villosum* var. *aesculifolium* Wittm., *Caryocar villosum* var. *macrophyllum* Wittm., *Pekea butyrosa* Aubl. e *Pekea villosa* (Aubl.) Poir (Rabelo, 2012).

É uma árvore que não tolera sombra, não se regenera facilmente na sombra, mas em pleno sol cresce rapidamente, o que é comum entre as árvores emergentes. Sua polinização é feita por morcegos. De acordo com Shanley e Medina (2005), um piquiazeiro não produz frutos todos os anos. Algumas árvores “descansam” em um ano e produzem no outro, produção bienal. Em Manaus e Belém, a floração ocorre durante julho a novembro e a frutificação ocorre 6 a 8 meses depois, nos meses de março a maio (Clement, 2000).

A espécie possui ocorrência na Amazônia brasileira e Guiana Francesa, sobretudo em florestas de terra firme, sobre solos argilosos bem drenados em ecossistemas de platô e vertente. As árvores de *Caryocar villosum* são de grande porte atingindo 40 a 50 m de altura. Possuem caule cilíndrico, sendo alongado em florestas fechadas e curtos em áreas de insolação intensa. A copa da árvore possui ramificações espalhadas com folhagens abundantes e agrupadas no



ápice dos ramos. As flores são amarelas, bissexuais, actinomorfas, estames numerosos, conados na base formando um anel, anteras rimosas (Rabelo, 2012 e Prance & Silva, 1999).



Figura 12. Árvore, folha e fruto da espécie *Caryocar villosum*. Fonte: Maciel, K. M.

Segundo Shanley et al. (1998), quando as folhas do topo da árvore estão verdes, os frutos ainda não estão maduros. O fruto cai da árvore quando maduro, devendo ser coletado diretamente do chão e ser processado rapidamente para evitar rancidez, devido ao seu alto conteúdo em óleo.

Seus frutos são comestíveis, elipsóide a oblongo-globosa, com endocarpo lenhoso, frequentemente com espinhos proeminentes (Prance & Silva, 1999). Possuem o formato quase redondo, do tamanho em média de uma laranja constituído por 1 a 3 bagas reunidas sob a mesma casca parda, carnuda, espessa e muito rica em taninos. A casca adere fortemente às bagas, mas quando amadurecem soltam-se facilmente. Essas bagas são constituídas por um caroço muito maduro recoberto por uma camada de 3 a 5 mm de espessura com uma polpa amarela muito doce e perfumada, o endocarpo, constituído por uma grande quantidade de espinhos finos e duros (Pesce, 2009). Essas características do fruto podem ser observadas na Figura 13.

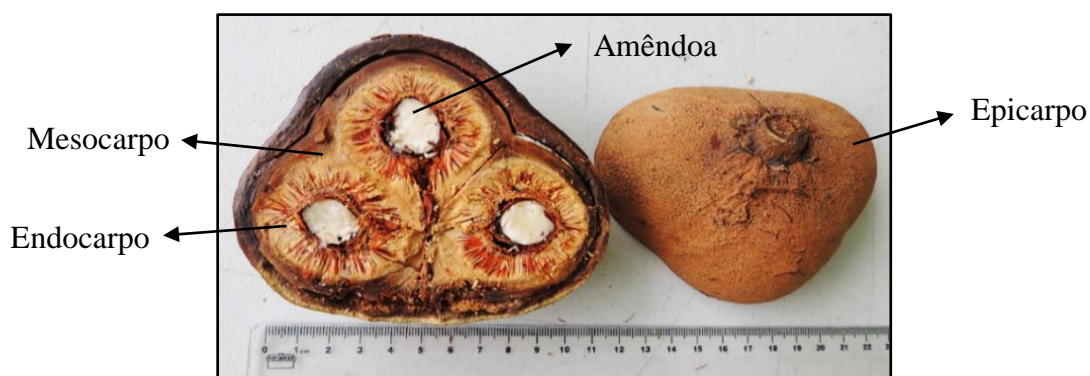


Figura 13. Fruto piquiá inteiro e suas partes internas. Fonte: Maciel, K. M.

O piquiá quando fresco possui o peso médio de 280 g, composto por 65% de casca fina e cor cinza amarronzada (epicarpo), 11% de uma polpa amarela moderadamente grossa (0,5 a 2 cm) oleosa e densa (mesocarpo) e 24% de uma semente dura e espinhosa, contendo espinhos curtos (0,5 a 1,5 cm) localizados na camada interna envolvendo a castanha (Clement, 2000).

A polpa tem 72% de óleo, 3% de proteína, 14% de fibras e 11% de outros carboidratos. A amêndoa descascada contém 70,4% de óleo (16,7% do caroço); óleo branco e meio sólido (Pesce, 2009). O piquiá é uma excelente fonte de calorias e energia. Os animais que comem as flores também aproveitam os nutrientes do piquiá. As flores são compostas de 71% de carboidratos, 8% de proteínas e 3% de gorduras (Shanley & Medina, 2005).

O piquiá tem diversos usos, dentre eles: alimento humano, cosmético, curtume, saboaria, medicinal, tinturaria e outros que são citados no quadro 3.

Parte da planta	Utilidades
Flores	Atração odorífera para animais de caça.
Madeira	Matéria-prima para construções navais e civis.
Óleo	Alimentação: Fritura de peixes. Cosméticos: fabricação de cremes faciais.
Casca do fruto	Preparação de tinta para escrever e tingir.
Polpa do fruto	Alimentação: consumida cozida com água e sal e preparo de licor.
Amêndoa	Alimentação: Cortada e consumida pela população.

Quadro 3. Utilidades de algumas partes da árvore e do fruto de piquiá. Fonte: Shanley & Medina (2005) e Sukanuma e Viana (2011).

Na medicina, o fruto piquiá é usado como antiinflamatório e contra afecções no fígado. É uma espécie que contém alto conteúdo de vitamina A e compostos fenólicos e flavonoides totais, possuindo um grande potencial antioxidante o que ajuda a prevenir e curar desordens dos órgãos (Sukanuma e Viana, 2011).

Estudos biológicos incluíram efeitos antigenotóxicos, capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, propriedades antifúngicas contra fungos cutâneos e atividade antiinflamatória *in vivo* tópica. Em geral, o perfil químico do piquiá apresenta altos níveis de compostos bioativos e possui forte potencial biotecnológico para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas.

### 3.9. Estudos químicos e biológicos de *Caryocar villosum*

Um estudo realizado por Marx e colaboradores (1997) relataram a composição química da polpa do fruto piquiá (*Caryocar villosum*), mostrando baixo teor de água e um elevado teor de lipídeos na matéria seca, composto majoritariamente pelos ácidos palmítico (33,50 g/100 g) e oleico (29,50 g/100 g) (Figura 14). Além desses, foram relatados a presença de outros compostos quantificados como os carboidratos: glucose (0,92 g/100 g), sacarose (0,79 g/100 g) e frutose (0,26 g/100 g); os minerais: cálcio (83,00 g/100 g), magnésio (52,00 g/100

g), fósforo (41,00 g/100 g), selênio (0,70 g/100 g); os esteroides: 7,25-stigmastadienol (195,75 mg/100 g),  $\beta$ -sitosterol (129,70 mg/100 g) e stigmasterol (80,20 mg/100 g); aminoácidos livres: asparagina (18,16 mg/100 g), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (17,84 mg/100 g) e alanina (17,20 mg/100 g), e alguns compostos voláteis como o (*E*)-nerolidol (19,75 mg/100 g), 2-heptanona (19,30 mg/100 g),  $\beta$ -bisaboleno (18,7 mg/100 g) e furfural (14,62 mg/100 g).

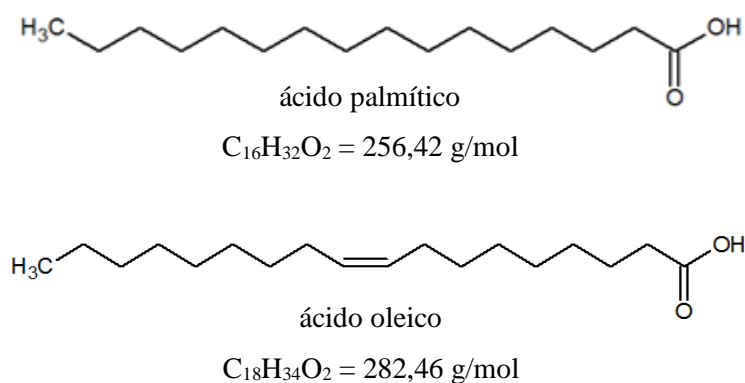


Figura 14. Estruturas químicas dos ácidos majoritários presentes na polpa de piquiá. Fonte: Marx et al. (1997).

O isolamento, elucidação estrutural de saponinas triterpênicas e toxicidade dos extratos metanólicos de cascas e polpas de piquiá coletadas em Belém foram estudados por Magid et al. (2006a). As análises por CLAE analítico mostraram que os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos de cascas e polpas são qualitativamente semelhantes, mas quantitativamente diferentes, com quantidades elevadas de cariocarosídeos presentes na polpa, como (1) éster 3-*O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D- glucopiranosiduronato metil -2 $\beta$ - ácido hidroxioleanólico -28-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil (cariocarosídeo IV-10), (2) éster 3-*O*- $\beta$ -D-xilopiranosil- (1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D- galactopiranosil- (1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-glucuronopiranosil-2 $\beta$ - ácido hidroxioleanólico - 28-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil (cariocarosídeo IV-17), (3) éster 3-*O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-glucuronopiranosil-2 $\beta$ - ácido hidroxioleanólico-28-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil (cariocarosídeo IV-9) (Figura 15), entre outros.

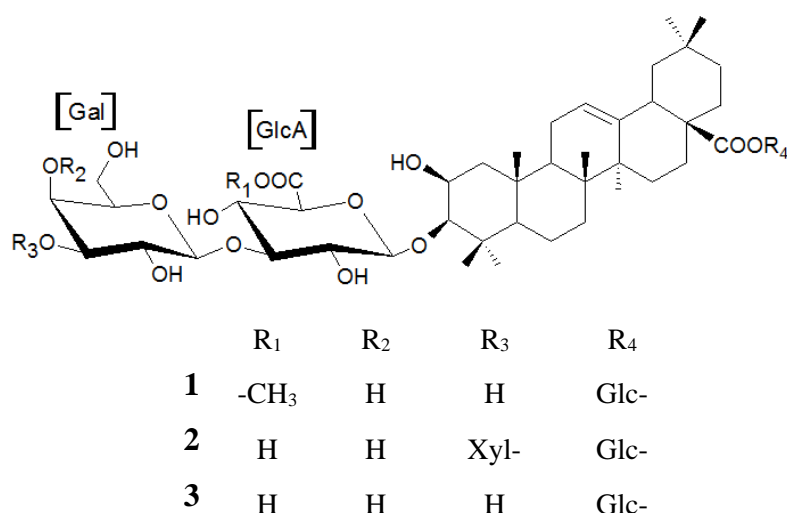


Figura 15. Estruturas de cariocarosídeos encontrados no extrato metanólico de polpa de piquiá. Fonte: Magid et al. (2006a).

Neste mesmo trabalho, os extratos metanólicos de cascas foram submetidos a colunas cromatográficas utilizando gel de sílica normal e em fase reversa, e cromatografia de CLAE semi-preparativo para obtenção de uma fração rica em saponinas. Esse procedimento conduziu ao isolamento de 24 saponinas triterpênicas, sendo identificadas 10 saponinas já conhecidas e 14 novos cariocarosídeos, agliconas como hederageninas (4), baiogeninas (5) (Figura 16). A identificação de ácido oleanólico, hederageninas e baiogeninas por CCD foi eluída em CHCl<sub>3</sub>: MeOH (98:2). Nos testes de toxicidade, os extratos metanólicos de polpa e cascas foram avaliados no ensaio com crustáceo salina (*Artemia salina*) e os dois extratos apresentaram boa atividade. A polpa com CL<sub>50</sub> de 100 µg/mL foi mais tóxica que o extrato da casca (500 µg/mL). A fração de saponina da casca mostrou 17% de morte em uma concentração de 10 µg/mL e também foi mais ativa que os extratos em metanol. Esta toxicidade revela os frutos como potenciais agentes pesticidas e antitumorais e explica o uso tradicional como veneno de peixe. No teste antimicrobiano pelo método de difusão em ágar, os compostos não inibiram o crescimento das bactérias numa concentração de 50 µg contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Enterococcus faecalis* (Magid et al., 2006a).

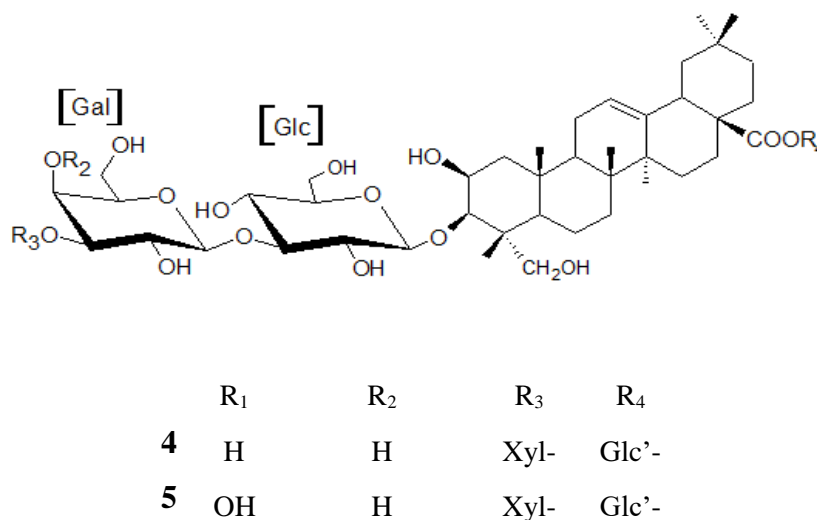


Figura 16. Estruturas de agliconas hederageninas (6) e baiogeninas (7) encontradas na fração do extrato metanólico de cascas de piquiá. Fonte: Magid et al. (2006a).

Em outro trabalho realizado pelo mesmo grupo com os mesmos processos de isolamento foram identificadas sete saponinas do extrato metanólico da casca do caule de piquiá, sendo cinco novos compostos e dois já conhecidos (Figura 17). A fração de saponina oriunda do extrato metanólico da casca do caule de *C. villosum* foi purificada usando uma combinação de cromatografia em coluna sobre gel de sílica e RP-18 com eluição gradiente  $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$  (95:5:0 – 60:40:7), e finalmente por CLAE semi-preparativo. E após hidrólise ácida desta fração foram produzidas dois agliconas identificadas como hederageninas e baiogeninas por cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa com amostras padrões e confirmação estrutural por análises nos espectros de RMN uni e bidimensional. Também reportaram a avaliação da atividade lipolítica *ex vivo* usando um explante do tecido adiposo humano, a inibição da atividade DOPA-oxidase de duas saponinas (2 e 3) mas não houve observação da atividade lipolítica numa dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  e nem observação de qualquer inibição da atividade da DOPA-oxidase numa dose de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Porém, os dois compostos

exibiram atividade citotóxica moderada *in vitro* contra células de queratinócitos humanos com uma  $CL_{50}$  de 23 (2) e 20,9  $\mu\text{M}$  (3) (Magid et al., 2006b.)

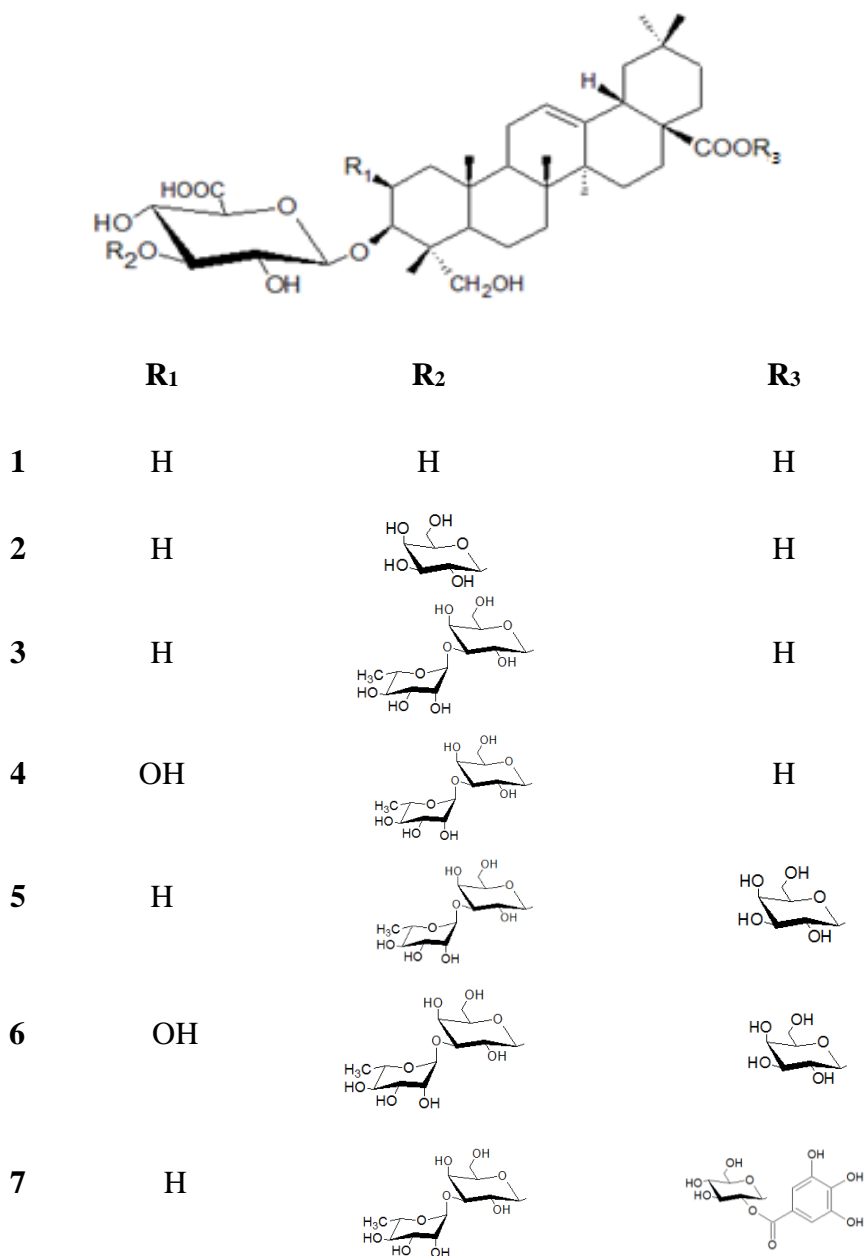


Figura 17. Estruturas químicas de saponinas triterpênicas encontradas na casca do caule de piquiá.  
Fonte: Magid et al. (2006b).

Estudos realizados por Magid et al. (2008) relataram o isolamento de sete novos glicosídeos fenólicos das cascas do caule de *Caryocar glabrum* e *Caryocar villosum*. O extrato metanólico de casca de caule de *C. villosum* foi submetido a uma separação cromatográfica em uma coluna cromatográfica líquida a vácuo (CLV) em RP-18 eluída com MeOH - H<sub>2</sub>O (4:6,

6:4, 8:2 e 10:0). Uma das frações obtidas foi submetida a CC sucessivas em gel de sílica eluída com  $\text{CHCl}_3$  contendo quantidades crescentes de MeOH e as frações eluídas com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (8:2 e 7:3) foram então purificadas por CLAE semi-preparativa levando ao isolamento de dois glicosídeos fenólicos: (1) ácido 3-*O*-metil-4'-(3''-*O*-acetil)- $\alpha$ -*L*-ramnopiranosil elágico e (2) ácido 3-*O*-metil-4'-(4''-*O*-acetil)- $\alpha$ -*L*-ramnopiranosil elágico (Figura 18). A identificação pôde ser confirmada pela combinação dos dados dos espectros de EM e RMN.

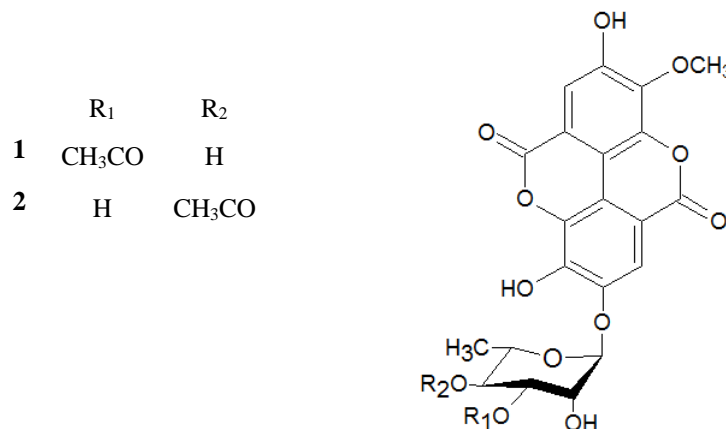


Figura 18. Estruturas de glicosídeos fenólicos encontrados nas frações do extrato metanólico de cascas de caule de piquiá. Fonte: Magid et al. (2008).

A identificação de fenólicos glicosilados e saponinas triterpênicas (açúcares como ramnose e glucose) em extratos metanólicos de piquiá foi analisada em comparação com padrões por CCD eluídos em  $\text{MeCOEt}$ -*i*- $\text{PrOH}$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ - $\text{H}_2\text{O}$  (20:10:7:6) e revelados por aquecimento e borrifação com 50% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Magid et al., 2006a; Magid et al., 2008).

Estudos realizados por Chisté e Mercadante (2012) visaram a identificação e quantificação de compostos fenólicos e carotenoides da polpa de piquiá (*Caryocar villosum*) por CLAE-DAD-EM/EM, usando um espectrômetro de massas com analisador do tipo *ion-trap*. Os fenólicos foram analisados usando a fonte de ionização ESI operando no modo positivo e negativo, faixa de  $m/z$  100 a 800 Da. Enquanto os carotenoides foram analisados usando a fonte APCI operando no modo positivo, faixa de  $m/z$  100 a 700 Da.

Adicionalmente, Chisté e Mercadante (2012) realizaram a composição aproximada e a capacidade de sequestro do radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) da polpa do fruto. Na composição



proximal, a polpa apresentou 51,7% ( $\pm 0,4$ ) de umidade, 25,5% ( $\pm 0,75$ ) de lipídios, 18,0% ( $\pm 0,9$ ) de carboidratos, 3,7% ( $\pm 0,9$ ) de proteínas e 1,1% ( $\pm 0,01$ ) de cinzas. A capacidade antioxidante da polpa de *C. villosum*, pelo método ORAC, foi de  $3,74 \pm 1,09$  mmol Trolox/100 g, valor alto em relação ao valor médio reportado para 41 frutos diferentes (2,7 mmol Trolox/100 g).

Nas análises por CLAE-DAD-EM/EM, os compostos fenólicos foram separados utilizando uma coluna Hydro Synergi C<sub>18</sub> em eluição gradiente com água/ácido fórmico (99,5:0,5) e acetonitrila/ácido fórmico (99,5:0,5) de 99:1 para 50:50 em 50 minutos seguindo para 1:99 em 5 minutos com fluxo de 0,9 ml/min. Foi relatado a presença de 17 compostos fenólicos na polpa, sendo majoritariamente ácido gálico (182  $\mu\text{g/g}$  polpa), ácido elágico ramnosídeo (107,0  $\mu\text{g/g}$  polpa) (Figura 19) e ácido elágico (104,0  $\mu\text{g/g}$  polpa).

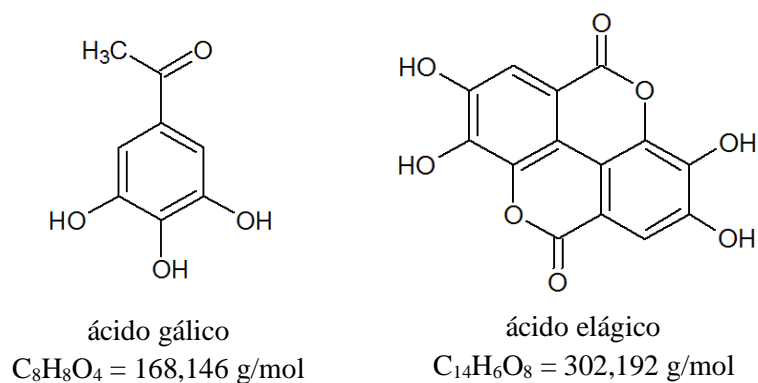


Figura 19. Estruturas químicas de compostos fenólicos da polpa de piquiá. Fonte: Chisté e Mercadante, 2012.

Para a separação dos carotenoides foi utilizada uma coluna C<sub>30</sub> YMC, fluxo de 0,9 mL/min em eluição gradiente de metanol/éter metil-tert-butílico de 95:5 para 70:30 em 30 minutos seguindo para 50:50 em 20 minutos. Foram identificados e quantificados 12 carotenoides presentes na polpa, composto majoritariamente por *trans*-anteraxantina (3,4  $\mu\text{g/g}$  polpa), *trans*-zeaxantina (2,9  $\mu\text{g/g}$  polpa) e luteína (2,8  $\mu\text{g/g}$  polpa) (Figura 20) (Chisté e Mercadante, 2012).

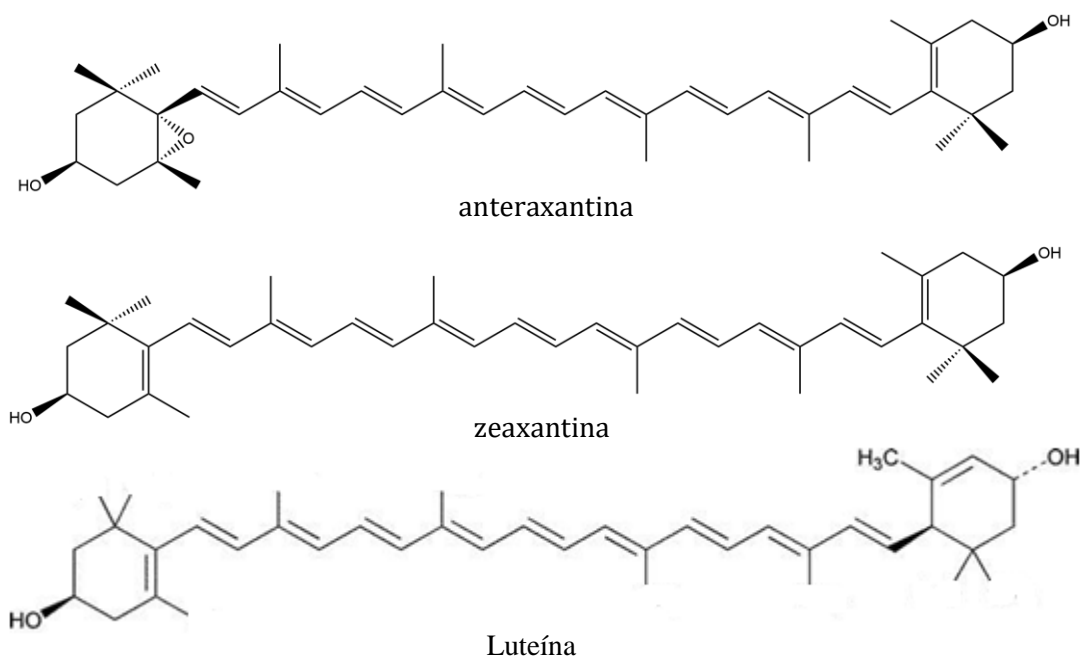


Figura 20. Estruturas químicas de carotenoides encontrados na polpa de piquiá. Fonte: Chisté e Mercadante, 2012.

Almeida e colaboradores (2012) descreveram os efeitos de genotoxicidade e antigenotoxicidade da polpa de piquiá nas células hepáticas, renais e cardíacas de ratos e em adição, o estudo fitoquímico da polpa liofilizada. Compostos fenólicos, carotenoides e ácido ascórbico dos extratos hidroalcoólicos da polpa de piquiá foram separados por CLAE-DAD em uma coluna  $C_{18}$  Synergi Hydro usando um gradiente linear de água: ácido fórmico (99,5: 0,5) e acetonitrila: ácido fórmico (99,5: 0,5) como fase móvel e os cromatogramas foram processados a 217 nm. O ácido ascórbico foi quantificado por CLAE-DAD após separação em uma coluna cromatográfica  $C_{18}$  Slim-pack com fase móvel em eluição isocrática contendo ácido sulfúrico. Os principais compostos químicos encontrados e suas respectivas porcentagens são mostrados na Tabela 1. Os resultados demonstraram uma resposta inversa dose-dose da polpa piquiá, ou seja, a menor dose de piquiá causou a maior diminuição no dano ao DNA e a maior dose causou a menor diminuição. Em suma, a polpa de piquiá não foi genotóxica e inibiu a genotoxicidade induzida pelo DXR (agente antitumoral) mas alguns dos efeitos protetores observados dependeram das doses e condições experimentais e afirmaram que ainda são

necessárias mais investigações para esclarecer se a polpa piquiá afeta positivamente a saúde humana.

Classes de substâncias	Concentração (mg/100 g)	Compostos químicos (%)
Compostos fenólicos totais	236.2 ± 6.9	ácido gálico (31%)
		ácido elágico ramnosídeo (18%)
		ácido elágico (17 %)
		glucosídeo monogaloil (4%)
		glucosídeo hexahidrodidifenol (3.5%)
		ácido elágico glucosídeo (3%)
		diglucosídeo quercetina metil (1%)
Carotenoides totais	6.9 ± 0.2	ácido quínico cumarila (1%)
		anteraxantina(27%)
		carotenoide não identificado (22%)
		zeaxantina (19%)
		neoxantina (9%)
		violaxantina (6%)
		β-caroteno (4%)
Luteína (3%)		
Tocoferóis	1.2 ± 0.1	α - tocoferol (100%)

Tabela 1. Compostos químicos encontrados na polpa de piquiá liofilizada. Fonte: Almeida et al., 2012.

Os estudos realizados por Yamaguchi (2015) abordam a caracterização de compostos fenólicos e atividades biológicas de frutos amazônicos. Dentre os frutos, os extratos de piquiá destacaram-se pelos excelentes resultados: os extratos etanólicos de cascas apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos do que encontradas em polpas de outras frutas consumidas pela população como a banana e a goiaba, enquanto que nos extratos hidroalcoólicos de cascas houve maior predominância de compostos flavonoídicos; a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH e ABTS, o extrato etanólico de cascas demonstrou alta capacidade de sequestro de radicais livres ( $CS_{50}$ ) com concentrações muito próximas ao do padrão quercetina; no método de descoloramento de β-caroteno apresentou inibição maior que as outras amostras; e também apresentaram bons resultados na atividade antioxidante em células e na capacidade fotoprotetora. Nos ensaios de atividade antimicrobiana,

os extratos de cascas e polpas de piquiá apresentaram valores próximos (19 e 20 mm) ao do padrão (23 mm) para inibição da bactéria *Enterobacter cloacae*. Os extratos hidroalcoólicos (35,15%) e etanólicos (30,60%) de casca de piquiá apresentaram maiores percentagens de inibição da enzima tirosinase.

Bastos (2015) relata em seu trabalho a avaliação da atividade antimicrobiana de 25 espécies de plantas da Região Amazônica, incluindo os extratos etanólicos e hidroalcoólicos de piquiá obtidos no projeto de Yamaguchi (2015), que apresentaram excelentes resultados frente a 14 bactérias, sendo 7 bactérias Gram-positivas e 7 Gram-negativas e *C. albicans*, mostrando que os extratos de piquiá são fontes promissoras de substâncias bioativas.

A caracterização de compostos fenólicos por CLAE-DAD, avaliação da atividade antioxidante e potenciais citotóxico e antiinflamatório dos extratos hidroalcoólicos de cascas, sementes e polpas de piquiá foram estudados por Yamaguchi e colaboradores (2017). Os extratos de casca apresentaram alto teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, assim como os melhores resultados para capacidade de eliminação de radicais livres em modelos ABTS ( $CI_{50}$ :  $3,93 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ ) e DPPH ( $CI_{50}$ :  $7,81 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$ ) e também alto potencial anti-inflamatório pois apresentou alta inibição (quase 100%) de óxido nítrico em baixas concentrações ( $C= 12,5 \mu\text{g/mL}$ ). Em análises de citotoxicidade, os mesmos extratos foram avaliados contra células tumorais humanas (SKMELL19, MCF-7 e HCT116) e não-tumoral (MCR-5) e apresentaram baixa citotoxicidade em linhas celulares humanas ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ) mas alta em cepas tumorais, na concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$  todas as linhas celulares apresentaram mais de 50% de citotoxicidade.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

---

### **4.1. Coleta e processamento do material vegetal**

A coleta dos frutos da espécie *Caryocar villosum* foi realizada no dia 12 de março de 2016 na Reserva Florestal Ducke, localizada em Manaus, estado do Amazonas. Um total de 8 frutos foram coletados diretamente da árvore fichada sob o n. 587, no período da tarde.

O material botânico foi armazenado em sacos de fibra e transportado ao Laboratório de Produtos Naturais da UFAM. Os frutos foram higienizados e depois cada parte do fruto foi separada manualmente (cascas, polpas e sementes). As polpas foram armazenadas na geladeira. As partes residuais, cascas e sementes foram secas em estufa com circulação e renovação de ar a 50 °C no Laboratório de Bioenergia – Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), posteriormente as cascas foram processadas em um liquidificador e as sementes trituradas em moinho de seis facas e os mesmos foram armazenados para obtenção dos extratos.

### **4.2. Preparação dos extratos**

Após processamento do material vegetal, obteve-se 829 g de sementes e 200 g de cascas de piquiá. As mesmas foram submetidas à extração por maceração na corneta do extrator Soxhlet e em seguida pelo extrator Soxhlet em dois métodos de extração: uma extração única com o solvente etanol (método 1) e, comparativamente, uma extração sequenciada com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) (método 2). Foram realizadas um total de 7 extrações, nas quais as quantidades em massa do material processado e os volumes dos solventes utilizados em cada extração são apresentados na Tabela 2.

	Nº de extração	Parte do fruto	Massa (g)	Volume (mL)
<b>Método 1</b>	1	cascas	100	400
	2	sementes	170	600
	3		200	625
	4		89	324
<b>Método 2</b>	5	cascas	100	400
	6	sementes	170	600
	7		200	600

Tabela 2. Dados de massas e volumes utilizados em cada extração.

Na noite anterior à extração em Soxhlet o material foi colocado em um recipiente poroso (papel filtro) e imerso no solvente por aproximadamente 14 horas dentro da corneta do sistema e no dia seguinte foi extraído em Soxhlet por 8 horas. O sistema do extrator montado é mostrado na Figura 21. Os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50 °C e após completa secagem calculou-se o rendimento e, em seguida, foi retirada uma quantidade dos extratos (35 mg) para a realização dos testes biológicos, para avaliação do extrato mais promissor para posterior estudo fitoquímico.



Figura 21. Sistema do extrator Soxhlet.

Para fins comparativos, também realizou-se a extração do material vegetal da mesma espécie, já armazenado na geladeira de um projeto anterior do grupo Q-biomA (Yamaguchi, 2015). A extração foi realizada em maceração e no dia seguinte em Soxhlet com etanol por 8 horas, as massas e volumes do solvente estão apresentados na Tabela 3.

	<b>Método 1</b>		
	Nº extrações	Massa (g)	Volume (mL)
<b>Cascas (848 g)</b>	1	300	650
	2	330	700
	3	248	650
<b>Sementes (658 g)</b>	4	190	600
	5	200	625
	6	168	324
	7	100	550

Tabela 3. Dados de massas e volumes utilizados nas extrações do material vegetal armazenado na geladeira.

#### 4.3. Partição líquido-líquido dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos de cascas e sementes de piquiá foram submetidos à partição líquido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em um funil de separação. A amostra foi solubilizada em metanol e água na proporção de 8:2. As partições foram realizadas com 30 mL de cada solvente, em ordem crescente de polaridade. Após agitação e liberação da pressão, os solventes menos densos, hexano e acetato de etila foram retirados com o uso de pipeta de Pasteur e os solventes mais densos, diclorometano e metanol/água, foram retirados pela torneira do funil. Em seguida, cada fração foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50 °C e secos em temperatura ambiente e depois armazenadas no freezer. Foram particionados 10 gramas dos extratos etanólicos de cascas e 41 gramas dos extratos etanólicos de sementes. Retirou-se uma quantidade de cada fração (35 mg) para a realização dos testes biológicos.

#### **4.4. Codificação dos extratos e frações**

Os códigos dos extratos são iniciados com “E”, seguido do solvente utilizado na extração, etanol: “E”, hexano: “H”, acetato de etila: “A” e metanol: “M”. Seguido da parte dos resíduos utilizada, cascas: “C” e sementes “S”. E por último terminam com a letra “P” referindo-se ao fruto piquiá.

Os códigos das frações iniciam com “F” seguido do solvente utilizado na partição, hexano: “H”, diclorometano “D”, acetato de etila: “A” e metanol: “M. Seguido da parte dos resíduos utilizada, cascas: “C” e sementes “S”. E por último terminam com a letra “P” referindo-se ao fruto piquiá.

#### **4.5. Análise cromatográfica das substâncias bioativas**

##### **4.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

As análises das amostras em CCD foram realizadas utilizando placas cromatográficas de fase normal de gel de sílica (TLC sílica gel G60, ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel, 20 x 20 cm) e/ou fase reversa (TLC Sílica gel C18, ALUGRAM<sup>®</sup> RP18W/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel, 20 x 20 cm) dependendo do perfil de cada amostra. As placas de CCD foram cortadas dependendo do número de aplicações e foram marcadas a aproximadamente 0,6 cm da base inferior da placa e 0,4 cm na base superior. Para limpeza das placas, as mesmas foram eluídas em metanol, ativadas na estufa por uma hora a 100 °C e, por fim, eluídas em metanol novamente. A amostra foi aplicada em forma de banda na base inferior da placa e após saturação da cuba cromatográfica com papel filtro, contendo a fase móvel adequada, a placa foi introduzida na cuba.

Para cada amostra selecionou-se o melhor sistema de eluição visando melhor separação dos constituintes químicos. A visualização do cromatograma foi realizada por exposição à luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm e utilizando



reveladores como vanilina sulfúrica, cloreto férrico, sulfato cérico e outros necessários para revelação das bandas cromatográficas.

#### **4.5.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)**

As análises por CCDP de fase normal foram preparadas em placas de vidro de 20 x 20 cm, usando 20 g de Sílica gel com gesso e UV 254 nm (5 – 15  $\mu\text{m}$ / 60 Å) - Sorbent Technologies e 70 mL de água destilada. As placas foram secas à temperatura ambiente por 72 h e ativada em estufa à 100°C por 1 h. Após eluição em cuba cromatográfica com solventes adequados para a amostra, a revelação foi realizada por luz ultravioleta (UV-254 e 365 nm) na cabine TLC Visualizer (CAMAG), e em seguida as manchas foram raspadas, extraídas e filtradas com papel filtro.

#### **4.5.3. Cromatografia em coluna aberta (CC)**

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro de altura e diâmetro específicos de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas. Dependendo da natureza da amostra, foram utilizadas fases estacionárias com as seguintes especificações: (i) sílica gel G60 com partículas entre 60 – 200  $\mu\text{m}$  (70-230 *mesh*); (ii) sílica *flash* F60 entre 40 - 63  $\mu\text{m}$  (230 – 400 *mesh*), utilizando diferentes sistemas de solventes definidos anteriormente por CCD.

Na cromatografia em coluna de sílica *flash*, as partículas são extremamente pequenas e impedem a passagem do solvente, sendo necessário o uso de pressão no topo da coluna para ocorrer o fluxo da fase móvel pela fase estacionária. A pressão pode ser fornecida ao sistema por um compressor ou bomba de vácuo. Esse processo requer a utilização de uma válvula que controle a pressão do sistema (Still, 1978). Na Figura 22 está ilustrado o sistema de cromatografia em coluna de sílica *flash*.

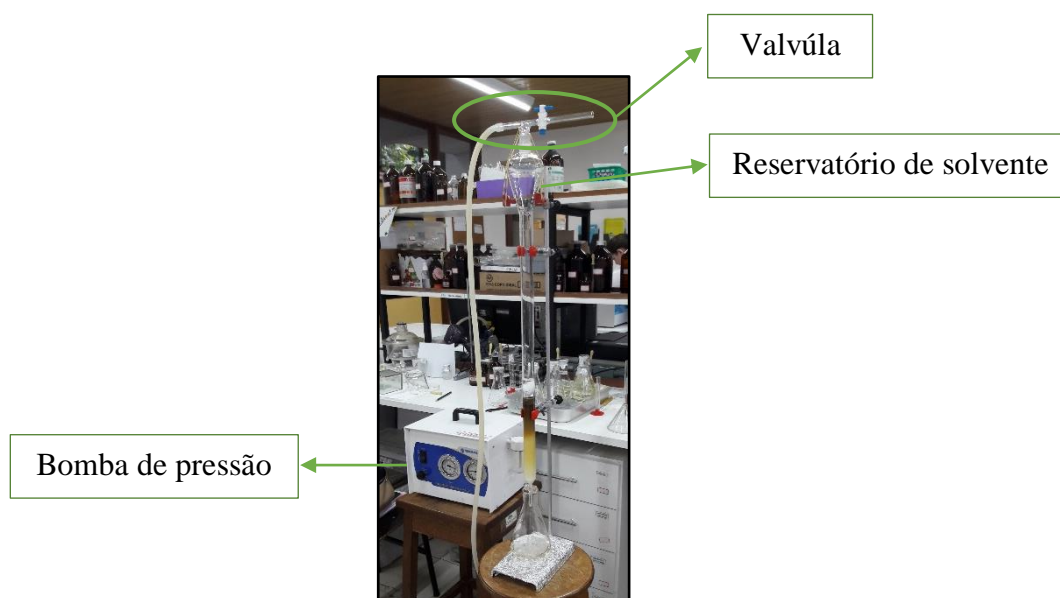


Figura 22. Sistema de cromatografia em coluna utilizando sílica *flash*.

Segundo Still e colaboradores (1978), existe uma relação entre a quantidade de amostra e os seguintes fatores: variação do  $R_f$ , diâmetro da coluna, volume da fração coletada e o volume total do eluente, para que a separação aconteça com a mesma eficiência da observada na CCD.

Diâmetro da coluna (cm)	Volume do eluente (mL)	Quantidade de amostra (mg)		Volume da fração (mL)
		$\Delta R_f \geq 0,2$	$\Delta R_f \geq 0,1$	
1	100	100	40	5
2	200	400	160	10
3	400	900	360	20
4	600	1600	600	30
5	1000	2500	1000	50

Tabela 4. Relação entre diâmetro da coluna e quantidade da amostra na cromatografia em coluna. Fonte: Still et al. (1978).

#### 4.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas no Laboratório de espectrometria de massas na Central Analítica da UFAM utilizando o cromatógrafo analítico da marca Thermo Scientific, modelo Acella®. O uso do cromatógrafo foi realizado utilizando a coluna Luna fenil – hexil, 150 mm

x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, da marca Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol (solvente B) e água (solvente A). O detector foi ajustado para o monitoramento entre 220-400 nm.

Para análise em escala preparativa foi utilizado um cromatógrafo modelo Shimadzu® (CBM-20A), equipado com detector de UV (SPD- 20A), degaseificador (DGU-20A), sistema binário de solventes (LC-6AD) e *looping* de 500  $\mu$ L. Utilizou-se a coluna Luna C18 (5  $\mu$ m, 250 x 10 mm) Phenomenex com fluxo de 2 mL/min. As fases móveis utilizadas foram metanol (B) e água (A) em modo de eluição gradiente. As frações foram analisadas por espectrometria de massas, sendo posteriormente encaminhadas as mais promissoras para análises de RMN.

#### **4.5.5. Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massas (CL/EM)**

As análises foram realizadas no Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (LTQPN) no INPA utilizando um cromatógrafo UFLC, modelo Prominence (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPDM-20A e injetor automático SIL-20A. O espectrômetro de massa acoplado é equipado com analisador *time of flight*, modelo microTOF-Q II da marca Bruker, dotado de uma fonte de ESI operado no modo negativo), resolução de 17500 (FWHM), monitorando a faixa de  $m/z$  50 a 900. Utilizou-se uma coluna Shim-pack XR-ODS (50 mm x 2.0 mm, tamanho de partícula 2.2  $\mu$ m) com fluxo de 0,4 mL/min. As fases móveis utilizadas foram água com ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila com ácido fórmico 0.1% (B) em modo de eluição gradiente por 52 minutos. Para controle, aquisição e processamento de dados utilizou-se o programa Compass 4.1.

#### **4.6. Análises espectrométricas e espectroscópicas**

##### **4.6.1. Espectrometria de massas (EM)**

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no laboratório de espectrometria de massas na Central Analítica da UFAM, usando um espectrômetro *ion trap* LCQ Fleet™ da marca Thermo Scientific.

As amostras foram pesadas e solubilizadas com metanol grau CLAE em uma concentração de 1 mg/ml, onde foram retirados 20 µL em outro microtubo e avolumado para 1 ml com metanol. Dependendo da natureza da amostra foram utilizadas duas fontes de ionização. As amostras mais polares foram analisadas usando a fonte eletrospray (ESI) operando no modo positivo e negativo, injeção por inserção direta com fluxo de 100 µL/min, varredura entre 100 a 1000  $m/z$  e as amostras mais apolares foram analisadas usando a fonte APCI varredura entre 100 a 550  $m/z$ . Para processamento de dados foi utilizado o Programa Xcalibur 2,0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, EUA).

#### **4.6.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e das correlações bidimensionais foram realizados em um espectrômetro da Bruker advance III HD operando a 11,75 Tesla (500 MHz para os núcleos de  $^1\text{H}$  e 125 MHz para os núcleos de  $^{13}\text{C}$ ), localizado no Laboratório de RMN na Central Analítica da UFAM. A amostra foi solubilizada em clorofórmio ou metanol deuterados dependendo de sua polaridade. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram registradas em Hertz (Hz).

### **4.7. Atividade antimicrobiana**

#### **4.7.1. Teste de difusão em ágar**

Os ensaios antibacterianos foram realizados em colaboração com a plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia, sob a coordenação da Profa. Dra. Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira. Foram avaliadas cepas padrões de 31 bactérias Gram positivas e Gram negativas (Tabela 5).

<b>Bactérias Gram-Positivas</b>	<b>Cepas</b>
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (CT)	ATCC 6051
<i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>Streptococcus faecalis</i> )	ATCC 4083
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953
<i>Listeria inócua</i>	ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina	(MRSA)
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC27851
<b>Bactérias Gram negativas</b>	<b>Cepas</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606-143
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864-576
<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC)	BUTANTÃ F1845
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	CDC EDL- O42
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	CDC EDL-933-171
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	ST8
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	BUTANTÃ LT 2871
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica típica (EPEC)	ATCC E234869
<i>Escherichia coli</i> -INV-enteroinvasiva (EIEC)	ATCC 1381
<i>Escherichia coli</i> não diarreicogênica	ATCC 10536
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 11601-120
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352-083
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 15290-095
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC EDL-1284
<i>Pseudomonas putida</i> (oralis)	ATCC 15175-113
<i>Salmonella arizonae</i>	UFAM
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 10708
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6539
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756-131
<i>Shigella desenteriae</i>	ATCC 13313
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610

Tabela 5. Relação das cepas bacterianas Gram-positivas e negativas.

Para o teste de antagonismo, as amostras testadas foram solubilizadas em DMSO a 10% na concentração de 5 mg/mL quando extratos ou frações, e 1 mg/mL quando substâncias isoladas.

As bactérias foram cultivadas previamente em caldo LB por 24 horas. A cultura bacteriana crescida foi diluída em meio de cultura, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland, que equivale a  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL).

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), a qual consiste na utilização de placas com camada dupla (camada base e camada *seed*), utilizando o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (MHA). Primeiramente, foi vertido o meio nas placas de Petri em duas camadas. Após a solidificação do meio de cultura, o inóculo bacteriano padronizado foi semeado com swab estéril por toda a sua superfície da placa. Em seguida, com o auxílio de ponteiros de 200  $\mu$ L, foram perfurados orifícios de 6 mm de diâmetro, os quais receberam aproximadamente 80  $\mu$ L das amostras. O controle negativo compreendeu poços contendo DMSO a 10% e a droga controle utilizada foi o TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500  $\mu$ g/mL. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Após a difusão dos metabólitos no meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h e em seguida foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição, com o auxílio de uma régua milimetrada.

#### **4.7.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

As amostras que apresentaram halos de inibição no antibiograma foram avaliadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima de acordo com a CLSI (2012), em placas de 96 poços. As cepas que se apresentaram sensíveis foram cultivadas em 3 mL de caldo nutritivo Luria Bertani (LB), incubadas a 37°C, por 24 h. Para o preparo do inóculo bacteriano foi transferido com auxílio de micropipeta uma alíquota de 50 a 100  $\mu$ L da cultura para um tubo com 3 mL de meio LB estéril suficiente para atingir a turvação padrão de 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

Foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  do meio LB em todos os poços. Nos orifícios da linha A, da coluna 1 a 9, foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  referentes às amostras correspondentes (extratos, frações ou isolados) em triplicatas, e nas colunas 10 e 11 foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da droga controle (TIENAM). Os poços da linha A tiveram seus conteúdos homogêneos e procedeu-se uma diluição seriada (1:2) nos poços subsequentes de cada amostra, realizada até a linha H. Em seguida, foram acrescentados em cada poço, 20  $\mu\text{L}$  do meio LB estéril, 20  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano a 0,5 da escala McFarland e 10  $\mu\text{L}$  de resazurina a 0,01% filtrada como indicador colorimétrico de oxi-redução para caracterização da viabilidade celular, resultando em um volume final de 100  $\mu\text{L}$ /poço. A concentração final avaliada foi em um espectro de 1000 a 7,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 23).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
B	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
C	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
D	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
E	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
F	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
G	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
H	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	

Amostra 1
  Amostra 2
  Amostra 3
  Droga controle
  Controle negativo
  Controle positivo

Figura 23. Esquema do teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Na coluna 12, linhas A a C contendo o controle negativo, foram acrescentados 80  $\mu\text{L}$  do meio estéril, o qual foi utilizado para solubilizar a amostra, e 20  $\mu\text{L}$  de resazurina 0,01% filtrada. Na mesma coluna, nas linhas D a F contendo o controle positivo, foi acrescentado 60  $\mu\text{L}$  de meio, 20  $\mu\text{L}$  de resazurina 0,01% e 20  $\mu\text{L}$  de inóculo.

Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 18 a 48 h, e posteriormente, realizada leitura considerando crescimento bacteriano positivo a conversão do corante azul para rosa (ou incolor). A ausência de crescimento bacteriano foi determinada pela permanência da coloração azul. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração das

amostras capaz de inibir o crescimento de bactérias, como indicado pela coloração da resazurina.

#### **4.8. Atividade antimalárica**

Para a avaliação da atividade antiplasmódica utilizaram-se cepas FCR3 de *Plasmodium falciparum* em colaboração com a Plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia.

##### **4.8.1. Cultura de *Plasmodium falciparum***

As cepas FCR3 de *P. falciparum* foram mantidas em cultivo no meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) incompleto com 10% de soro humano AB+ e alimentadas com eritrócitos humanos normais incubadas a 37 °C em atmosfera de baixa concentração de oxigênio e gás carbônico seguindo a técnica de micro-aerofilia tradicional da queima de vela em dessecador. O meio de cultura RPMI 1640 incompleto foi constituído de 10,4 g de RPMI, 5,94 g de hepes, 40 mg de gentamicina, 2 g de glicose e 50 mg de hipoxantina a pH 6,8. O meio completo foi suplementado com 5 mL soro humano AB+ previamente tratado em banho-maria a 56°C durante 30 min, 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 10% e 44 mL de meio RPMI incompleto (Ljungström et al., 2004).

##### **4.8.2. Análise de inibição de crescimento**

As soluções estoque dos extratos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio completo até a concentração final de DMSO de 0,5%, nos poços. Os extratos foram diluídos em DMSO, resultando em um estoque inicial de 10 mg/mL. Deste estoque inicial, 4 µL foram retirados para diluição em 196 µL de meio completo, resultando em um segundo estoque (1:50).



Os testes foram realizados em placas de 96 poços em triplicata, com volume final de 100  $\mu\text{L}$ /poço. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de meio completo em todos os poços. Após isso, 50  $\mu\text{L}$  do segundo estoque de cada amostra foram adicionados aos poços correspondentes da fileira A da placa. Diluições seriadas das amostras foram realizadas nas fileiras subsequentes, resultando em um espectro de análise nas concentrações de 50 a 0,39  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 24).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	
B	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	
C	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	
D	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	
E	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	3,12 $\mu\text{g/mL}$	
F	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	
G	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$	
H	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	0,39 $\mu\text{g/mL}$	

Amostra 1
  Amostra 2
  Amostra 3
  Droga controle
  Controle positivo
  Controle negativo
  Controle reagente

Figura 24. Esquema do teste de *P. falciparum* em placa de 96 poços.

O parasita foi preparado para o teste utilizando uma solução com 100  $\mu\text{L}$  de hemácias parasitadas, 100  $\mu\text{L}$  de hemácias sadias, 10  $\mu\text{L}$  de gentamicina e avolumado para 10 mL de meio completo, obtendo uma suspensão de parasita a 2% de hematócrito e parasitemia de 3 a 5%. Desta solução, foram distribuídos 50  $\mu\text{L}$  em cada um dos poços tratados com as amostras, em uma triplicata para o controle positivo (meio de cultura + parasita), em uma triplicata para o controle do reagente (meio de cultura + DMSO a 0,5% + parasita), e nos poços correspondentes à droga controle. A droga controle utilizada foi o quinino e foi avaliada nas mesmas concentrações das amostras testadas. No controle negativo utilizou-se apenas hemácias sadias (eritrócitos não parasitados) com hematócrito a 2%. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de baixa concentração de oxigênio e gás carbônico seguindo a técnica de micro-aerofilia tradicional da queima de vela em dessecador, mesmas condições do cultivo do parasita.

Após as 72 h, a leitura das placas foi realizada com contagem da porcentagem da parasitemia por citômetro de fluxo FAC-SCAN com identificação do parasita através da fluorescência do brometo de etídio (substância acumulativa fluorescente que se liga ao DNA). A inibição foi determinada comparando à parasitemia observada com a parasitemia do controle positivo sem extrato vegetal e a sensibilidade fluorescente do teste foi comparada com o controle negativo possuindo hemácias sadias.

A concentração inibitória em 50% da parasitemia total (CI<sub>50</sub>) foi determinada a partir da curva dose-resposta de extratos de planta *vs* hemácias parasitadas, por análise de regressão não linear.

#### **4.9. Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em colaboração com a plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia, sob a coordenação da Profa. Dra. Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de alamar blue (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 CO<sub>2</sub>. As células foram plaqueadas na concentração de 1 x 10<sup>4</sup> 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 h 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 h.

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 h, foi realizada a leitura da fluorescência. O teste foi realizado em triplicata. 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).

$$VC = \frac{100 \times Ft}{Fb}$$

A porcentagem de morte celular (MC) foi calculada de acordo com a fórmula:

$$MC = 100 - \% \text{ viabilidade celular (VC)}.$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO



### 5.1. Resultados preliminares

Os produtos naturais, com destaque os frutos amazônicos, são fontes de compostos bioativos, entre eles: compostos fenólicos, vitaminas, carotenoides, saponinas, alcaloides e minerais. Várias pesquisas relatam o uso desses recursos naturais como matéria-prima para síntese de produtos biotecnológicos devido à presença de compostos químicos associados a diversas atividades biológicas (Silva et al., 2007; Simões et al., 2007).

No trabalho de Bastos (2015), extratos e frações de 25 espécies de plantas amazônicas obtidos pelo grupo de pesquisa Q-biomA foram submetidos a triagem antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, utilizando 37 cepas bacterianas e um fungo *Candida albicans*. Das plantas analisadas, somente 15 espécies apresentaram atividade, dentre elas, *Euterpe precatória* e *Euterpe oleracea* (açai), *Caryocar villosum* (piquiá), *Platonia insignis* (bacuri), *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) e *Inga edulis* (ingá), os resultados estão sumarizados na Tabela 6.

Espécie	Bactérias Gram-negativas								Bactérias Gram-positivas								CA	PF
	EC	YE	AS	SC	ST	SF	SD	AB	BL	BS	AS	SP	SPY	MRSA	SM	AS		
<i>Caryocar villosum</i>																		
<i>Euterpe precatória</i>																		
<i>Euterpe oleracea</i>																		
<i>Inga edulis</i>																		
<i>Garcinia madruno</i>																		
<i>Platonia insignis</i>																		
<i>Protium klugii</i>																		
<i>A. panurensis</i>																		
<i>A. ferrea</i>																		
<i>A. parviflora</i>																		
<i>A. guianensis</i>																		
<i>O. leucoxydon</i>																		
<i>L. martiniana</i>																		
<i>L. canella angustata</i>																		
<i>T. grandiflorum</i>																		

Tabela 6. Resultados da atividade antimicrobiana das espécies analisadas. Fonte: Bastos (2015).

Legenda:  Positivo  Negativo

Bactérias: *E.coli* (EC); *Y. enterocolitica* (YE); *S. arizonae* (SA); *S. choleraesuis* (SC); *S. typhi* (ST); *S. flexnerie* (SF); *S. desenteriae* (SD); *A. baumannii* (AB); *B. liquiniformes* (BL); *B. subtilis* (BS); *B. subtilis* (BS); *S. agalactiae* (AS); *S. parasanguinis* (SP); *S. pyogenis* (SPY); *S. simulans* (SS); *S. aureus* (SA); *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). Fungo: *C. Albicans* (CA). Parasita: *Plasmodium falciparum* (PF).

Nessas análises foram avaliados os extratos etanólicos (EtOH) e hidroalcoólicos (EtOH:70%) por maceração das cascas, polpas e sementes de piquiá obtidos no trabalho de Yamaguchi (2015). Os diâmetros dos halos de inibição sobre as bactérias dos seis extratos são apresentados na Tabela 7. A concentração inicial foi de 5 mg/mL, droga padrão da bactéria: Imipenem/cilastatina sódica (TIENAM) e a droga padrão do fungo *C. albicans*: Fluconazol.

Bactérias e fungos	Cascas		Polpas		Sementes	
	EtOH	EtOH:70%	EtOH	EtOH:70%	EtOH	EtOH:70%
<i>B. liquiniformes</i>	20	-	-	25	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	30	-	-
<i>S. agalactiae</i>	-	25	-	-	-	20
<i>S. pyogenis</i>	-	25	25	-	10	20
<i>MRSA</i>	15	16	13	-	-	-
<i>S. simulans</i>	19	15	15	-	-	-
<i>S. aureus</i>	15	15	15	-	-	-
<i>E. coli</i>	23	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	-	22	-	24	-	-
<i>S. arizonae</i>	20	20	20	-	11	11
<i>S. choleraesuis</i>	20	27	27	25	15	25
<i>S. typhi</i>	-	23	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	15	15	19	20	-	-
<i>S. desenteriae</i>	-	15	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	15	-	-	-	-

Tabela 7. Resultados dos halos de inibição (mm) de *Caryocar villosum*. Fonte: Bastos (2015).

O critério de avaliação para determinação da atividade antibacteriana foi pelo diâmetro do halo de inibição se igual ou superior a dez milímetros (Tabela 8) (Al - Hebshi et al., 2006; Ostrosky et al., 2008).

Diâmetro	Resultado
Acima de 20 mm	Boa atividade
Entre 15 a 20 mm	Moderada atividade
Entre 10 a 15 mm	Pouco atividade
Ausência do halo	Inativo

Tabela 8. Critério de avaliação para atividade antimicrobiana.

A partir dos resultados obtidos do trabalho de Bastos (2015) mostrados nas tabelas anteriores, observou-se que entre outras espécies amazônicas, o fruto de piquiá destacou-se por

apresentar atividades sobre quatorze bactérias, sendo sete bactérias Gram-positivas e sete bactérias Gram-negativas e fungo *Candida albicans*, entretanto não demonstrou atividade contra o parasita *P. falciparum*. Como mostra a tabela 7, os halos de inibição variaram entre 10 a 30 mm. Em geral, os extratos de cascas demonstraram-se mais ativos que os extratos de sementes. De acordo com o critério de avaliação, os extratos hidroalcoólicos de cascas apresentaram atividade moderada a alta sobre 11 bactérias (*S. agalactiae*, *S. pyogenis*, MRSA, *S. simulans*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *S. arizonae*, *S. cholerasuis*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. desentarie*) e o fungo *C. albicans*, enquanto os extratos etanólicos sobre 8 bactérias (*B. liquiniformes*, MRSA, *S. simulans*, *S. aereus*, *E. coli*, *S. arizonae*, *S. cholerasuis* e *S. flexneri*). Nas sementes, os extratos hidroalcoólicos apresentaram inibição sobre 4 bactérias, sendo altamente ativo sobre 3 bactérias (*S. agalactiae*, *S. pyogenis* e *S. cholerasuis*) e pouco ativo contra *S. arizonae*, os extratos etanólicos demonstraram-se pouco ativos sobre apenas 3 bactérias (*S. pyogenis*, *S. arizonae* e *S. cholerasuis*).

Estes resultados promissores da atividade antimicrobiana motivaram a continuação dos estudos com o fruto piquiá, realizando o estudo fitoquímico bio guiado das cascas e sementes visando investigar as substâncias responsáveis por tais atividades.

## 5.2. Rendimentos e perfil cromatográfico dos extratos de cascas e sementes de piquiá

Após coleta e processamento dos frutos, as cascas e sementes foram extraídas em Soxhlet, secas e pesadas para obtenção dos rendimentos mostrados na Tabela 9.

	<i>Método 1</i>	<i>Método 2</i>		
	<b>Etanol</b>	<b>Hexano</b>	<b>Acetato de etila</b>	<b>Metanol</b>
<b>Cascas</b>	13,37% (13,376 g)	0,56% (0,564 g)	1,23% (1,232 g)	16,22% (15,133 g)
<b>Sementes</b>	20,45% (40,916 g)	41,31% (67,788 g)	2,92% (5,845 g)	7,00% (14,000 g)

Tabela 9. Rendimentos dos extratos de cascas e sementes de Piquiá.

Os dados da tabela 9 mostram que o método 1 (extração única) com etanol apresentou bons rendimentos principalmente para as sementes do fruto, sendo necessário pouco material vegetal para a realização do estudo químico permitindo a extração de compostos com diferentes polaridades, e além disso utiliza um solvente mais barato e ecológico, pois o álcool apresenta baixa toxicidade em relação aos demais solventes, assim reduzindo possíveis danos à saúde e ao meio ambiente. No método 2 (extração sequenciada) mostra que nas cascas do fruto, o extrato metanólico obteve maior rendimento com 16,22%, indicando maior presença de substâncias polares, enquanto que nas sementes, o extrato hexânico apresentou um rendimento de 41,31%, indicando uma forte presença de substâncias apolares.

A Figura 25 mostra as placas cromatográficas das extrações sequenciadas de cascas (1) e de sementes (2) de piquiá. Os extratos em hexano e acetato de etila foram aplicados em placas de fase normal, eluídos com diclorometano 100%, e hexano e acetato de etila 10:90%, respectivamente. Os extratos em metanol foram aplicados em placas de fase reversa, eluídos com água e acetonitrila na proporção 80:20%. Posteriormente, as placas foram reveladas em luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e com o reagente vanilina.

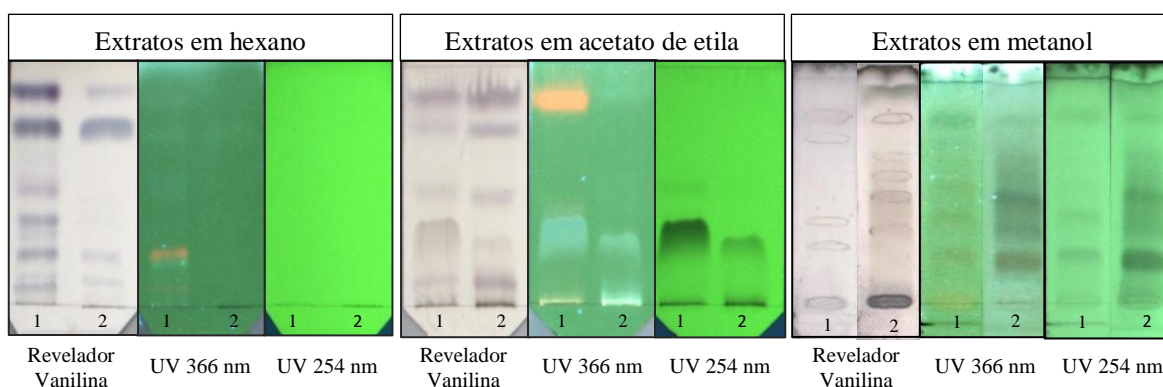


Figura 25. Placas cromatográficas dos extratos em hexano, acetato e metanol de cascas (1) e sementes (2).

Observou-se que a extração sequenciada foi satisfatória pois os compostos químicos foram separados de acordo com a polaridade de cada solvente. De forma que os extratos hexânicos apresentaram componentes químicos de menor polaridade e apenas algumas manchas absorveram em UV 366 nm. Assim como as substâncias de média polaridade foram

extraídas em acetato de etila e as de maior polaridade extraídas em metanol, e ambas apresentaram manchas com melhores absorções em UV 254 e 366 nm. Pode ser verificado também que os extratos sequenciais de cascas e sementes apresentam perfis pouco semelhantes, presenciando manchas com a mesma coloração e os mesmos Rfs.

Os extratos etanólicos de cascas por Soxhlet apresentaram o rendimento de 13,36% enquanto que os extratos etanólicos obtidos por Yamaguchi (2015) apresentaram um rendimento de 11,76% e os hidroalcoólicos 14,73% por extração em maceração. Os rendimentos de extratos podem sofrer variações visto que a extração de compostos bioativos depende de vários fatores como o tipo de extração e solventes utilizados. Os métodos de extração que utilizam diferentes solventes em combinação com aquecimento e/ou agitação aumentam o poder de solubilidade dos compostos (Azmir et al., 2013).

Os perfis cromatográficos por CCD em fase normal dos extratos etanólicos de cascas (EECP) e sementes (EESP) apresentaram maior complexidade visto que estão presentes compostos com polaridades diferentes, tendo vários Rfs ao longo das placas de CCD. Portanto, estes extratos de cascas e sementes foram fracionados por partição líquido-líquido com solventes com ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol/água). Pode ser observado que os componentes dos extratos foram solúveis seletivamente de acordo com a natureza de cada solvente, apresentando boa separação das substâncias químicas. Os rendimentos das frações são mostrados na tabela a seguir:

<b>Frações</b>	<b>Cascas</b>	<b>Sementes</b>
<b>Hexano</b>	2,26%	78,17%
<b>Diclorometano</b>	18,51%	2,67%
<b>Acetato de etila</b>	66,00%	13,21%
<b>Metanol/água</b>	16,70%	5,40%

Tabela 10. Rendimentos das partições de extratos etanólicos.

Os dados da Tabela 10 mostram que os extratos etanólicos de cascas apresentaram rendimento maior na fração em acetato de etila, indicando maior presença de compostos de



média a alta polaridade enquanto que nas sementes, há maior rendimento na fração hexânica contendo substâncias mais lipofílicas.

### 5.3. Análises biológicas

Para a realização das análises biológicas na FIOCRUZ Amazônia, foram pesados em microtubos 35 mg de cada extrato e fração, sendo 25 mg para realização do ensaio antibacteriano pelo método de difusão em ágar, 5 mg para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e 5 mg para ensaio antimalárico.

#### 5.3.1. Atividade antibacteriana

Em uma primeira análise, os ensaios de teste antibacteriano foram realizados e os resultados foram negativos, nenhum dos extratos e frações foram considerados ativos, mas posteriormente constatou-se a possibilidade de contaminação das cepas bacterianas e os testes foram refeitos dentro da normalidade.

Na Tabela 11 estão apresentados os diâmetros dos halos de inibição dos extratos e frações considerados ativos segundo os critérios de avaliação (item 5.1 – Tabela 8), as demais amostras não apresentaram halos de inibição significativos contra as bactérias.

Halos de inibição			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<b>FASP</b>	12 mm	12 mm	15 mm
<b>FHCP</b>	-	-	11 mm
<b>EMCP</b>	-	-	11 mm
<b>EMSP</b>	-	-	10 mm

Tabela 11. Halos de inibição dos extratos e frações bioativas. Legenda: FASP - Fração em acetato de sementes de piquiá; FHCP – Fração em hexano de cascas de piquiá; EMCP - Extrato metanólico de cascas de piquiá; EMSP – Extrato metanólico de sementes de piquiá; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

A fração em acetato de sementes (FASP) apresentou halos contra três bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Shigella flexneri* (Figura 26) e de acordo com o critério de avaliação, os diâmetros dos halos enquadram-se em baixa a moderada atividade. Os extratos metanólicos de cascas e sementes e a fração hexânica de cascas de piquiá apresentaram inibição apenas contra *Shigella flexneri* com halos de 10 e 11 mm de diâmetro, indicando baixa atividade antibacteriana (Figura 27).

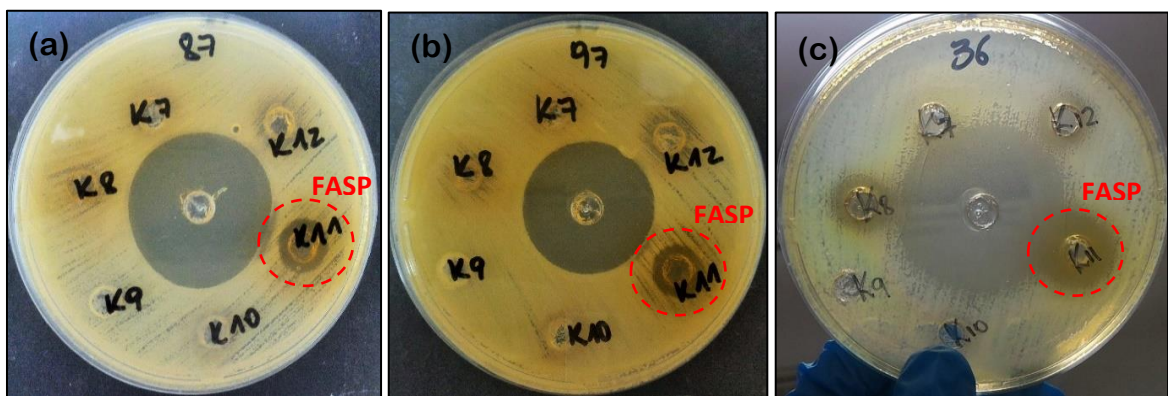


Figura 26. Placas com halos de inibição da fração FASP contra três bactérias. (a) *Staphylococcus aureus* (b) *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina - MRSA (c) *Shigella flexneri*.

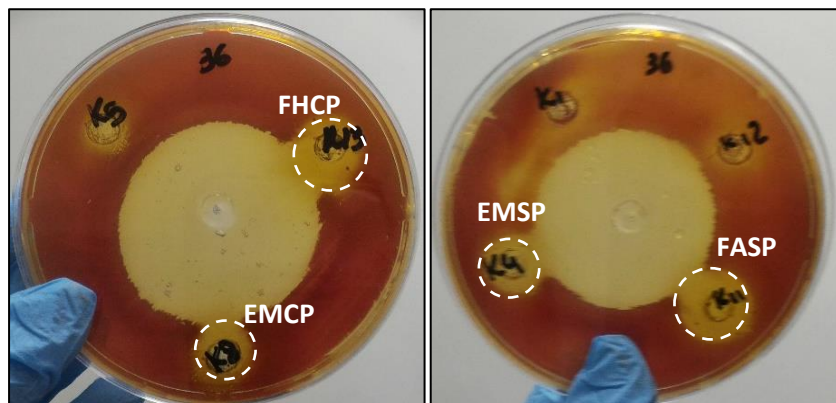


Figura 27. Placas com halos de inibição das quatro amostras ativas contra *Shigella flexneri*.

As quatro amostras revelaram atividade antibacteriana contra *Shigella flexneri*, uma bactéria Gram-negativa, pertencente aos principais patógenos causadores de infecções hospitalares no sangue, infecções nosocomiais e associados com multirresistência aos antimicrobianos resultando maior mortalidade e morbidade em pacientes críticos (Kang et al., 2005).

Os metabólitos vegetais representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto diversas condições ambientais como radiação solar UV, temperatura, sazonalidade, índice pluviométrico, composição atmosférica, ataque de patógenos, macro e micronutrientes afetam na produção e bioatividade dos metabólitos vegetais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Nas análises realizadas por Bastos (2015) os extratos etanólicos e hidroalcoólicos de cascas e sementes de piquiá foram ativos contra 14 bactérias, enquanto que neste trabalho apenas 2 extratos e 2 frações mostraram-se ativos contra 3 bactérias, diferentes condições como o modo de coleta dos frutos, o método de extração e o sistema de solventes podem ter influenciado nesses resultados.

As amostras que apresentaram halos de inibição significativos foram avaliadas pela determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em poços. A CIM é definida como a menor concentração de compostos que produz uma redução de 80% no crescimento visível dos microorganismos em comparação com o controle. Segundo Holetz et al. (2002), os extratos apresentam atividade antimicrobiana boa se exibirem uma CIM inferior a 100 µg/mL; de 100 a 500 µg/mL a atividade antimicrobiana é moderada; de 500 a 1000 µg/mL, a atividade antimicrobiana é fraca; mais de 1000 µg/mL o extrato é considerado inativo. A imagem da placa de poços com é mostrada na Figura 28.

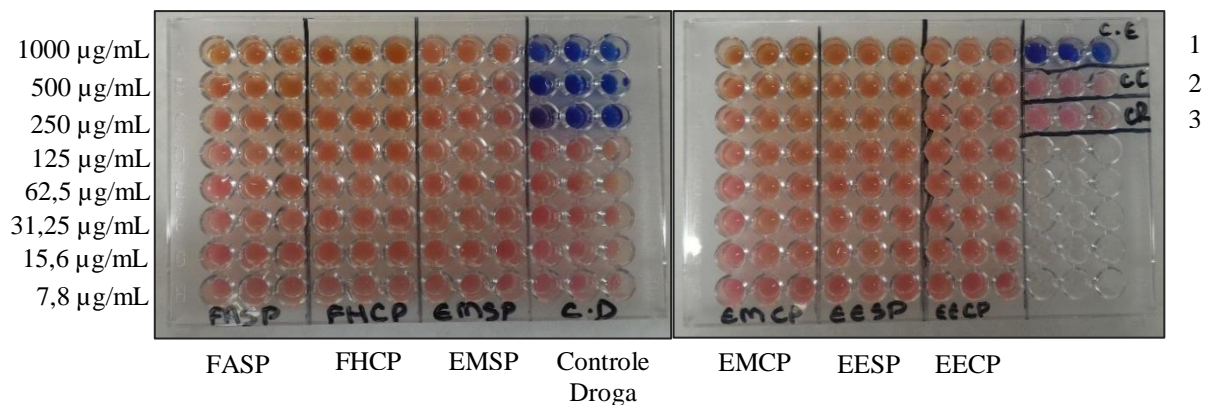


Figura 28. Resultado do teste para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM). (1) Controle de esterilidade; (2) Controle de crescimento; (3) Controle reagente (DMSO 10%).

Considerando os critérios sugeridos por Holetz et al. (2002), todos os extratos e frações foram inativos visto que mesmo na concentração mais alta de 1000 µg/mL houve conversão da coloração do corante azul para rosa indicando crescimento bacteriano positivo. Como pode ser observado no controle droga a permanência da coloração azul indica inibição do crescimento da bactéria.

Em produtos naturais ainda não existe um método padronizado para expressar os resultados da atividade antimicrobiana. Ensaio biológico com extratos de plantas podem ocasionar resultados com variações atribuídas a vários fatores, dentre eles: a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada (Ostrosky et al., 2008).

### 5.3.2. Atividade antimalárica

Os extratos e frações foram submetidos aos testes de atividade antimalárica frente às cepas FCR3 de *Plasmodium falciparum* por citometria de fluxo. Os testes foram realizados em colaboração com a plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia.

A porcentagem de inibição do crescimento parasitário foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\% \text{ fluorescência da amostra} - \% \text{ fluorescência dos eritrócitos sadios})}{(\% \text{ fluorescência do controle} - \% \text{ fluorescência dos eritrócitos sadios})} \times 100$$

Das amostras analisadas, apenas o extrato em acetato de cascas de piquiá (EACP) apresentou resultados mais expressivos, com porcentagem de inibição de crescimento parasitário superior a 50% em todas as concentrações testadas (Figura 29).

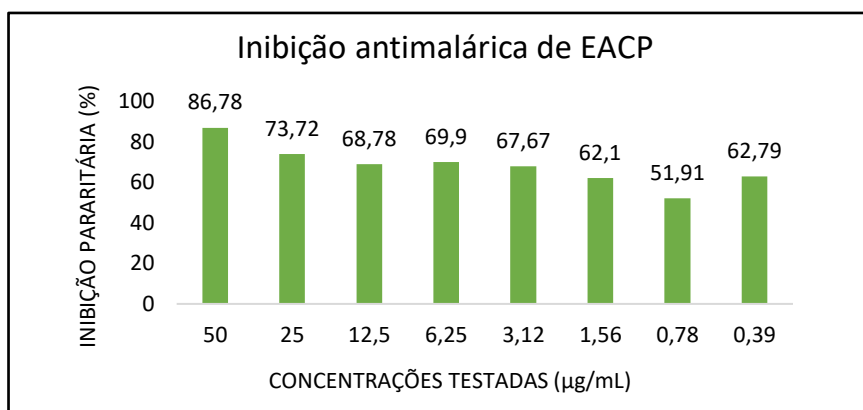


Figura 29. Inibição antimalárica de EACP em todas as concentrações testadas.

A concentração inibitória em 50 % da parasitemia total ( $CI_{50}$ ) foi determinada a partir da curva dose-resposta de extratos de planta *versus* hemácias parasitadas, por análise de regressão não linear pelo software GraphPad Prism.

De acordo Deharo e colaboradores (2001), os resultados *in vitro* para foram classificados do seguinte modo: as amostras que mostraram valores de  $CI_{50}$  inferior a 5 µg/mL foram considerados altamente ativos, enquanto que aqueles com valores de 5 a 10 µg/mL foram considerados moderadamente ativos e os que apresentaram valores de  $CI_{50}$  superior a 10 µg/mL foram considerados inativos.

Dentre os extratos e frações avaliados, apenas o extrato em acetato de etila de cascas de piquiá (EACP) apresentou elevada atividade antimalárica exibindo  $CI_{50}$  de 0,12 µg/mL e a fração metanólica de sementes de piquiá (FMSP) que apresentou atividade moderada com valor de  $CI_{50}$  5,69 µg/mL. As demais amostras não demonstraram atividade antimalárica pois expressaram valores de  $CI_{50}$  acima de 10 µg/mL.

### 5.3.3. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Os extratos sequenciais e as frações de cascas e sementes foram avaliados quanto á sua toxicidade frente às linhagens celulares VERO (linhagem celular sadia derivada de rins de macaco verde) e células HEP-2 (linhagem celular tumoral derivada de carcinoma de laringe

humana) em concentração única. Os testes foram realizados em colaboração com a plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia.

Segundo Mahmoud et al. (2001), os extratos e frações são classificadas de acordo com o percentual de morte celular causado nas células testadas, mortalidade celular acima de 75% é considerada atividade citotóxica elevada, 51 a 75% de morte celular são considerados moderadamente ativos e abaixo de 50% não apresentam atividade citotóxica. As porcentagens de morte celular das amostras (8 extratos e 8 frações) estão apresentados na Tabela 12.

	Amostras	Morte celular (%)	
		VERO	HEp-2
<b>CASCAS</b>	EACP	59,7	-
	EHCP	-	-
	EACP	64,6	10,8
	EMCP	62,1	1,6
	FHCP	47,8	91,5
	FDCP	-	-
	FACP	-	-
	FMCP	-	1,3
<b>SEMENTES</b>	EESP	66,9	-
	EHSP	-	15,0
	EASP	-	-
	EMSP	-	10,5
	FHSP	-	-
	FDSP	18,6	-
	FASP	61,1	-
	FMSP	2,2	-

Tabela 12. Percentual de morte celular em linhagens celulares VERO e HeP-2.  
(-): não houve morte celular.

As amostras EESP, FASP e EACP exibiram atividade moderada frente às células sadias VERO, pois causaram inibições de 66,9%, 61,1%, 59,7%, enquanto que as frações FDSP e FMSP apresentaram porcentagens menos expressivas com 18,6% e 2,2% de inibição, respectivamente, sendo consideradas inativas. E ambas as amostras não inibiram o crescimento celular de HEp-2.

As amostras EHSP, EMSP e FMCP apresentaram apenas porcentagens de inibição frente às células tumorais HEp-2, matando 14,97%, 10,53% e 1,34%, respectivamente.

Os extratos em acetato (EACP) e metanólico de cascas (EMCP) inibiram o crescimento das duas células VERO e HEp-2, mas em porcentagens maiores frente às células saudáveis com 64,60% e 62,13% indicando atividade citotóxica moderada e frente às células tumorais mostraram grau de mortalidade menor com 10,79% e 1,57%, respectivamente.

A fração hexânica de cascas apresentou atividade citotóxica elevada, pois matou 91,50% das células tumorais HEp-2, o que indica que na concentração testada essa fração é citotóxica para células tumorais. A mesma fração inibiu apenas 47,83% das células saudáveis.

Em síntese, apenas uma fração foi considerada tóxica frente às células tumorais e outras cinco amostras foram moderadamente tóxicas frente às células saudáveis VERO. Esses dados permitem outras investigações como avaliar o comportamento dessas amostras frente às células humanas saudáveis e em diferentes concentrações, pois existe a possibilidade de não haver constituintes suficientes uma única concentração para inibir o crescimento celular.

#### **5.4. Estudo fitoquímico bioguiado**

Após extrações em Soxhlet e partição líquido-líquido, os extratos e frações foram submetidos aos testes de atividade antibacteriana e antimalárica (Figura 30). O estudo fitoquímico procedeu-se apenas para os extratos e/ou frações de cascas e sementes considerados ativos nestas atividades biológicas citadas e cada estudo será descrito nos subitens a seguir.

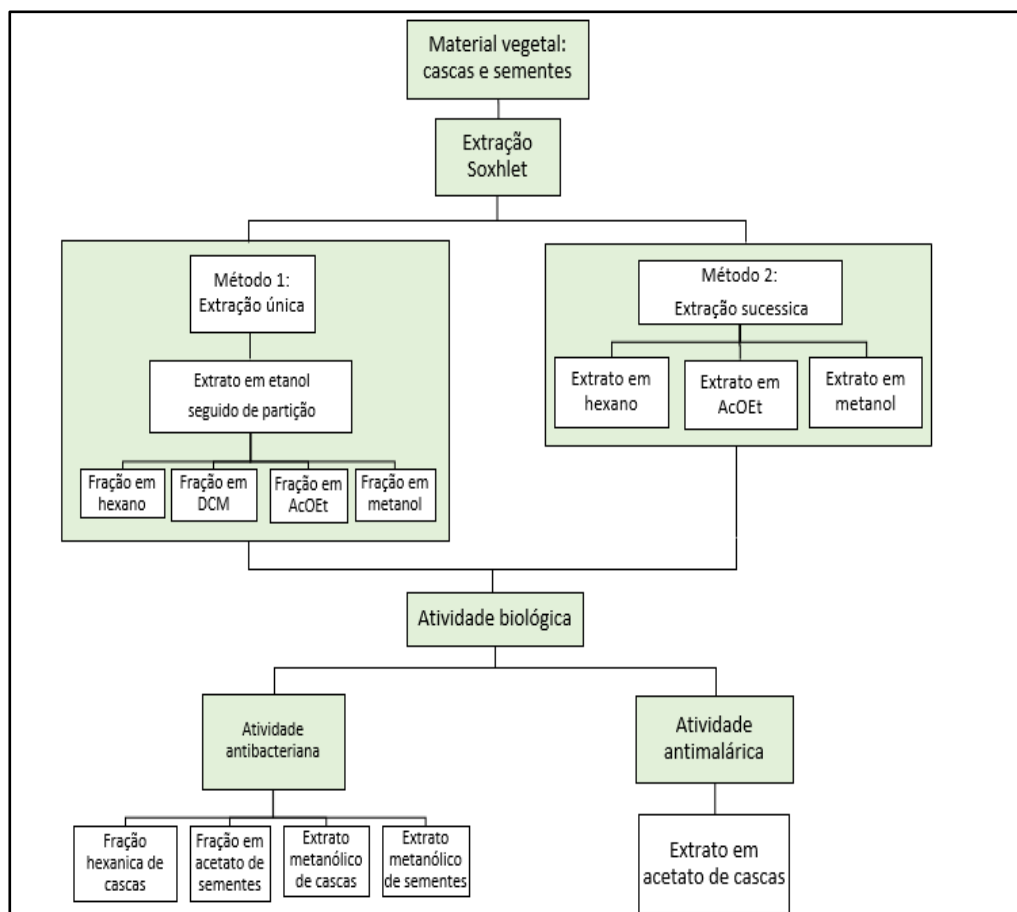


Figura 30. Esquema do estudo fitoquímico bioguiado.

#### 5.4.1. Fração em hexano de cascas (FHCP)

A fração em hexano é oriunda da partição do extrato etanólico de cascas, sendo considerada ativa em testes antibacterianos contra *Shigella flexneri*. A placa cromatográfica da fração foi realizada em fase normal eluída com DCM/AcOEt na proporção 65:35, revelada em ultravioleta 254 e 366 nm e com os reveladores vanilina, sulfato cérico e cloreto férrico.



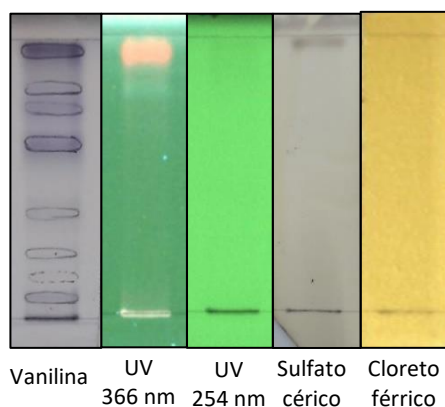
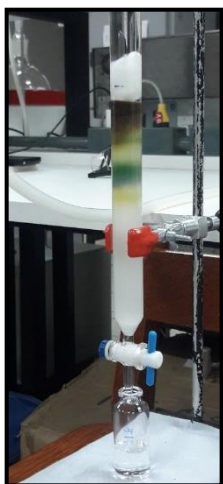


Figura 31. Placas cromatográficas da fração FHCP revelada em diferentes reveladores.

A Figura 31 mostra o perfil cromatográfico da fração com diferentes reveladores e pode ser observado que a mesma não apresentou revelação no comprimento de onda de ultravioleta 254 nm e nem quando revelada com cloreto férrico, indicando possível ausência de compostos fenólicos. A revelação com o reagente vanilina apresentou boa separação com manchas ao longo de toda a placa cromatográfica em tons de azul-violeta, indicativo da presença de saponinas e/ou terpenos glicosilados (Wagner e Bladt, 1995).

Após partição do extrato etanólico obteve-se 300 miligramas da fração FHCP, que foi submetida à coluna *flash* utilizando uma coluna com aproximadamente 2,2 cm de diâmetro, empacotada a 15 cm de altura com sílica *flash* F60 (230-400 *mesh*) e eluição em modo gradiente com hexano, diclorometano e acetato de etila em diferentes proporções (Figura 32) originando 60 frações com volume de 20 ml cada.



Hex. (%)	DCM (%)	AcOEt (%)	MeOH (%)
100	-	-	-
80	20	-	-
60	40	-	-
50	50	-	-
40	60	-	-
30	70	-	-
20	80	-	-
10	90	-	-
-	90	10	-
-	80	20	-
-	70	30	-
-	60	40	-
-	50	50	-
-	30	70	-
-	-	100	-
-	-	-	100

Figura 32. Coluna *flash* FHCP com sistema de eluição gradiente.

A Figura 33 mostra o perfil cromatográfico das 60 frações obtidas da coluna *flash* analisadas por CCD em placa de fase normal, eluídas com hexano e diclorometano na proporção 20:80% e revelada em vanilina sulfúrica.

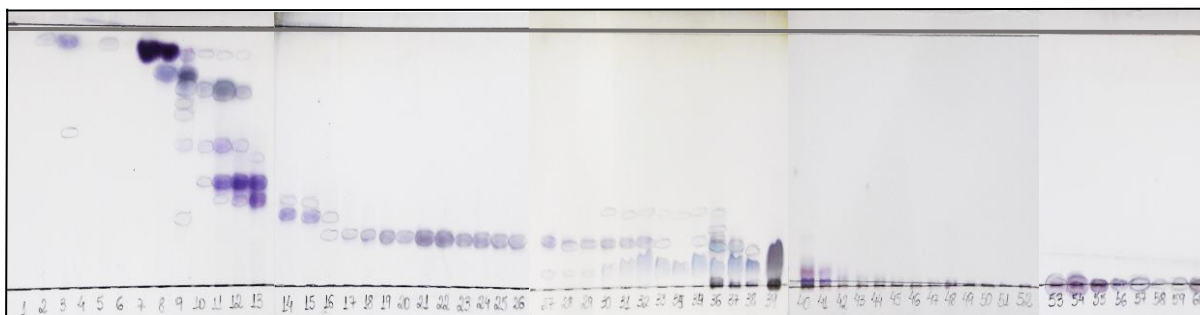


Figura 33. Placa cromatográfica das 60 frações obtidas da coluna *flash*.

Observou-se boa separação dos compostos visto que houve uma rampa de polaridade obtendo-se primeiramente os compostos de baixa polaridade e finalizando com os compostos mais polares. Posteriormente, realizaram-se CCDs para cada conjunto de frações com diferentes misturas eluotrópicas visando melhor separação das bandas cromatográficas, e as frações que

apresentaram o mesmo Rf e perfil cromatográfico foram reunidas e repesadas, resultando em 16 frações (Tabela 13).

Frações	Reunião	Massa (g)
1	1 – 6	0,0034
2	7	0,0181
3	8	0,0132
4	9	0,0148
5	10 – 13	0,0613
6	14 – 15	0,0011
7	16 – 17	0,0005
8	18 – 23	0,0098
9	24 – 32	0,0151
10	33 – 39	0,0777
11	40	0,0025
12	41 – 42	0,0034
13	43 – 44	0,0035
14	45 – 46	0,0032
15	47 – 48	0,0055
16	49 – 58	0,0135

Tabela 13. Reunião e massa das frações da coluna *flash* FHCP.

A Figura 34 mostra o perfil cromatográfico das 16 frações resultantes, o que gerou a reunião das frações 7,8 e 9 sendo renumeradas como fração 7 obtendo 24 mg.

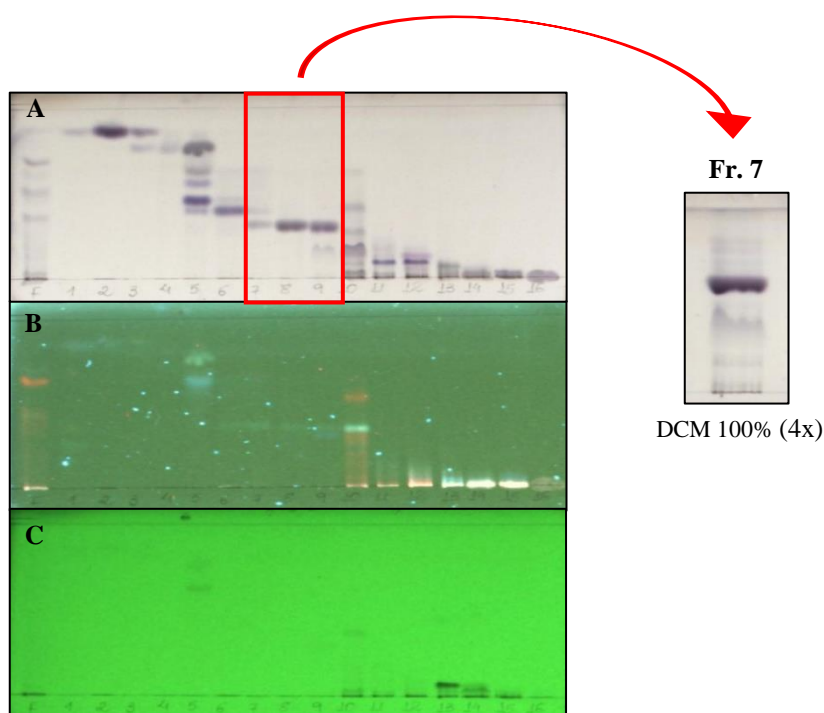


Figura 34. Placas cromatográficas das frações reunidas. A: Reagente vanilina; B: UV-366 nm; C: UV-254 nm.

### 5.4.1.1. Identificação da Fração 7

A fração 7 apresentou-se em forma de um sólido branco e solúvel em diclorometano. Análises dos espectros de RMN 1 e 2D e APCI/MS em comparação com os dados da literatura permitiram identificar a fração como uma mistura dos esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (Figura 35). Essas estruturas já foram relatadas por Marx et al. (1997) presentes na composição química da polpa de *Caryocar villosum*.

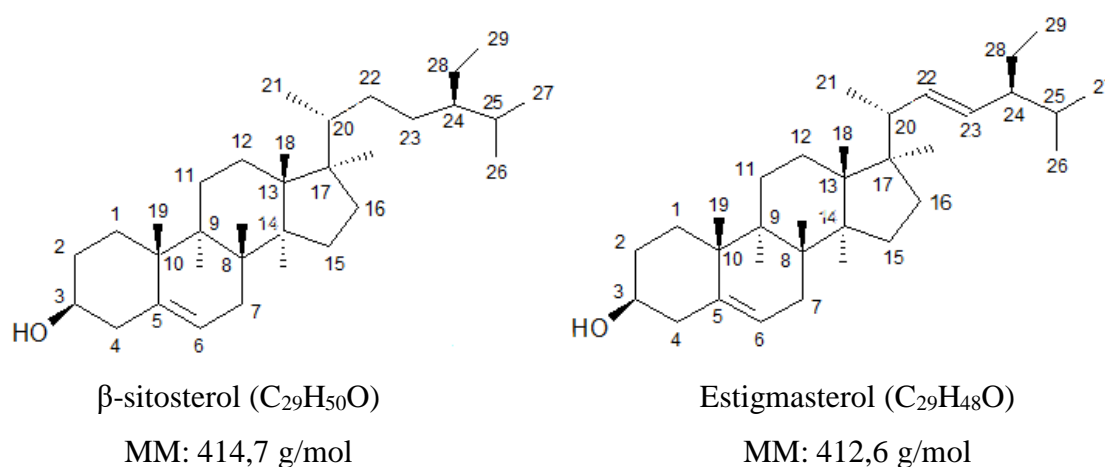


Figura 35. Estruturas dos esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

Os fitoesteróis são comumente relatados em plantas e materiais marinhos. São estruturalmente compostos por 27 ou 29 carbonos e possuem analogia com o colesterol, diferindo apenas na configuração da cadeia lateral. O  $\beta$ -sitosterol contém a adição de um grupo etila no carbono 24 na cadeia lateral, e o estigmasterol além do substituinte 24-metila, possui uma insaturação, uma ligação dupla trans entre os carbonos 22 e 23 (Dewick, 2002).

Os espectros analisados por espectrometria de massas foram realizados na fonte APCI pois é adequada para análise de compostos não polares e de baixo peso molecular como esteróis, que são detectados em APCI como íons desidratados ( $[M+H-H_2O]^+$ ) que é um diagnóstico de esteróis (Lagarda et al., 2006).

A Figura 36 mostra o espectro de APCI/MS em modo positivo, que apresentou íons intensos  $[M+H-H_2O]^+$  em  $m/z$  397 referente ao  $\beta$ -sitosterol e  $[M+H-H_2O]^+$   $m/z$  395 referente ao estigmasterol.

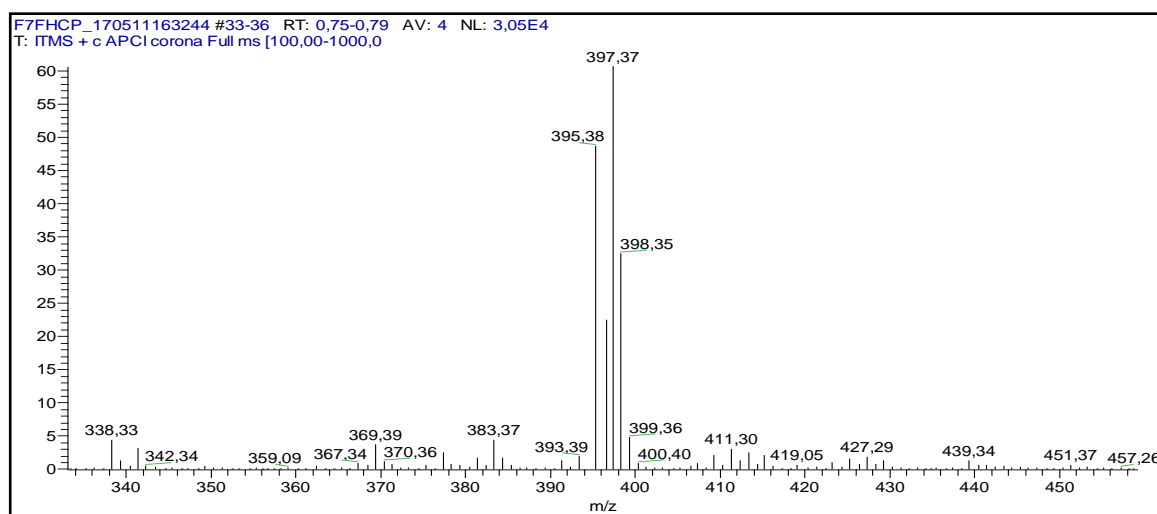


Figura 36. Espectro APCI/MS da F7 em modo positivo.

Os espectros de massas dos esteroides mostram íons fragmentados referentes às possíveis perdas de metilas da cadeia hidrocarbonada e posteriores clivagens dos anéis do esqueleto esteroidal (Figura 37) (Santana, 2011).

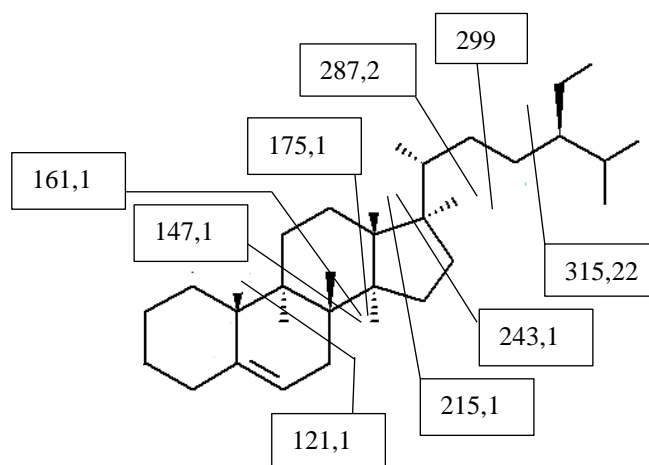


Figura 37. Possíveis perdas do esqueleto esteroidal

As Figuras 38 e 39 mostram os espectros de fragmentação  $MS^2$  dos íons em  $m/z$  395 e 397, respectivamente.

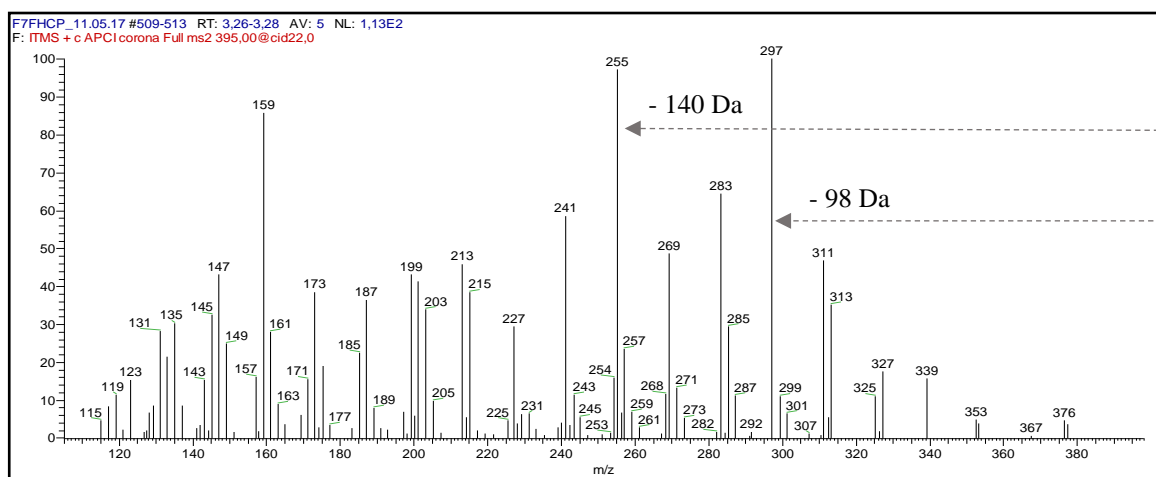


Figura 38. Espectro de  $MS^2$  do íon em  $m/z$  395.

O espectro de massa do íon desidratado  $[(M+H-H_2O)]^+$   $m/z$  395 é mostrado na Figura 38. O fragmento em  $m/z$  297 se deve à perda de uma fração da cadeia lateral do estigmasterol ( $C_7H_{14}$ ). O pico de  $m/z$  255 é formado pela perda da cadeia lateral ligada ao anel pentacíclico.

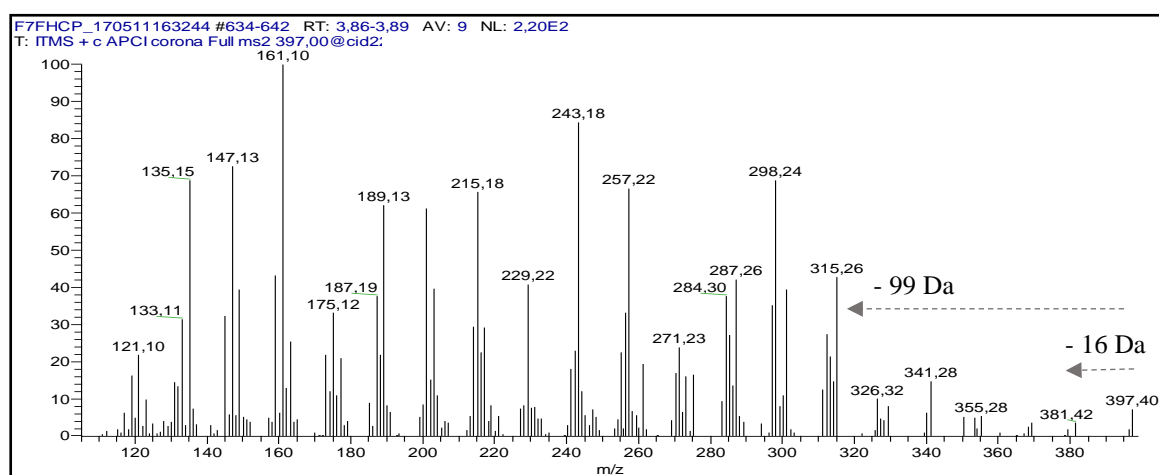


Figura 39. Espectro de  $MS^2$  do íon em  $m/z$  397.

O espectro de massa do íon desidratado  $[(M+H-H_2O)]^+$   $m/z$  397 é mostrado na Figura 39. O fragmento em  $m/z$  381 se deve pela perda de metano ( $-CH_4$ ) e o íon fragmentado  $m/z$  315 pode ser explicado pela perda de grupos alquila da cadeia lateral ( $-C_7H_{15}$ ).

Os espectros de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  estão apresentados nas Figuras 40 e 41, respectivamente, com a ampliação dos principais fragmentos característicos de esqueleto esteroidal.

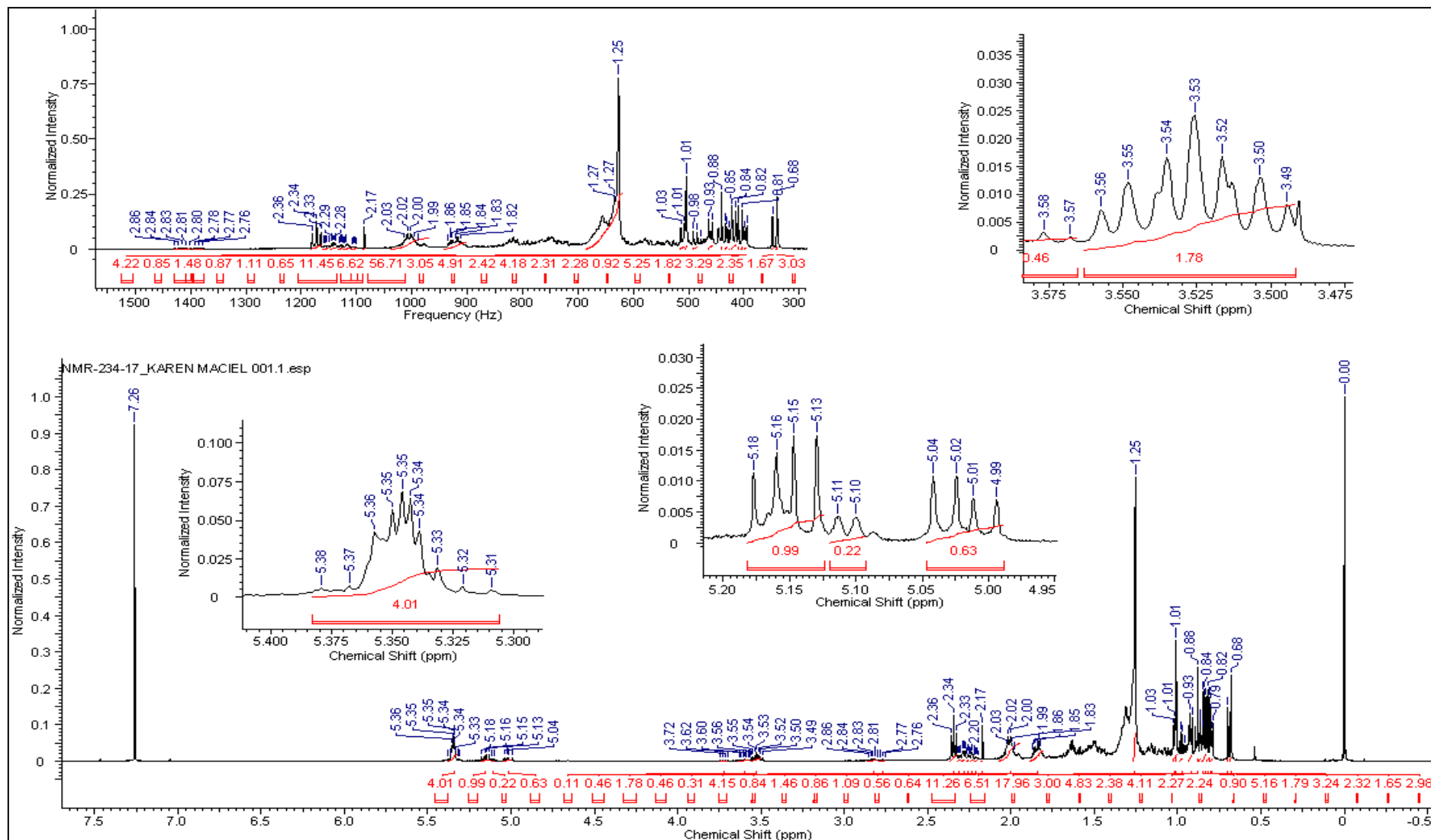


Figura 40. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da Fr. 7. Os fragmentos ampliados destacam as regiões de  $\delta$  típicos de esqueleto esteroidal.

Na análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 40), verificou-se a presença de sinais característicos de esqueleto esteroidal, como um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  5,35 referente aos átomos de hidrogênios vinílicos (H-6), um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,53 referente aos átomos de hidrogênios carbinólicos (H-3), além da presença de vários sinais na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,68 e 2,36 ppm que são atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.

Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (dd,  $J = 15,11, 8,70$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  5,02 (dd,  $J = 15,11, 8,70$  Hz) são referentes aos hidrogênios vinílicos de uma dupla ligação (H22-23) da molécula de estigmasterol. (Forgo e Köver, 2004; Kojima et al., 1990).

O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,26 (singletto) refere-se ao sinal do clorofórmio deuterado,  $\text{CDCl}_3$ , solvente utilizado para solubilização da amostra (Silverstein et al., 2007).

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  foram comparados com a literatura e os deslocamentos químicos dos hidrogênios característicos de esteróis estão mostrados na Tabela 14.

H	Mistura $\delta_{\text{H}}$		$\beta$ -sitosterol ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>lit.(1)</sup>		Estigmasterol ( $\delta_{\text{H}}$ ) <sup>lit.(2)</sup>	
	(mult., $J$ em Hz) <sup>exp.</sup>		(Zhang et al., 2006)	(Facundo et al., 2008)	(Forgo e Kover, 2004)	(Facundo et al., 2008)
3	3,53 (m)	3,53 (m)	3,51 (m)	3,51 (m)	3,51 (m)	3,51 (m)
6	5,35 (m)	5,35 (m)	5,34 (m)	5,36 (d)	5,34 (m)	5,12 (d)
18	0,68(s)	0,70(s)	0,68 (s)	0,68 (s)	0,70 (s)	0,69 (s)
19	1,01 (s)	1,01 (s)	1,00 (s)	1,02 (s)	1,01 (s)	1,02 (s)
21	0,92 (d, $J = 6,7$ Hz)	1,06 (d, $J = 6,4$ Hz)	0,92 (d, $J = 6,5$ Hz)	0,93 (s)	1,03 (d)	1,03 (s)
22		5,15 (dd, $J = 15,11; 8,7$ Hz)			5,17 (dd, $J = 15,2$ Hz)	5,22-4,95 (m)
23		5,02 (dd, $J = 15,11; 8,7$ Hz)			5,04 (dd, $J = 8,6$ Hz)	5,22-4,95 (m)
26	0,83 (d, $J = 6,7$ Hz)	0,86 (s)	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz)	0,83(s)	0,85 (d)	0,86 (s)
27	0,84 (s)	0,81 (s)	0,80 (d, $J = 6,6$ Hz)	0,80 (s)	0,80 (d)	0,81 (s)
29	0,81 (s)	0,85 (s)	0,84 (t, $J = 7,2$ Hz)	0,81 (s)	0,81 (t)	0,83 (s)

Tabela 14. Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol ( $\delta$  em ppm) em comparação com a literatura.

Exp.:experimental; lit: literatura; <sup>(1)</sup> 300 MHz; <sup>(2)</sup> 500 MHz



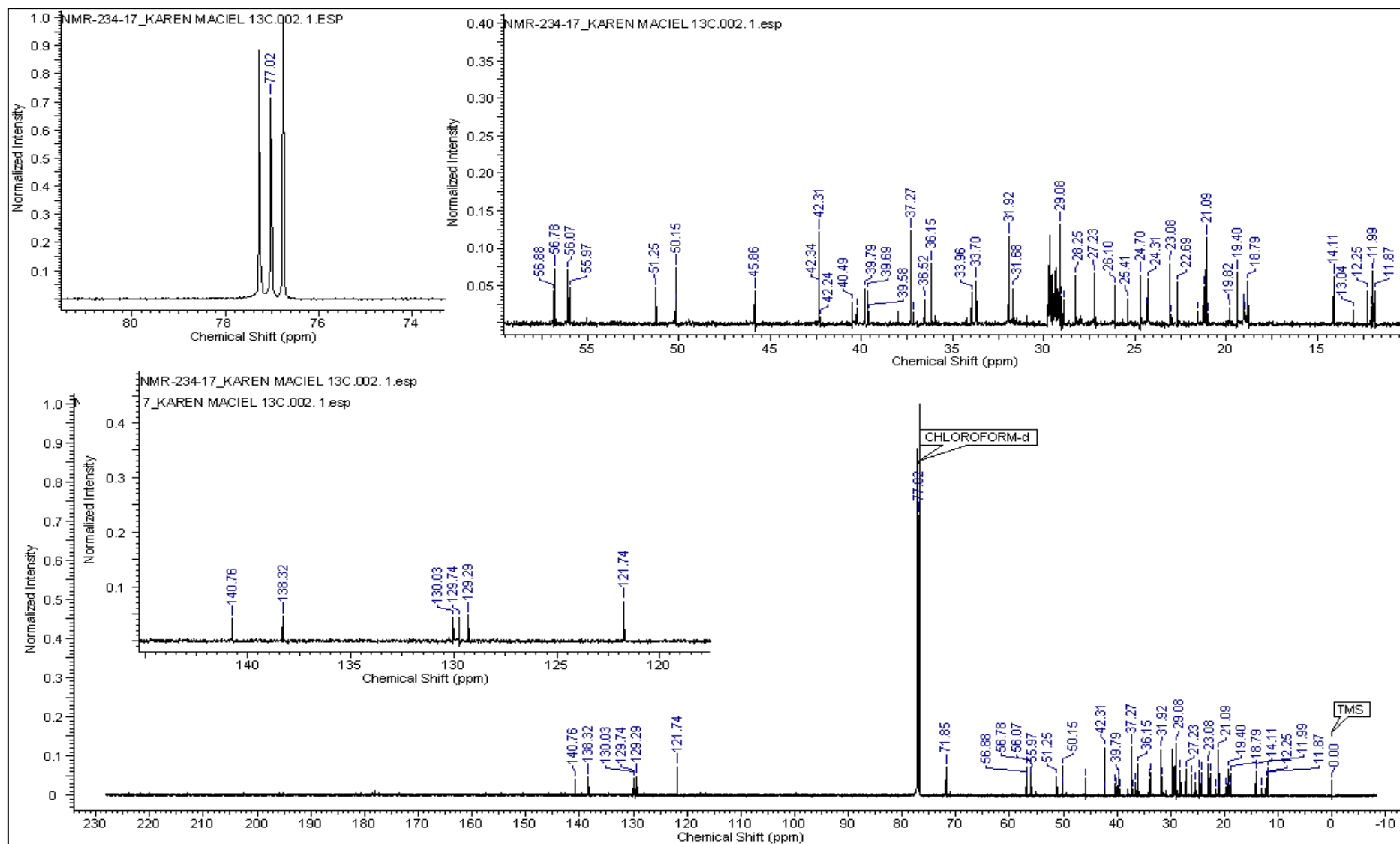


Figura 41. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da Fr. 7. Os fragmentos ampliados destacam as regiões de  $\delta$  típicas de esqueleto esteroidal.

Na análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 41), verificou-se a presença dos sinais em  $\delta_{\text{CH}}$  140,76 e 121,74 que são referentes aos carbonos metínicos (C5-C6) e o sinal em  $\delta_{\text{CH}}$  71,7 referente ao carbono carbinólico (C3) da estrutura básica dos esteroides.

A diferença entre os dois esteróis consiste na dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 na cadeia lateral da molécula de estigmasterol. No espectro de carbono, os sinais em  $\delta_{\text{CH}}$  138,32 (C-22) e 129,29 (C-23) são atribuídos aos carbonos metínicos da cadeia lateral de estigmasterol. O sinal em  $\delta_{\text{CH}}$  77,02 (triplete) refere-se ao sinal do clorofórmio deuterado,  $\text{CDCl}_3$ , solvente utilizado para solubilização da amostra.

A Figura 43 mostra o espectro de RMN 2D HSQC com as correlações características dos esteroides: carbono carbinólico entre H-3/C-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3,54/  $\delta_{\text{C}}$  71,74) e as ligações insaturadas entre H-6/C-6 ( $\delta_{\text{H}}$  5,35/  $\delta_{\text{C}}$  121,71), H-22/C-22 ( $\delta_{\text{H}}$  5,15/  $\delta_{\text{C}}$  138,32), H-23/C-23 ( $\delta_{\text{H}}$  5,02/  $\delta_{\text{C}}$  129,29). A Figura 44 mostra o espectro de RMN 2D HMBC com os assinalamentos dos carbonos e hidrogênios correlacionados.

Os valores obtidos pelos espectros de RMN uni e bidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC) em comparação com a literatura (Cayme e Ragasa, 2004) permitiram realizar o assinalamento dos sinais correlacionados e alguns deles podem ser observados na Figura 42.

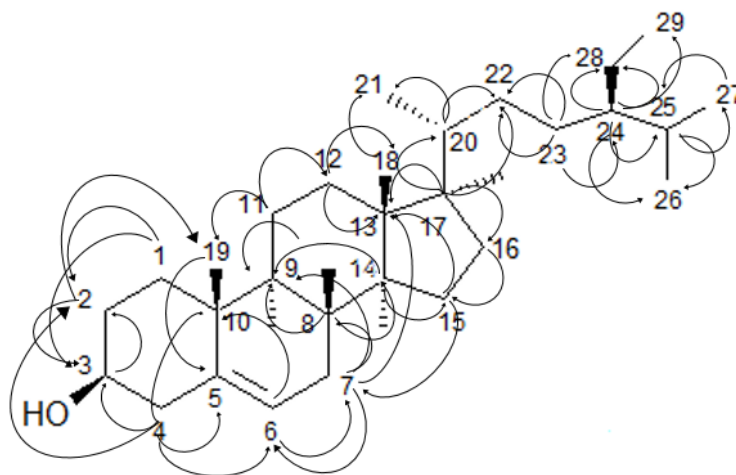


Figura 42. Algumas correlações de HMBC para os esteroides

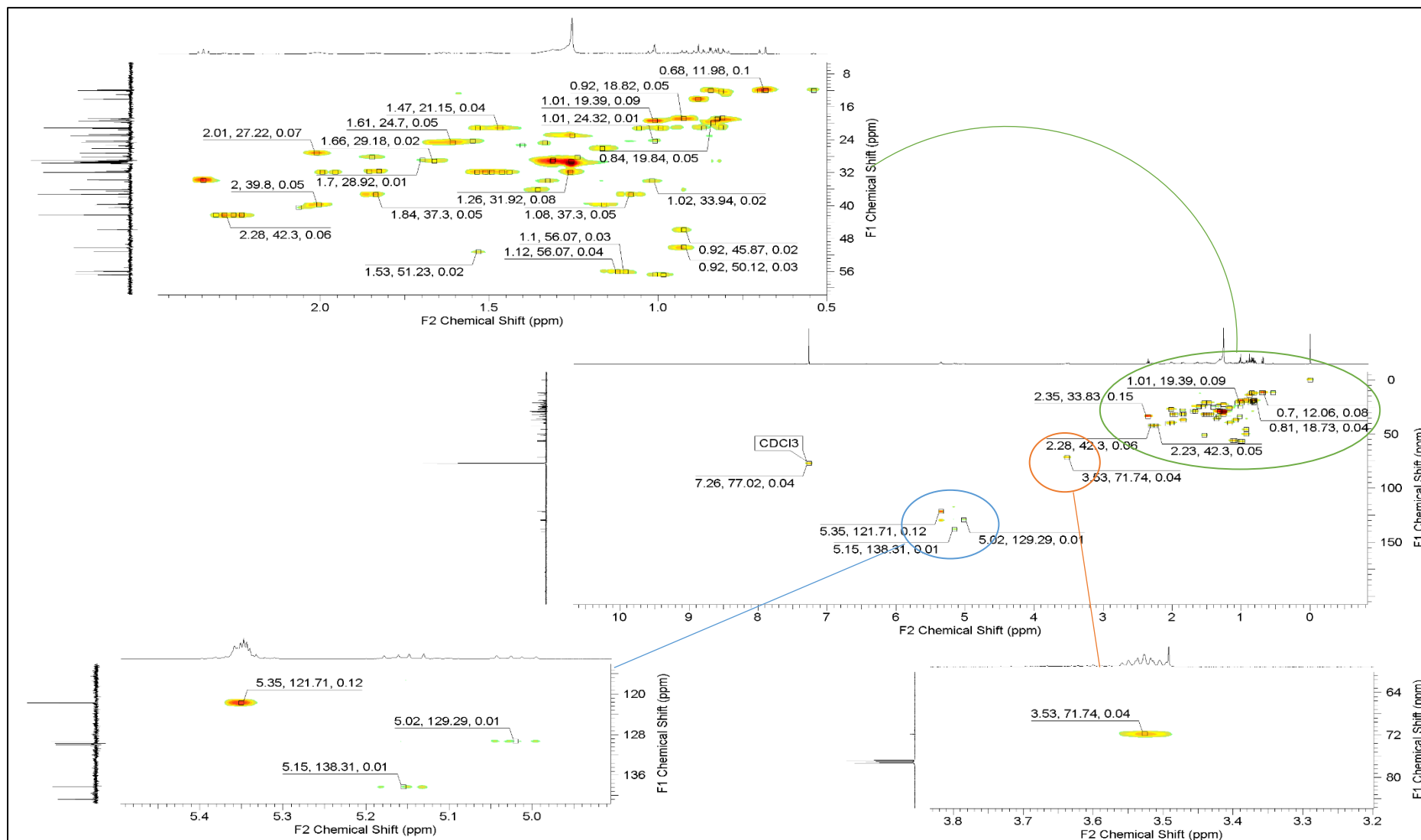


Figura 43. Espectro de RMN 2D HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da amostra F7 FHCP e ampliações das correlações.

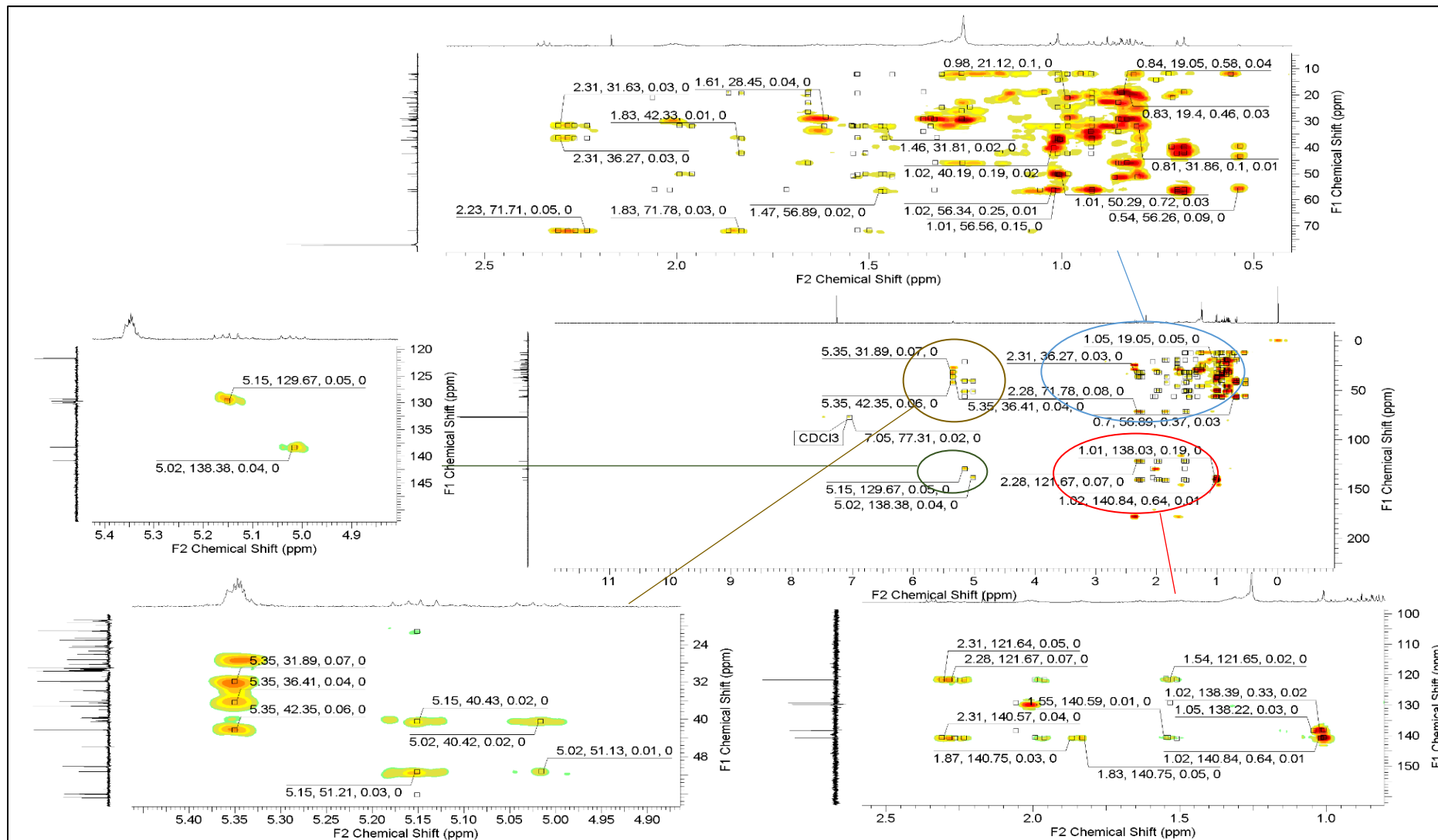


Figura 44. Espectro de RMN 2D HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da amostra F7 FHCP e ampliações das correlações.

Os valores dos sinais correlacionados de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol estão apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

C	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	HMBC
1	37,30	1,08	C2, C3, C5, C9, C10, C19
		1,83	C3, C5, C9, C10, C19
2	31,67	1,49	C3
		1,85	C3, C5, C19
3	71,74	3,53	-
4	42,3	2,26	C2, C3, C5, C6, C10
		2,28	C2, C3, C5, C6, C10
5	140,76	-	-
6	121,71	5,35	C4, C7, C10
7	31,92	1,54	C5, C6, C8, C9, C13
		1,99	C5, C6, C8, C9
8	31,92	1,46	C7, C9, C10, C14
9	50,12	0,92	C1, C8, C10, C11, C14, C19
10	36,52	-	-
11	21,15	1,47	C8, C9, C14
		1,53	C4, C9, C10, C12, C19
12	39,80	1,16	C11, C13, C18
		2,00	C14
13	42,24	-	-
14	56,78	1,01	C7, C8, C9, C13, C15, C18
15	24,70	1,34	C7, C8, C13
		1,61	C8, C16
16	28,24	1,26	C15
17	56,07	1,10	C13, C14, C15, C16, C18, C20, C21, C22
18	11,98	0,68	C12, C13, C14, C17, C21
19	19,39	1,01	C1, C4, C5, C9, C10
20	35,13	1,36	C21, C22, C25
21	18,82	0,92	C12, C13, C17, C18, C22
22	33,93	1,33	C17, C20, C23, C24
23	26,10	1,17	C24, C28
24	45,87	0,92	C25, C26, C28, C29
25	29,18	1,66	C23, C24, C26, C27, C28
26	19,05	0,83	C24, C25, C27
27	19,84	0,84	C24, C25, C26
28	22,98	1,26	C23, C24, C25, C29
29	11,98	0,85	C22, C24, C25, C28

Tabela 15. Correlações HSQC e HMBC para o  $\beta$ -sitosterol.

C	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	HMBC
1	37,30	1,08	C2, C3, C5, C9, C10, C19
		1,83	C3, C5, C9, C10, C19
2	31,67	1,49	C3
		1,85	C3, C5, C19
3	71,74	3,53	-
4	42,3	2,23	C2, C3, C5, C6, C10
		2,28	C2, C3, C5, C6, C10
5	140,76	-	-
6	121,71	5,35	C4, C7, C10
7	31,92	1,51	C5, C6, C8, C9, C13
		1,96	C5, C6, C8, C9
8	31,92	1,46	C7, C9, C10, C14
9	50,12	0,92	C1, C8, C10, C11, C14, C19
10	36,52	-	-
11	21,15	1,47	C8, C9, C14
		1,53	C4, C9, C10, C12, C19
12	39,80	1,16	C11, C13, C18
		2,00	C14
13	42,24	-	-
14	56,89	0,98	C8, C9, C11, C13, C15, C16, C18
15	24,32	1,01	C8, C14, C18, C22
		1,55	C16, C8
16	28,92	1,31	C15, C18
		1,70	C17
17	56,07	1,12	C13, C14, C16, C18, C20, C21, C22
18	12,06	0,70	C12, C13, C14, C17, C21
19	19,39	1,01	C1, C4, C5, C9, C10
20	40,48	2,06	C17, C22, C23
21	21,19	1,06	C17, C22
22	138,31	5,15	C20, C21, C23, C24, C27
23	129,29	5,02	C20, C22, C24
24	51,23	1,53	C23, C25, C29
25	31,92	1,44	C24, C29
26	21,19	0,86	C24, C25, C27
27	18,79	0,81	C24, C25, C29
28	26,10	1,17	C24, C26, C29
29	12,25	0,81	C24, C25, C28

Tabela 16. Correlações HSQC e HMBC para o estigmasterol.

#### 5.4.2. Fração em acetato de etila de sementes (FASP)

A fração em acetato de etila é oriunda da partição do extrato etanólico de sementes, sendo considerada ativa em testes antibacterianos contra *Staphylococcus aureus*, *Staphulococcus aureus* resistente a metilina e *Shigella flexneri*. O perfil cromatográfico da fração pode ser observado na Figura 45. A placa foi realizada em fase reversa eluída em água: ácido fórmico 1% e acetonitrila na proporção 80:20% revelada em luz ultravioleta UV-366 nm e UV-254 nm e com os reveladores vanilina e cloreto férrico.

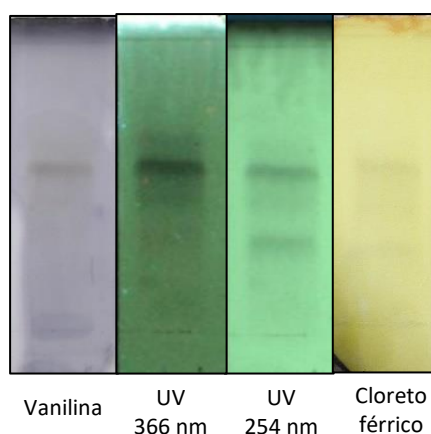


Figura 45. Placas cromatográficas da fração FASP revelada em diferentes reveladores.

Para informações adicionais e melhor conhecimento da amostra, a fração FASP também analisada por espectrometria de massas. Os espectros foram obtidos usando a fonte eletrospray (ESI), analisador de *íon-trap* e operando no modo positivo (Figura 46) e negativo (Figura 47). A amostra foi injetada por inserção direta com fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , com varredura entre  $m/z$  100 a 1000 Da. Para processamento de dados foi utilizado o Programa Xcalibur 2,0.

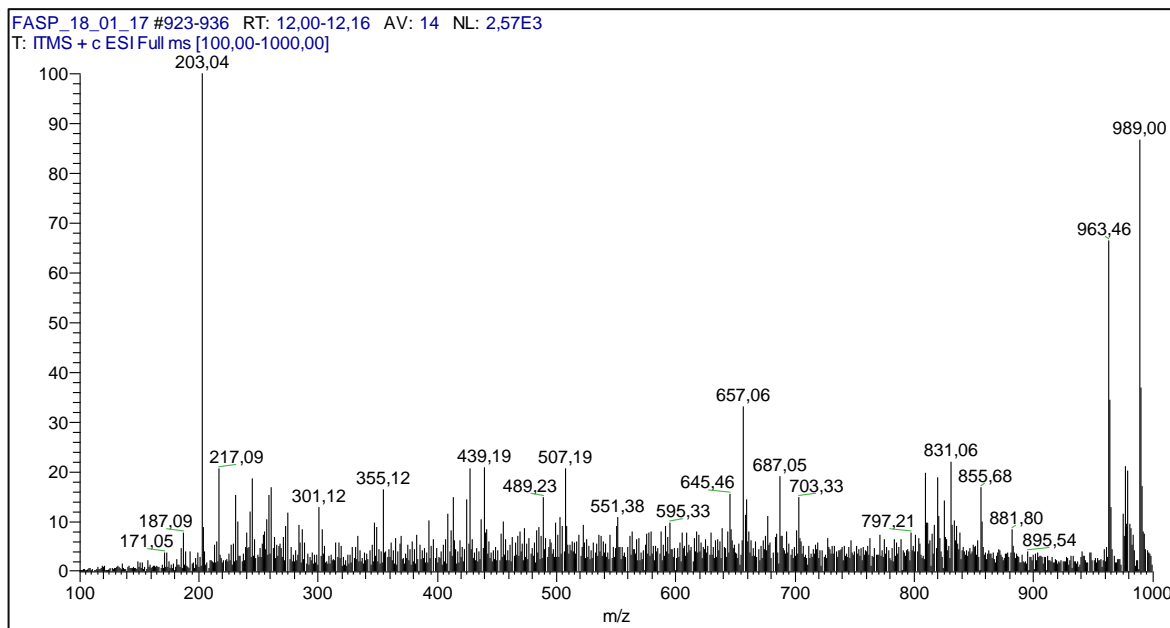


Figura 46. Espectro ESI/MS de FASP em modo positivo.

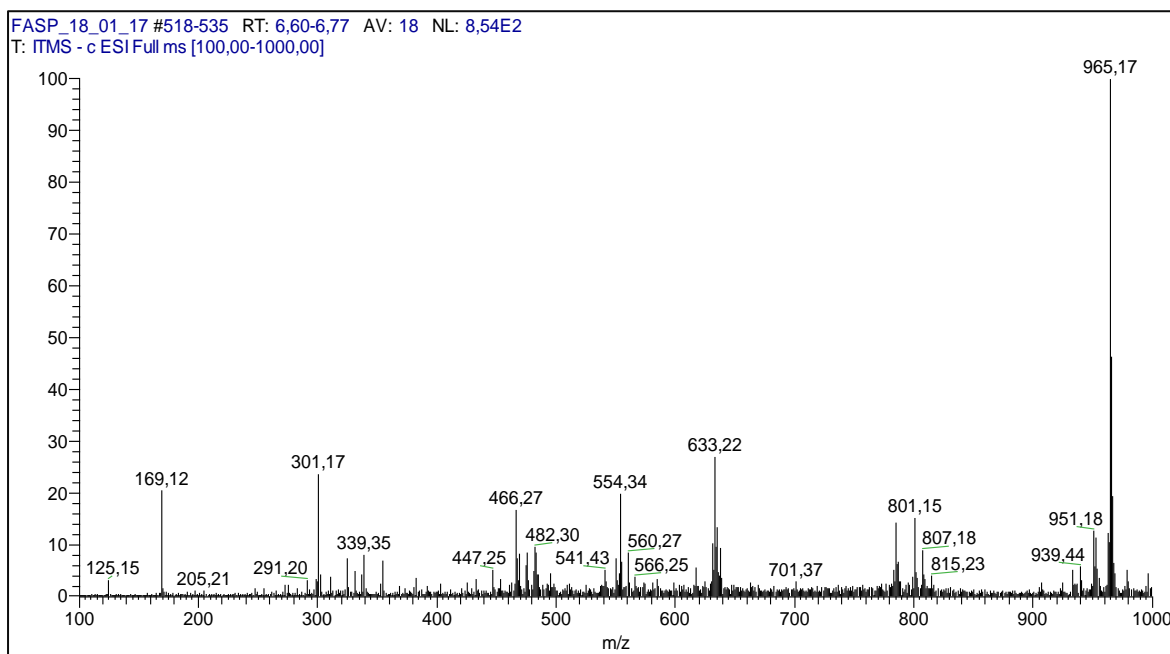


Figura 47. Espectro ESI/MS de FASP em modo negativo.

Os espectros fornecem picos com diferentes massas cargas ( $m/z$ ) e a fragmentação desses picos sugerem os perfis das substâncias presentes como ácidos fenólicos, incluindo os derivados de ácido gálico e ácido elágico.



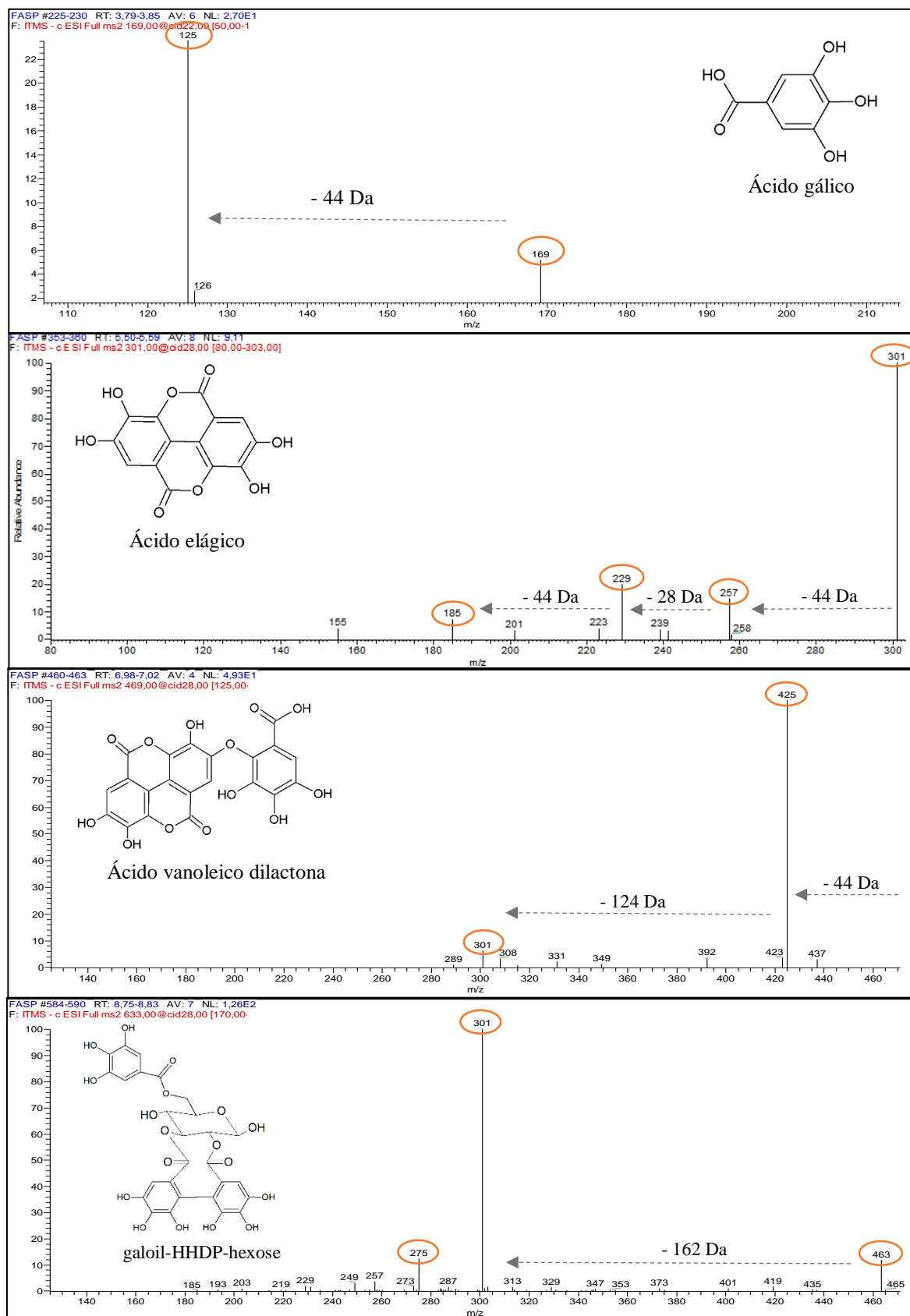


Figura 48. Fragmentação dos íons  $m/z$  169, 301, 469, 633.

Em comparação com as fragmentações dos dados literários, detectou-se os seguintes ácidos fenólicos: ácido gálico como íon  $[M - H]^-$   $m/z$  169 e o fragmento em  $m/z$  125  $[M - H - 44]^-$  devido à perda de  $CO_2$ ; ácido elágico  $m/z$  301  $[M - H]^-$  e fragmentos em  $m/z$  257  $[M - H - 44]^-$ ,  $m/z$  229  $[M - H - 28]^-$  e  $m/z$  184  $[M - H - 44]^-$  provenientes das perdas de duas unidades de  $CO_2$  e uma unidade de  $CO$ ; ácido valoneico dilactona  $m/z$  469  $[M - H]^-$  e fragmentos em  $m/z$  425  $[M - H - 44]^-$  proveniente da perda de  $CO_2$ ,  $m/z$  301  $[M - H - 124]^-$  pela perda de uma fração do ácido gálico; galoil-HHDP-hexose em  $m/z$  633  $[M - H]^-$  e os fragmentos em  $m/z$  463  $[M - H - 170]^-$ , 301  $[M - H - 162]^-$  devido à perda de ácido gálico seguida da perda de uma unidade de uma hexose (Figura 48) (Chisté e Mercadante, 2012; Mullen et al., 2003; Mena et al., 2012; Boulekbache-Makhlouf et al., 2012).

Com base nas análises de CCD e EM, a fração FASP foi analisada por CLAE analítico usando uma coluna Luna fenil – hexil, 150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, da marca Phenomenex, A amostra foi injetada numa concentração de 1 mg/mL e fluxo de 1 ml/min. As fases móveis utilizadas foram água (solvente A) e metanol (solvente B) com gradiente de 20 a 60% de B em 20 minutos e 60 a 100% em 4 minutos, permanecendo em 100% por 10 minutos, totalizando 34 minutos de corrida. Na Figura 49 é apresentado o cromatograma da análise por CLAE analítico e observou-se melhor seletividade nos comprimentos de onda 280 e 300 nm, sendo os comprimentos escolhidos para a análise semi-preparativa.

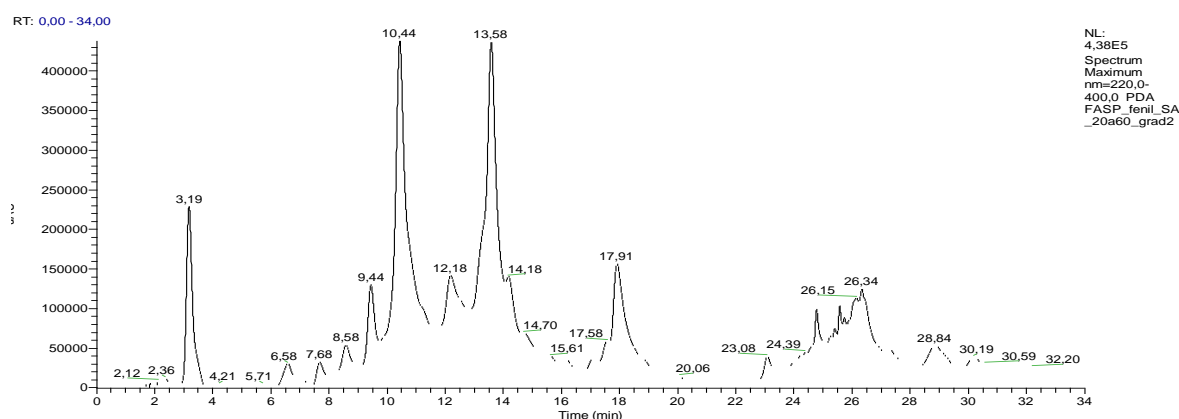


Figura 49. Cromatograma da fração FASP em CLAE/DAD.

A amostra foi submetida ao fracionamento em escala semi-preparativa utilizando metanol (B) e água (A) como fases móveis e eluição em gradiente 20 a 60% de B em 20 minutos e 60 a 100% em 5 minutos, permanecendo em 100% por 10 minutos, totalizando 35 minutos de corrida, o que resultou na coleta de 12 frações, mostradas na Figura 50. Cada injeção continha 30 mg da fração FASP solubilizados em 150  $\mu$ L de DMSO, foram realizadas 11 corridas utilizando 330 mg da fração.

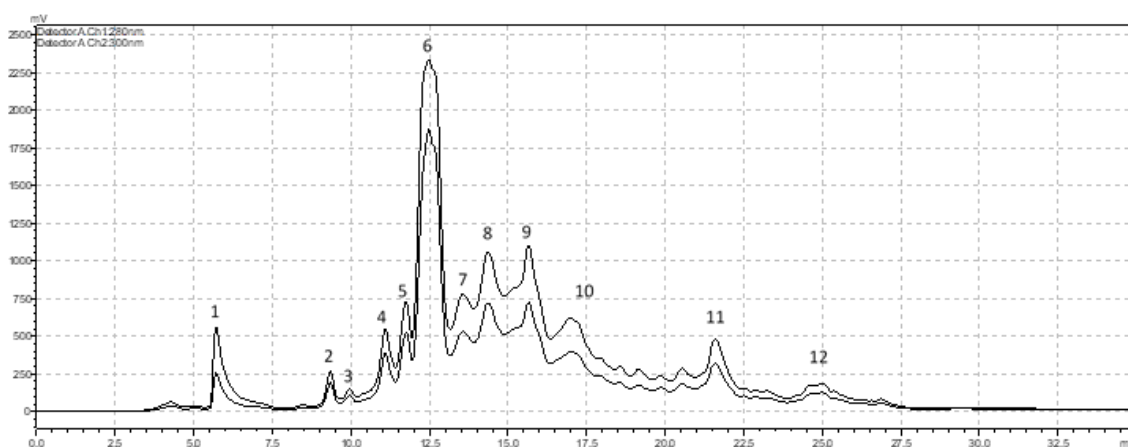


Figura 50. Cromatograma das 12 frações obtidas da Fração FASP em CLAE semi-preparativo.

Na Tabela 17 são apresentados os rendimentos das frações obtidas no fracionamento. As doze frações foram encaminhadas para a Fiocruz para avaliação da atividade biológica, onde as mesmas não apresentaram atividade relevante.

Frações	Massa (mg)
1	7
2	3
3	3
4	8,8
5	8
6	55
7	10
8	28
9	19
10	22
11	7,5
12	2

Tabela 17. Rendimentos das frações de FASP por CLAE semi-preparativo.

A partir dos dados espectrais pôde-se observar sinais característicos dos derivados de ácidos elágico e gálico, no entanto somente a fração FASP 11 pode ser identificada em comparação com a literatura.

O espectro de massa do pico 11 (Figura 51) revelou íon molecular de  $m/z$  447 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>, seguido de um pico em  $m/z$  301 [ $M - H - 146$ ]<sup>-</sup>, devido à perda de um resíduo de açúcar (ramnose) (Chisté e Mercadante, 2012).

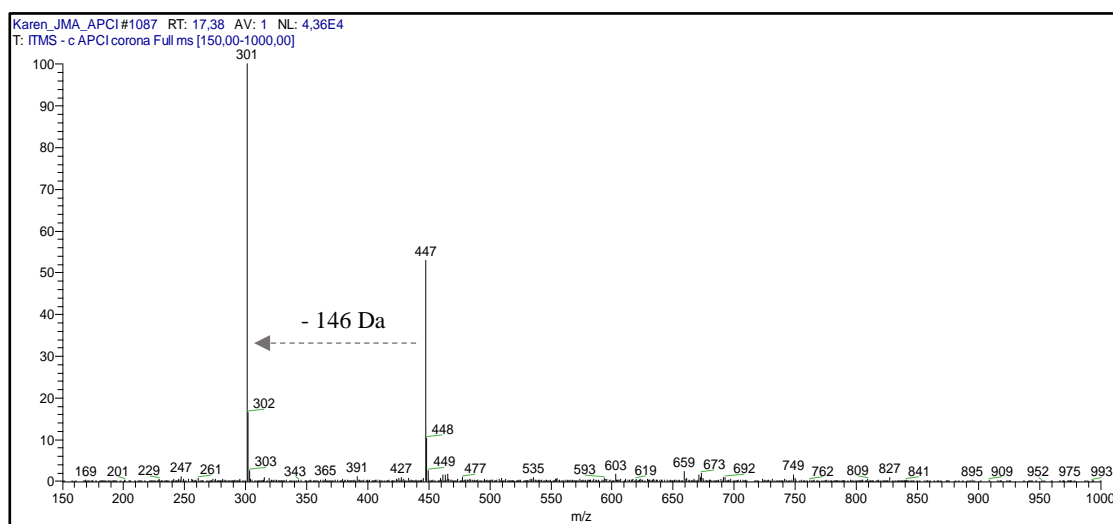


Figura 51. Espectro de MS da fração FASP 11 ( $m/z$  447)

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da FASP 11 (Figura 52) apresentou sinais típicos de aromáticos: sinal em  $\delta$  160,23 que é característico de éster cíclico; sinais em  $\delta$  148,21, 139, 97 e 136,37, região que compreende os carbonos aromáticos oxigenados; sinais em  $\delta$  112,81, 110, 27 e 107,94 referentes aos carbonos aromáticos não substituídos. Além de um sinal  $\delta$  100,85 atribuído a carbono terciário e um sinal em  $\delta$  16,96 na região de carbonos metílicos (Li et al., 1999; Djoukeng et al., 2007).

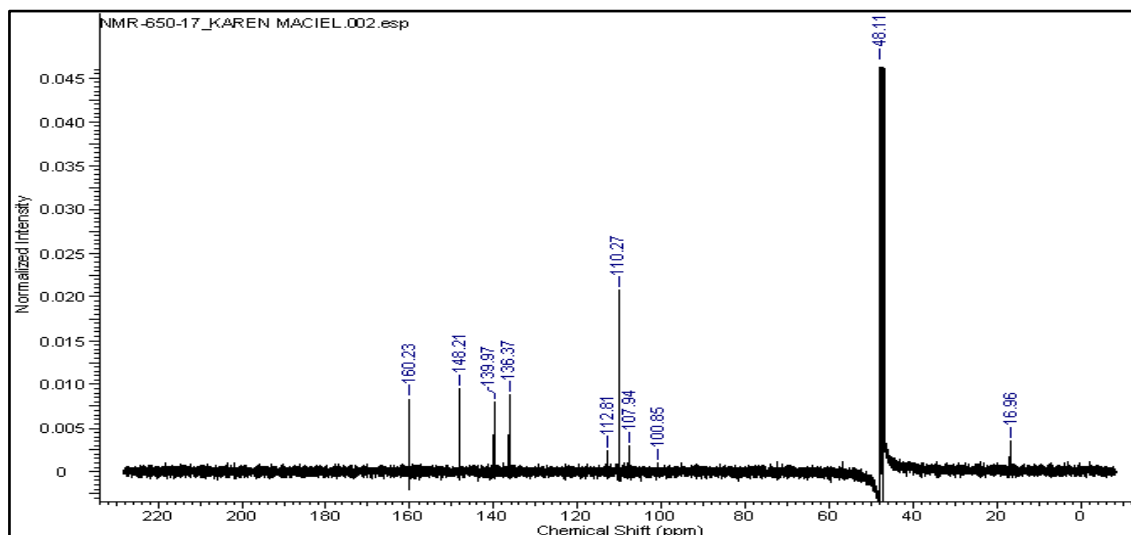


Figura 52. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) da FASP 11.

O espectro bidimensional HSQC da FASP 11 (Figura 53 e 54) mostra as correlações observadas entre  $\delta_{\text{H}}$  7,92 e  $\delta_{\text{C}}$  112,31 e,  $\delta_{\text{H}}$  7,55 e  $\delta_{\text{C}}$  110,19 que são atribuídas às ligações terciárias de anéis aromáticos. Observou-se também as correlações entre  $\delta_{\text{H}}$  5,59 e  $\delta_{\text{C}}$  110,20;  $\delta_{\text{H}}$  3,53 e  $\delta_{\text{C}}$  72,35;  $\delta_{\text{H}}$  4,01 e  $\delta_{\text{C}}$  70,60;  $\delta_{\text{H}}$  3,65 e  $\delta_{\text{C}}$  70,10;  $\delta_{\text{H}}$  3,76 e  $\delta_{\text{C}}$  69,66;  $\delta_{\text{H}}$  1,19 e  $\delta_{\text{C}}$  16,93 característicos de açúcares (Li et al., 1999; Nawwar et al., 1994).

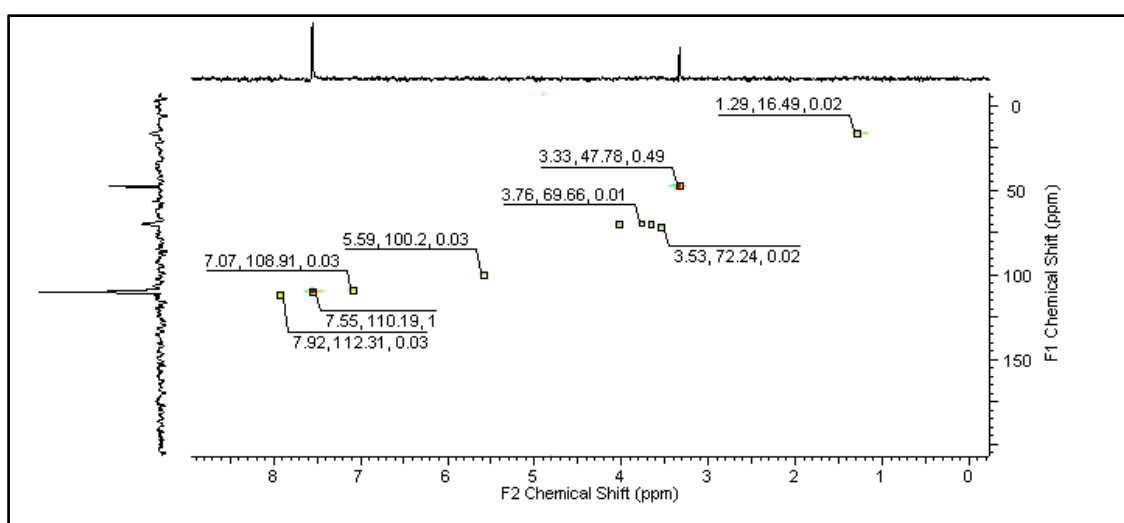


Figura 53. Espectro de RMN HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) da FASP 11.

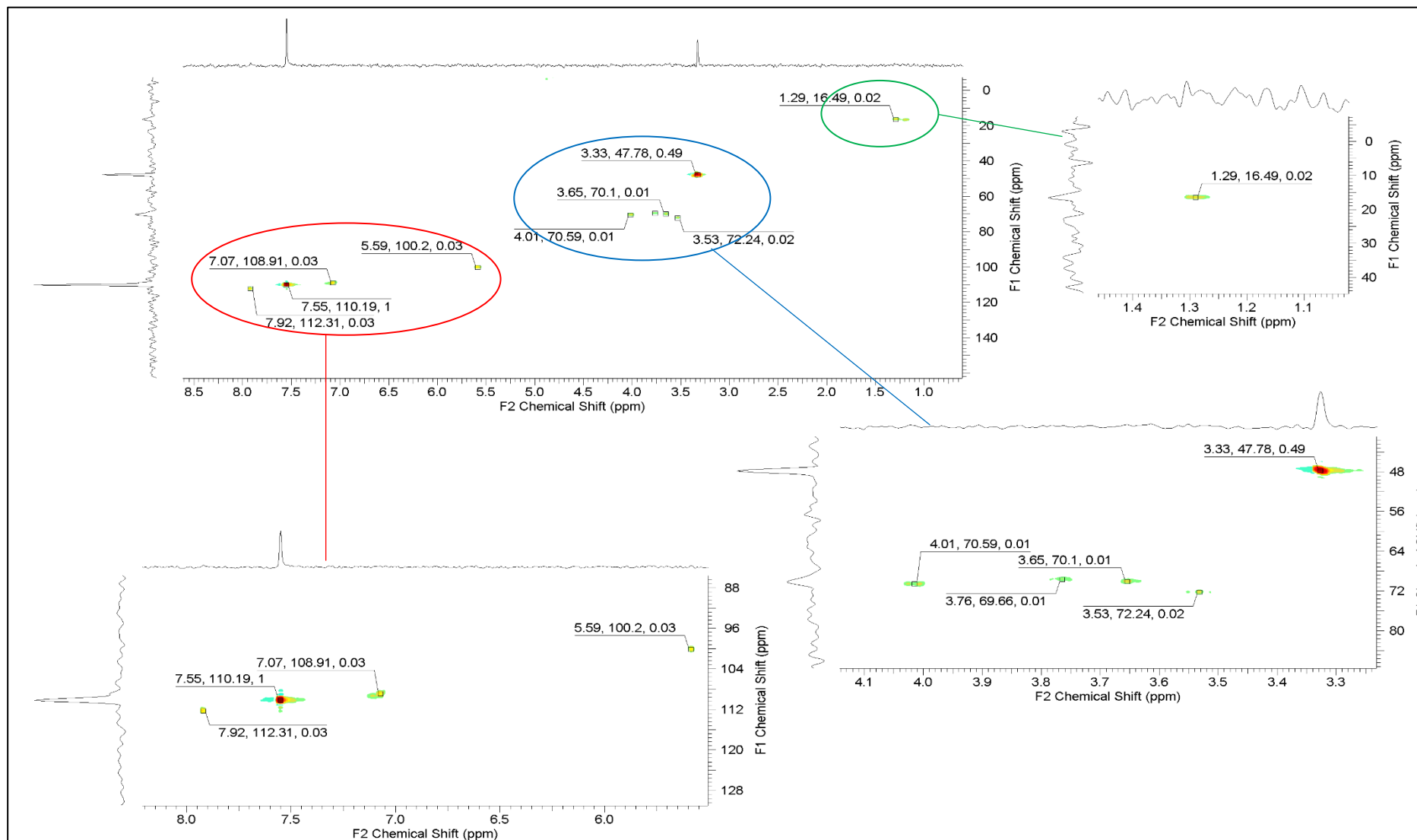
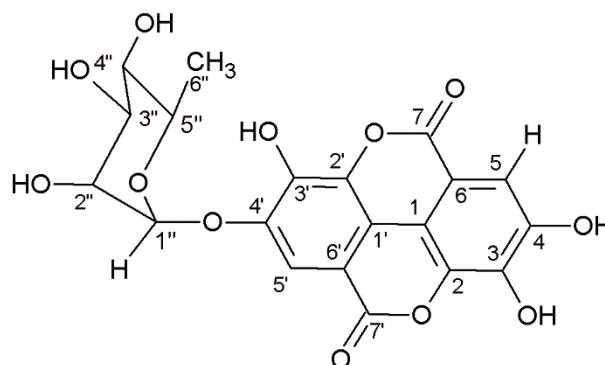


Figura 54. Ampliação das correlações de HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) de FASP 11.

Os dados dos espectros de EM e RMN de  $^{13}\text{C}$  e HSQC (Tabela 18) em comparação com a literatura (Li et al., 1999; Djoukeng et al., 2007) permitiram identificar a fração 11 como ácido elágico ramnosídeo (Figura 55).



Ácido elágico ramnosídeo ( $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_{12}$ )  
MM = 448,33 g/mol

Figura 55. Estrutura do ácido elágico ramnosídeo

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
<b>1</b>	-	112,81	<b>4'</b>	-	148,21
<b>2</b>	-	136,37	<b>5'</b>	7,92	110,19
<b>3</b>	-	139,97	<b>6'</b>	-	107,94
<b>4</b>	-	148,21	<b>7'</b>	-	160,23
<b>5</b>	7,55	110,19	<b>1''</b>	5,59	100,20
<b>6</b>	-	107,94	<b>2''</b>	4,01	70,60
<b>7</b>	-	160,23	<b>3''</b>	3,65	70,10
<b>1'</b>	-	112,81	<b>4''</b>	3,76	69,66
<b>2'</b>	-	136,37	<b>5''</b>	3,53	72,35
<b>3'</b>	-	139,97	<b>6''</b>	1,19	16,93

Tabela 18. Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) da fração 11.

### 5.4.3. Extrato metanólico de cascas e sementes (EMCP/EMSP)

Os extratos metanólicos de cascas e sementes foram considerados ativos em testes antibacterianos contra a bactéria *Shigella flexneri*. São oriundos da extração sequenciada em hexano, acetato e metanol. Mesmo sendo extraídos com solventes menos polares, por serem extratos com matriz mais complexa, optou-se por realizar extração em fase sólida (SPE) antes de analisar no CL/EM para remoção de interferentes e/ou partículas que poderiam ficar retidas na coluna do equipamento.

O sistema de SPE utilizada é mostrada na Figura 56 e na saída da cuba é introduzida uma mangueira da bomba de vácuo. Para confecção dos cartuchos, utilizou-se 3g de sílica em fase normal para ambos os extratos e colocadas nas seringas. Após lavagem e condicionamento da coluna com água e metanol, 5 g da amostra foi solubilizada em 1 mL de metanol e foi colocada dentro do cartucho e foi aspirada pelo vácuo. Primeiramente colocou-se o solvente hexano para eluição dos interferentes e depois utilizou-se água e metanol como fase móvel para remoção das substâncias de interesse, as mais polares.

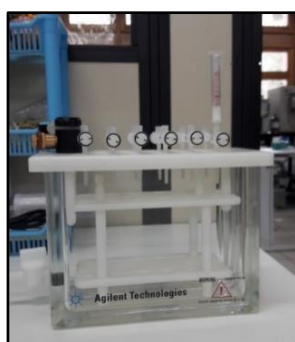


Figura 56. Sistema de extração para SPE.

Após secagem dos extratos, pesou-se 1 mg e solubilizou-se em 1 mL para realização de análise em CL/EM. As mesmas foram realizadas no LTQPN/INPA utilizando o cromatógrafo um cromatógrafo UFLC, modelo Prominence (Shimadzu) e um espectrômetro do tipo *time of flight*, modelo microTOF-Q II da marca Bruker, dotado de uma fonte de ESI



(modo negativo) monitorando a faixa de  $m/z$  50 a 900. Utilizou-se uma coluna Shim-pack XR-ODS (50 mm x 2.0 mm, tamanho de partícula 2.2  $\mu\text{m}$ ) com fluxo de 0,4 mL/min.

As fases móveis utilizadas foram água com ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila com ácido fórmico 0.1% (B) em modo de eluição gradiente mostrado na Tabela 19.

Tempo de corrida	% B
0 – 2 min	2,5%
2 – 28 min	2,5 – 15%
28 – 44 min	15 – 40%
44 – 46 min	40 – 100%
46 – 48 min	100%
48 – 50 min	100 – 2,5%
50 – 52 min	2,5%

Tabela 19. Modo de eluição CL/EM.

Como referência, os padrões de ácido gálico e elágico foram injetados na concentração de 1 mg/mL, os cromatogramas e os espectros do ácido gálico estão apresentados nas Figuras 57 e 58 e os do ácido elágico nas Figuras 59 e 60.

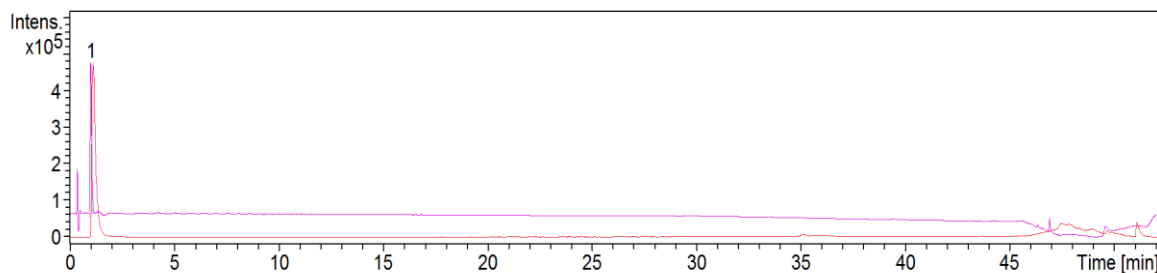


Figura 57. Cromatograma do padrão de ácido gálico CL/EM.

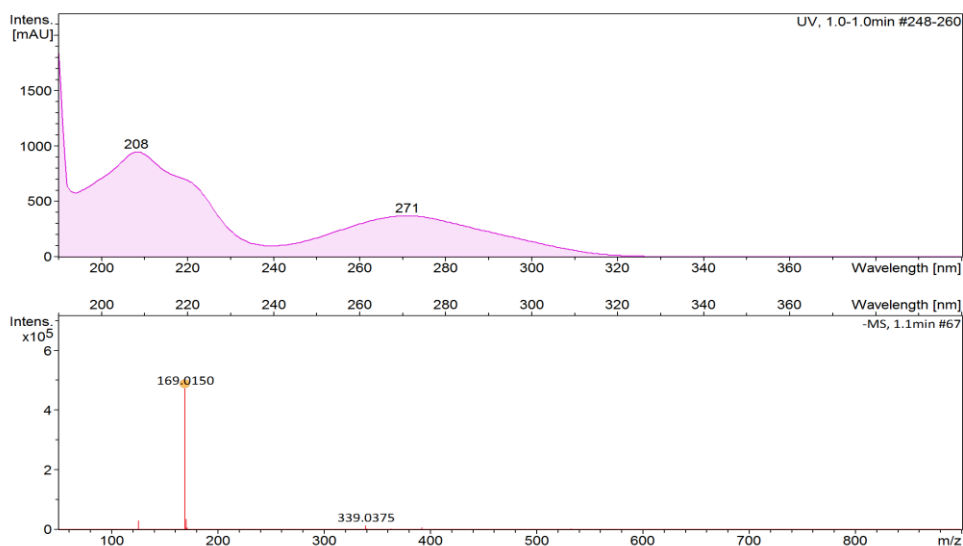


Figura 58. Espectros de ultravioleta (em cima) e de massas (embaixo) do padrão de ácido gálico.

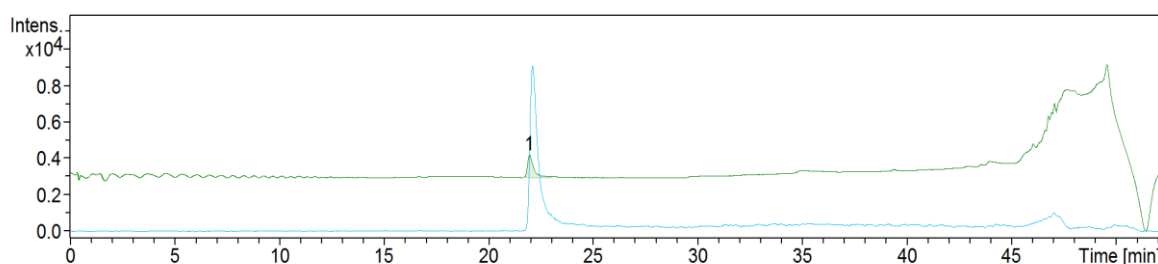


Figura 59. Cromatograma do padrão de ácido elágico CL/EM.

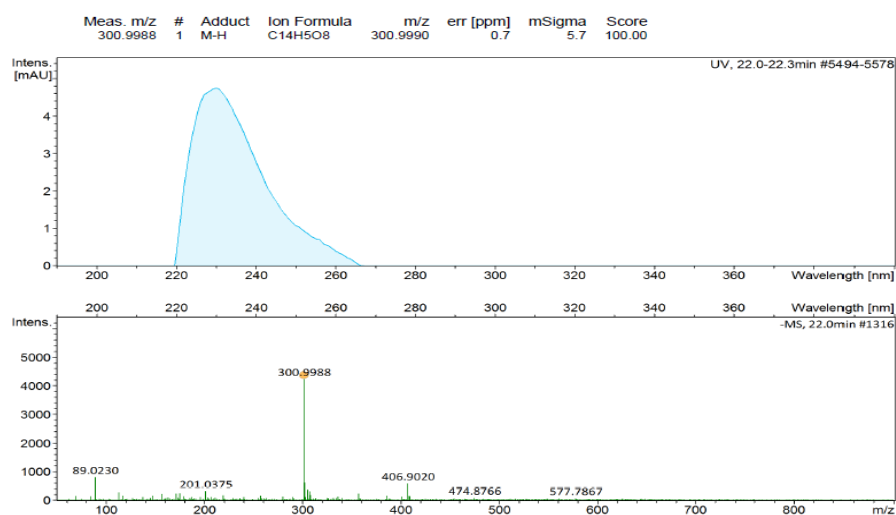


Figura 60. Espectros de ultravioleta (em cima) e de massas (embaixo) do padrão de ácido elágico.

O cromatograma do ácido gálico em UV-254 nm detectou o pico no início da corrida, com tempo de retenção de 1 min, no espectro de massas apresentou  $m/z$  169, enquanto que o ácido elágico apresentou o pico com tempo de retenção de 22 min. e no espectro de massas apresentou  $m/z$  301.

Sequencialmente, os dois extratos foram injetados nas mesmas condições cromatográficas. Na Figura 61 está exibido o cromatograma UV – 254 nm com sobreposição dos picos dos extratos EMCP (linha azul) e EMSP (linha vermelha). Por se tratar de extrato, conseqüentemente, há complexidade química e são detectados picos cromatográficos ao longo de toda a análise.

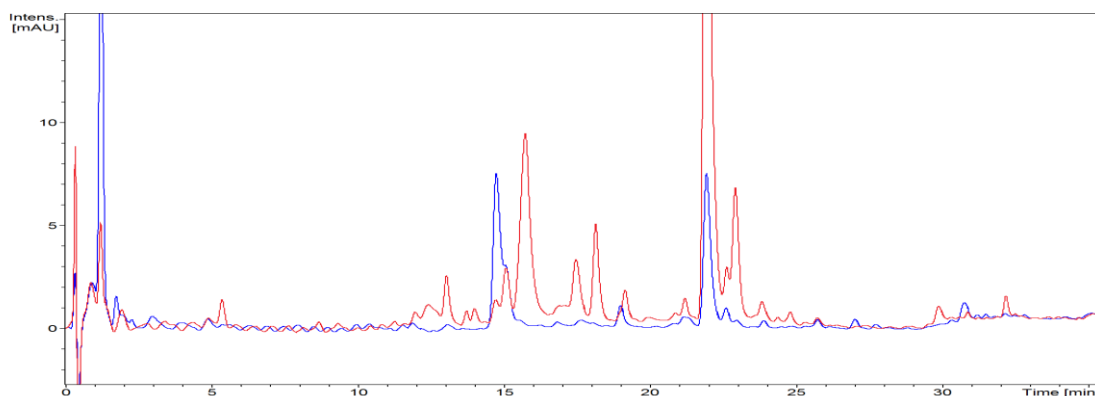


Figura 61. Cromatograma de sobreposição dos picos dos extratos EMCP e EMSP.

Observa-se picos sobrepostos na zona de tempo de retenção entre 1 a 2 minutos e 20 a 26 minutos, tempos que abrangem os picos dos padrões de ácido gálico e ácido elágico. As intensidades de absorção dos picos são diferentes, podendo estarem em concentrações maiores ou menores nesse comprimento de onda para cada extrato. Nas Figuras 62 e 63 pode-se observar os cromatogramas de EMCP e EMSP, respectivamente, com os picos cromatográficos selecionados.

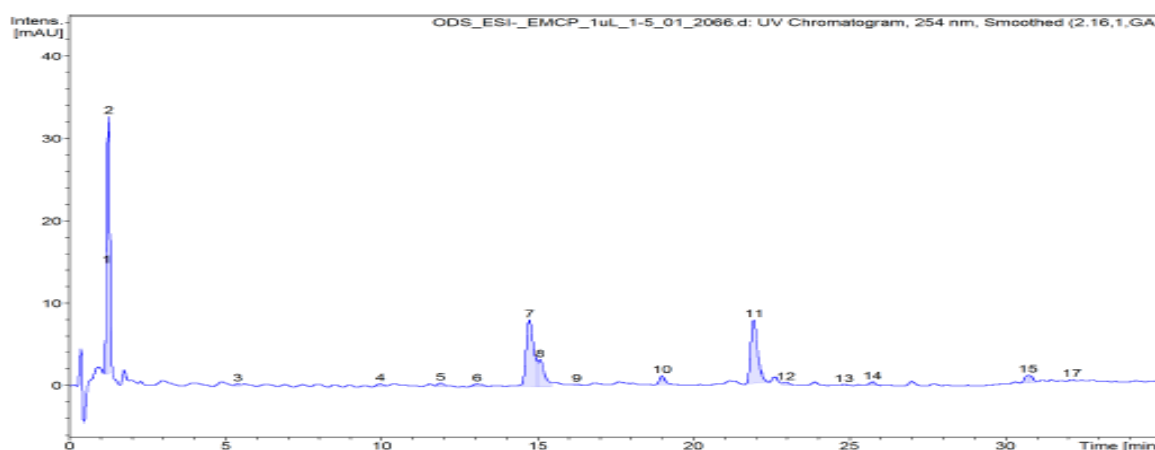


Figura 62. Cromatograma de EMCP em CL/EM.

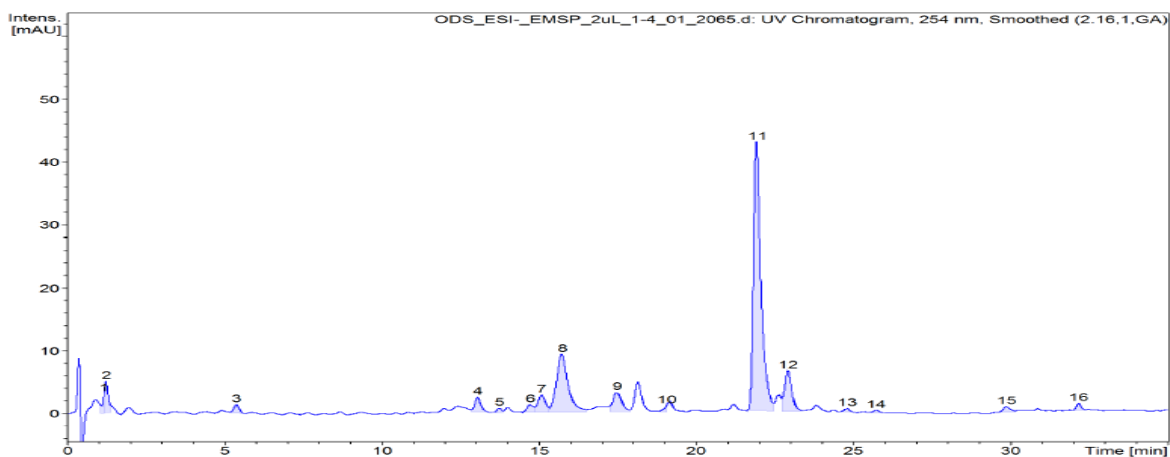


Figura 63. Cromatograma de EMSP em CL/EM.

Os picos cromatográficos enumerados de cada extrato foram sumarizados e expostos nas Tabelas 20 e 21.

	$t_R$ (min)	$[M - H]^-$ calc. ( $m/z$ )	Fórmula molecular	$[M - H]^-$ obs. ( $m/z$ )	Erro (ppm)	m Sigma
1	1.2	331.0679	$C_{13}H_{15}O_{10}$	331.0671	-2.6	14
2	1.2	169.0155	$C_7H_5O_5$	169.0142	-7.7	0.8
3	5.4	183.0308	$C_8H_7O_5$	183.0299	-4.8	3.4
4	10.0	277.0360	$C_{13}H_9O_7$	277.0354	-2.1	2.2
5	11.9	197.0455	$C_9H_9O_5$	197.0455	0.3	6.5
		291.0151	$C_{13}H_7O_8$	291.0146	-1.7	2.1
6	13.1	541.0574	$C_{32}H_{13}O_9$	541.0565	-1.7	83.9
7	14.7	469.0042	$C_{21}H_9O_{13}$	469.0049	1.5	2.4
8	15.1	633.0731	$C_{27}H_{21}O_{18}$	633.0733	0.4	5.4
9	16.3	305.0294	$C_{14}H_9O_8$	305.0303	2.9	17.4
10	19.0	801.0756	$C_{34}H_{25}O_{23}$	801.0792	4.5	5.8
			$C_{41}H_{21}O_{18}$	801.0733	-2.8	37.7
11	21.9	300.9990	$C_{14}H_5O_8$	300.9990	-0.1	1.4
12	23.0	447.0560	$C_{20}H_{15}O_{12}$	447.0569	2.1	13.5
13	24.8	785.0788	$C_{41}H_{21}O_{17}$	785.0784	-0.5	38.9
14	25.7	475.0357	$C_{17}H_{15}O_{16}$	475.0366	1.8	27.0
15	30.7	425.0145	$C_{20}H_9O_{11}$	425.0150	1.2	9.5
16	30.8	458.0333	$C_{13}H_{17}O_4$	458.0325	-1.9	12.3
			$C_{18}H_{15}O_2$	458.0365	6.9	32.1
17	32.1	599.0658	$C_{27}H_{19}O_{16}$	599.0679	3.5	20.9
			$C_{34}H_{15}O_{11}$	599.0620	-6.3	37.2

Tabela 20. Dados referentes aos picos selecionados por CL/EM da amostra EMCP.

	$t_R$ (min)	$[M - H]^-$ calc. ( $m/z$ )	Fórmula molecular	$[M - H]^-$ obs. ( $m/z$ )	Erro (ppm)	m Sigma
1	1.2	331.0661	$C_{13}H_{15}O_{10}$	331.0671	3.0	4.6
2	1.2	169.0144	$C_7H_5O_5$	169.0142	-0.8	1.1
3	5.4	183.0303	$C_8H_7O_5$	183.0299	-2.3	2.2
4	13.0	541.0588	$C_{25}H_{17}O_{14}$ $C_{32}H_{13}O_9$	541.0624 541.0565	6.6 -4.2	46.7 82.0
5	13.7	625.1043	$C_{26}H_{25}O_{18}$	625.1046	0.6	25.8
6	14.7	469.0050	$C_{21}H_9O_{13}$	469.0049	-0.3	5.1
7	15.1	633.0744	$C_{27}H_{21}O_{18}$	633.0733	-1.8	11.8
8	15.7	475.0375	$C_{17}H_{15}O_{16}$	475.0366	-2.0	27.6
9	17.5	463.0515	$C_{20}H_{15}O_{13}$	463.0518	0.8	7.5
10	19.1	801.0782	$C_{34}H_{25}O_{23}$	801.0792	1.3	16.0
11	21.9	300.9987	$C_{14}H_5O_8$	300.9990	1.0	2.9
12	22.9	433.0411 447.0569	$C_{19}H_{13}O_{12}$ $C_{20}H_{15}O_{12}$	433.0412 447.0569	0.4 -0.1	4.2 3.9
13	24.8	785.0837	$C_{34}H_{25}O_{22}$	785.0843	0.7	24.7
14	25.7	475.0383	$C_{17}H_{15}O_{16}$	475.0366	-3.6	28.0
15	29.9	585.0544	$C_{26}H_{17}O_{16}$ $C_{19}H_{21}O_{21}$	585.0522 585.0581	-3.7 6.3	5.0 36.0
16	32.2	599.0677	$C_{27}H_{19}O_{16}$	599.0679	0,2	8,6

Tabela 21. Dados referentes aos picos selecionados por CL/EM da amostra EMSP.

Os dados espectrais de massa dos picos cromatográficos comuns aos extratos foram discutidos a seguir em comparação com os dados da literatura.

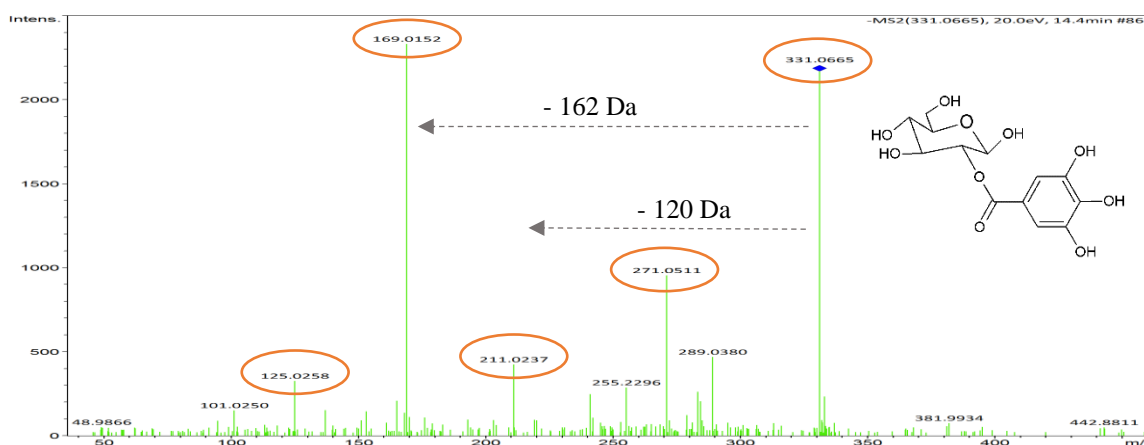


Figura 64. Espectro EM/EM do íon  $m/z$  331.

A análise em EM/EM do íon extraído em  $m/z$  331 (Figura 64) ( $t_R = 1,2$  min.) mostra a presença de fragmentos  $m/z$  271, 211, 169, 125 provenientes da perda neutra de 120 Da ( $m/z$  211) e 162 Da ( $m/z$  169) correspondentes à presença de uma fração de hexose e o ácido gálico, sendo identificado como monogaloil-hexose (Hofmann et al., 2016).

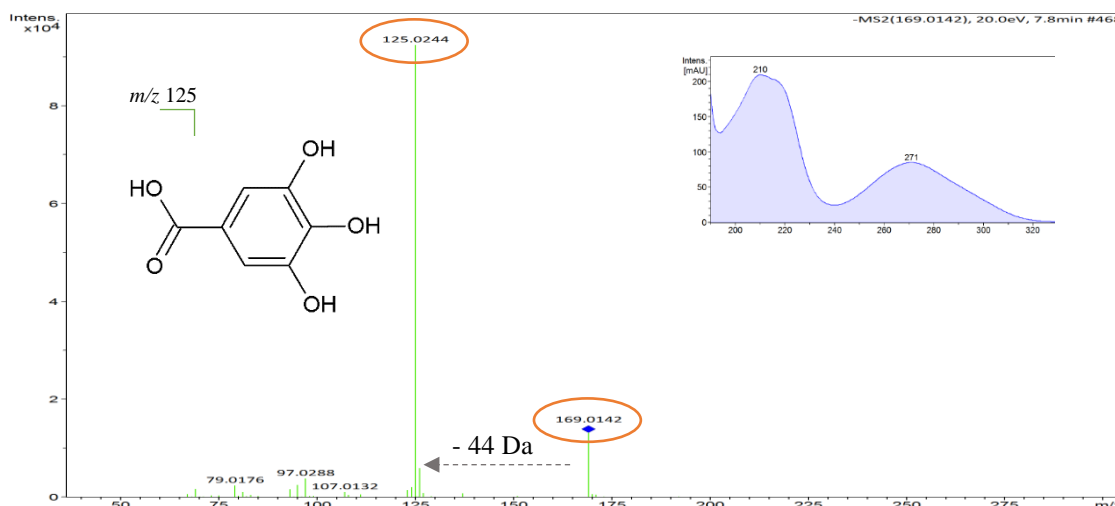


Figura 65. Espectro EM/EM do íon  $m/z$  169.

A análise em EM/EM do íon extraído em  $m/z$  169 (Figura 65) ( $t_R = 1,2$  min.) mostra o fragmento  $m/z$  125, explicado pela perda de uma molécula de  $\text{CO}_2$  correspondente a 44 Da (Chisté e Mercadante, 2012), bem como o espectro de ultravioleta se mostrou semelhante ao perfil do padrão ácido gálico.

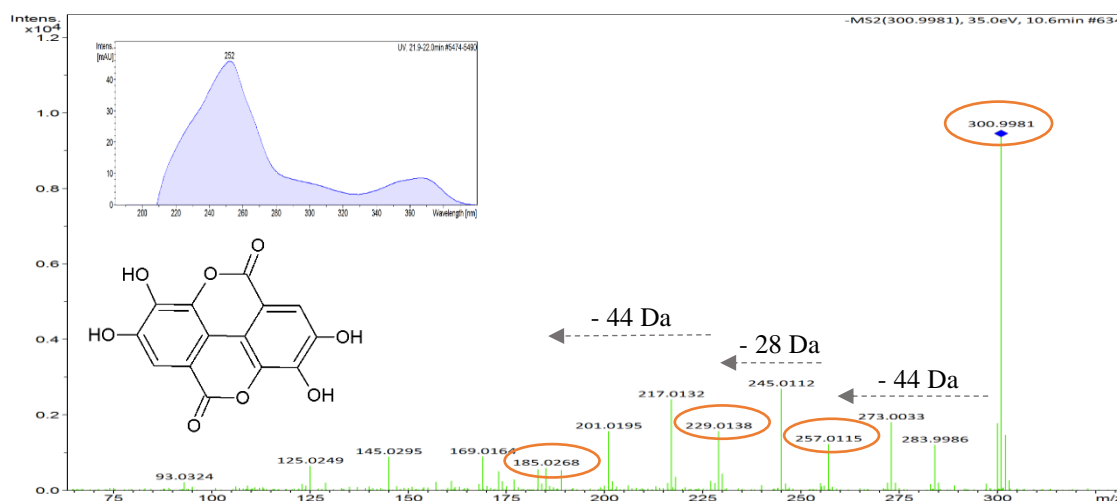


Figura 66. Espectro EM/EM do íon  $m/z$  301.

O pico do íon  $[\text{M} - \text{H}]^-$   $m/z$  301 (Figura 66) mostra o fragmento em  $m/z$  257, explicado pela perda de uma molécula de  $\text{CO}_2$  correspondente a 44 Da, seguida da perda de uma molécula de CO fornecendo o fragmento  $m/z$  229  $[\text{M} - \text{H} - 44 - 28]^-$  e, posteriormente  $m/z$  185  $[\text{M} - \text{H} - 44 - 28 - 44]^-$  devido à perda de outra molécula de  $\text{CO}_2$  (Chisté e

Mercadante, 2012). O espectro de ultravioleta se mostrou semelhante ao perfil do padrão ácido elágico.

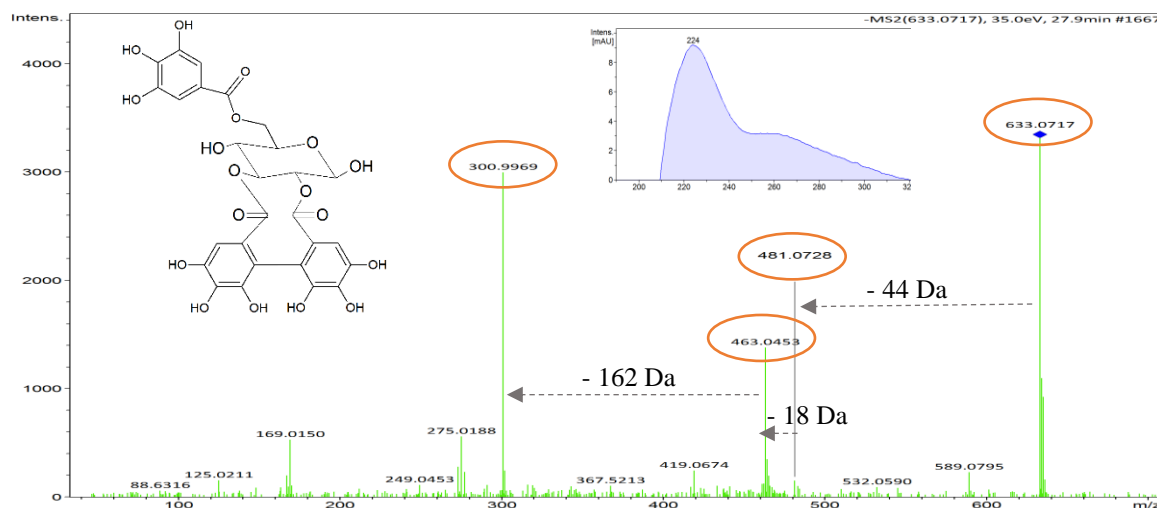


Figura 67. Espectro EM/EM do íon  $m/z$  633.

O pico do íon  $[M - H]^-$   $m/z$  633 (Figura 67) mostra o fragmento EM/EM em  $m/z$  481  $[M - H - 152]^-$  referente à perda do grupo galoil, o fragmento em  $m/z$  463 pode ser sugerido pela perda de uma molécula de água  $[M - H - 152 - 18]^-$ , em  $m/z$  301  $[M - H - 162]^-$  refere-se à perda de uma unidade de hexose, sendo identificado como galoil-HHDP-hexose (Mena et al., 2012).

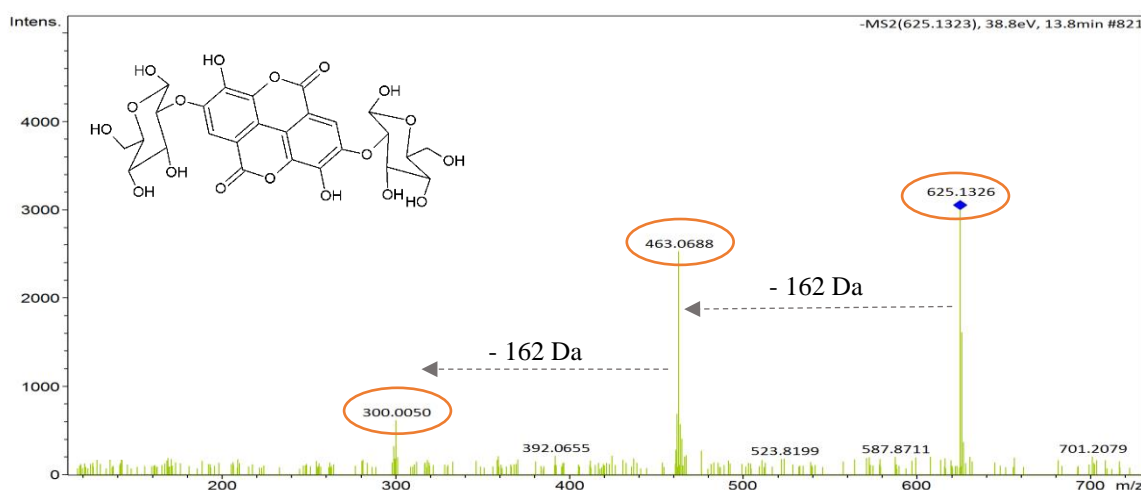


Figura 68. Espectro EM/EM do íon  $m/z$  625.

O pico do íon  $[M - H]^-$   $m/z$  625 (Figura 68) mostra um fragmento EM/EM em  $m/z$  463  $[M - H - 162]^-$  referente à perda de uma unidade de hexose, o fragmento em  $m/z$  301

(ácido elágico hexosídeo)  $[M - H - 162 - 162]^-$  corresponde à perda de outra unidade de hexose, permitindo propor um ácido elágico dihexosídeo (Fischer et al., 2011).

#### 5.4.4. Extrato em acetato de cascas (EACP)

A fração em acetato de etila é oriunda da partição do extrato etanólico de sementes, sendo considerada ativa em testes antimaláricos contra o parasita *Plasmodium falciparum*. O perfil cromatográfico da fração pode ser observado na Figura 69. A placa foi realizada em fase normal eluída em hexano e acetato de etila na proporção 10:90% e revelada com o revelador vanilina em ultravioleta UV-366 nm e UV-254 nm.

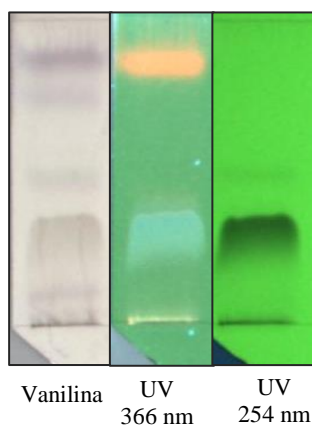


Figura 69. Perfil cromatográfico da EACP com diferentes reveladores.

A fração EACP (1 grama) foi submetida à uma coluna filtrante utilizando uma coluna de vidro com aproximadamente 2,2 cm de diâmetro, empacotada a 20 cm de altura com sílica *flash* F60 (230-400 *mesh*) e eluição em modo gradiente com hexano, acetato de etila e metanol em diferentes proporções, introduzindo 5x cada eluente (Figura 70) originando 6 frações.





Hex. (%)	AcOet (%)	MeOH (%)
80	20	-
50	50	-
10	90	-
-	95	5
-	80	20
-	-	100

Figura 70. Coluna filtrante de EACP com sistema de eluição gradiente.

As placas cromatográficas das seis frações obtidas são mostradas na Figura 71. A CCD foi eluída com hexano e acetato de etila na proporção 10:90 e revelada com vanilina e em luz ultravioleta 366 e 254 nm. Observou-se boa separação dos compostos visto que houve uma rampa em ordem crescente de polaridade.

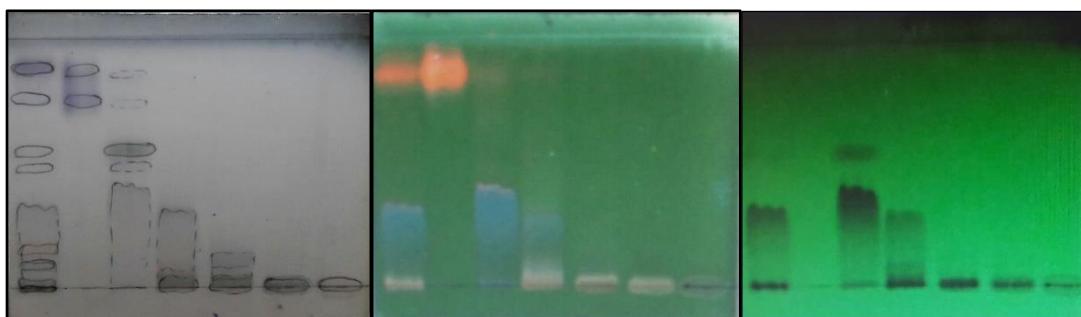


Figura 71. Placas cromatográficas das 6 frações obtidas da coluna filtrante de EACP.

Os rendimentos das frações obtidas são mostrados na Tabela 22. Retirou-se cerca de 1 mg de cada fração para realização das análises de atividade antimalárica na Fiocruz.

Frações	Massa (mg)
1	44
2	525
3	160
4	131
5	70
6	51

Tabela 22. Rendimentos das frações da coluna filtrante EACP.

Na avaliação da atividade antimalárica apenas a fração 1 foi considerada ativa atingindo inibição do crescimento parasitário superior a 60% nas duas maiores concentrações (50 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para melhor separação das substâncias, a fração 1 foi submetida a uma placa preparativa. Utilizou-se 20 g de sílica (Sílica Gel for TLC w/Gypsum and UV 254nm, 5 – 15  $\mu\text{m}$ , Sorbent Technologies) diluída em 70 ml de água destilada sob forte agitação e aplicou-se em uma placa de vidro 20 x 20 cm, a mesma foi utilizada após 72h de secagem.

A fração 1 (40 mg) foi solubilizada em 500  $\mu\text{l}$  de metanol e aplicada na placa. Os eluentes utilizados foram hexano e acetato de etila 80:20 (2x). Foram raspadas 10 manchas marcadas em luz ultravioleta 366 nm e extraídas com acetato de etila em banho ultrassônico por 15 minutos e filtradas com papel filtro (repetição 3x). A placa cromatográfica é mostrada na Figura 72.

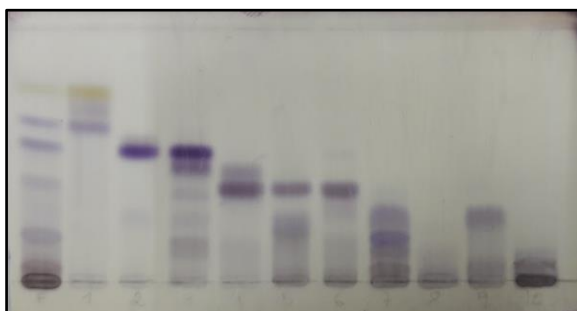


Figura 72. Placa cromatográfica obtida por placa preparativa da F1 EACP.

Os rendimentos das frações obtidas por placa preparativa são mostrados na Tabela 23. Retirou-se cerca de 1 mg de cada fração para realização das análises de atividade antimalárica na Fiocruz.

Frações	Massa (mg)
1	1
2	1,2
3	4,1
4	2,2
5	2,3
6	3,9
7	5,2
8	2
9	4,8
10	1,7

Tabela 23. Rendimentos das frações obtidas por CCD preparativa da F1 EACP.

As frações não apresentaram atividade significativa frente às cepas de *Plasmodium falciparum*. Algumas frações foram enviadas para análises espectroscópicas para conhecimento das classes de substâncias, mesmo em mistura pode-se observar sinais típicos de alguns compostos derivados de fenólicos, como o sinal em  $\delta_H$  7,05 característico do grupo galoil, resíduo do ácido gálico; sinal em  $\delta_H$  7,47 característico de resíduos do ácido elágico; dupletos na região de  $\delta_H$  6, 10 – 6,45 possibilitando a presença de resíduos de HHDP; sinais de  $^{13}C$  em  $\delta_c$  164 – 168 característicos de ésteres aromáticos (C=O), bem como vários sinais de  $^1H$  na região de alifáticos correlacionados com sinais de carbonos compreendidos na região de  $\delta$  60 – 80 e 92,5 – 97,5 sugerindo a presença de carbonos oxigenados e não oxigenados de açúcares que podem estar ou não conectados aos ácidos fenólicos (Li et al., 1999; Djoukeng et al., 2007; Romani et al., 2002).

## 6. CONCLUSÃO

---

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os extratos etanólicos de sementes apresentaram maiores rendimentos com 20,45%. Na extração sequenciada, os extratos metanólicos de cascas (16,22%) e os extratos hexânicos de sementes (41,31%) obtiveram maiores rendimentos.

- Quanto à partição líquido-líquido do extrato etanólico, a fração em acetato de cascas e a fração em hexano de sementes obtiveram os maiores rendimentos (66% e 78,17%), indicando forte presença de compostos de média a alta polaridade.

- A fração hexânica de cascas (FHCP) apresentou atividade antibacteriana baixa, inibindo 11 mm contra a bactéria *Shigella flexneri* e nos ensaios de citotoxicidade, a fração mostrou-se citotóxica frente às células tumorais inibindo 91,50% das células HEP-2.

- A fração em acetato de sementes (FASP) exibiu atividade antibacteriana baixa a moderada contra as bactérias *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, e apresentou 61,10% de inibição frente às células sadias VERO, sendo moderadamente citotóxica.

- Os extratos metanólicos de cascas e sementes (EMCP/EMSP) apresentaram atividade antibacteriana baixa contra *Shigella flexneri*, e no ensaio de citotoxicidade o extrato EMCP exibiu atividade moderada (62,13%) frente às células sadias VERO, enquanto que o extrato EMSP não apresentou inibição celular.

- Para os ensaios de atividade antimalárica, o extrato em acetato de cascas de piquiá (EACP) foi considerado ativo expressando o valor de IC<sub>50</sub> igual a 0,12 µg/mL, e no ensaio de citotoxicidade inibiu 64,60% de inibição das células sadias VERO.

- O perfil cromatográfico da fração FHCP em CCD exibiu coloração azul-violeta em contato com a vanilina, sugerindo presença de saponinas e/ou terpenos glicosilados.

Durante o fracionamento, a mistura dos fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foi identificada na fração por análises espectrométricas.

- Os espectros de massas da fração FASP em comparação com as fragmentações dos dados da literatura indicaram a presença de ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido elágico, ácido valoneico dilactona e galoil-HHDP-hexose. Dados espectrométricos e espectroscópicos também permitiram propor a estrutura do ácido elágico ramnosídeo.

- Os dados espectrais e cromatográficos por CL/EM dos extratos EMCP e EMSP permitiram inferir a presença dos ácidos fenólicos: ácido gálico ( $m/z$  169), ácido elágico ( $m/z$  301), monogaloil-hexose ( $m/z$  331), galoil-HHDP-hexose ( $m/z$  633) e ácido elágico dihexosídeo ( $m/z$  625).

- Dados espectroscópicos das frações de EACP permitiram observar sinais característicos de derivados dos ácidos gálico e elágico e de glicosídeos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D. C.; HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antigenotoxic effects of piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 67, p. 171 - 177, 2012.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1 - 9, 2007.

ARARUNA, M. K. A.; SANTOS, K. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; BOLIGON, A. A.; STEFANELLO, S. T.; ATHAYDE, M. L.; SARAIVA, R. A.; DA ROCHA, J. B. T.; KERNTOPF, M. R.; DE MENEZES, I. R. A. Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. *European Journal of Integrate Medicine*, v. 5, p. 178 - 183, 2013.

ARAÚJO, F. D. DE. A review of *Caryocar brasiliense* (*Caryocaraceae*) – an economically valuable species of the Central brazilian cerrados. *Economic botany*, v. 49, p. 40 - 48, 1995.

ASCARI, J., TAKAHASHI, J., & BOAVENTURA, M. The Phytochemistry and Biological Aspects of Caryocaraceae Family. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 15, n. 2, p. 293 - 308, 2013.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 426 - 436, 2013.

BARBOSA, B. S.; KOOLEN, H. H. F.; BARRETO, A. C.; SILVA, J. D.; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M. Aproveitamento do Óleo das Amêndoas de Tucumã do Amazonas na Produção de Biodiesel. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 2, p. 371 - 376, 2009.

BARRETO, G. P. M.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 10, p. 1856 - 1861, 2009..

BASTOS, I. DOS S. Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e composto obtidos de plantas da região amazônica. 2015. 157 f. Dissertação (Mestrado em Biologia dos agentes infecciosos e parasitários) – Curso de pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, v. 73, p. 428-430, 2002.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; MEUDEC, E.; MAZAURIC, J. P.; MADANI, K.; CHEYNIER, V. Qualitative and Semi-quantitative Analysis of Phenolics in Eucalyptus globulus Leaves by High-performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detection and Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004, p. 520 - 535.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação. Série Apontamentos. São Carlos: EdUFSCar, 2001, 77 p.

CAYME, J. M. C.; RAGASA, C. Y. Structure elucidation of  $\beta$ -stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from *Sesbania frandiflora* [Linn.] Pers. and  $\beta$ -carotene from *Heliotropium indicum* Linn. by NMR spectroscopy. *Kimika*, v. 20, p. 5 - 12, 2004.

CHAIJAROENKUL, W.; BANGCHANG, K. NA; MUNGTHIN, M.; WARD, S. A. *In vitro* antimalarial drug susceptibility in Thai border areas from 1998 - 2003. *Malaria Journal*, v. 4, n. 37, p. 1 - 7, 2005.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, v. 59, p. 16 - 40, 2014.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à Espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 623 - 636, 2008.

CHISTÉ, R. S. & MERCADANTE, Z. M. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 5884 – 5892, 2012.

CLAESON, P. T.; TUCHINDA, P. E REUTRAKUL, V. Some empirical aspects on the practical use of *flash* chromatography and medium pressure liquid chromatography for the isolation of biologically active compounds from plants. *J. Sci. Soc. Thailand*, v. 19, p. 73-86, 1993.

CLEMENT, C.R. Piquiá (*Caryocar villosum*). In: CLAY, J.W.; SAMPAIO, P.T.B.; CLEMENT, C. R. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2000. p. 101-109.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M07-A9, ed. 9, v. 32, 2012.

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

COSTA, J. G., BRITO, S. A., NASCIMENTO, E. M., BOTELHO, M. A., & RODRIGUES, F. F. Antibacterial properties of pequi pulp oil. *International Journal of Food Properties*, v. 14, p. 411 - 416, 2011.



COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564 - 582, 1999.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Capítulo 7: Obtenção de moléculas com atividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e Fitoquímica. Av de Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 120, 2005a.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Capítulo 10: Compostos fenólicos: características e origem biossintética. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e Fitoquímica. Av de Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 212 - 216, 2005b.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Capítulo 20: Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores das vitaminas D e fitoesteróis, cardiotônicos, hormônios esteroidais, matérias-primas de núcleo esteroide usadas em síntese parciais e saponinas. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e Fitoquímica. Av de Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 461, 2005c.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Capítulo 21: Tetraterpenos. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e Fitoquímica. Av de Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 478-482, 2005d.

DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química nova na escola*, Cromatografia, n. 7, 1998.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUNOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. 2001. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v, 77, p. 91 - 98, 2001.

DEMAJORIVIC, J.; Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. *Revista de Administração de empresas*, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 88 - 93, 1995.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2ª edição. New York: John Wiley & Sons, 2002.

DJOUKENG, J. D.; ABOU-MANSOUR, E.; TAPONDJOU, L.; LONTSI, D; TABACCHI, R. Identification of Ellagic Acid Derivatives from Stem Bark of *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Natural Product Communications*, v. 2, n. 0, p. 1 - 6, 2007.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais*. São Paulo, v. 7, 2006.

FACUNDO, V. A.; POLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. *Acta Amazonica*, v. 38, n. 4, p. 733 - 742, 2008.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R.; Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MS<sup>n</sup>. *Food Chemistry*, v. 127, p. 807 - 821, 2011.

FORGO, P; KÖVER, E. V. Gradient enhanced selective experiments in the <sup>1</sup>H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids*, v. 69, p. 43 - 50, 2004.

GIORDANI JUNIOR, R.; CAVALI, J.; PORTO, M. O.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. Resíduos agroindustriais e alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Ciências da Amazônia*, v. 3, n. 1, p. 93 - 104, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374 - 381, 2007.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual. 2ª edição. New York: *Medical Encyclopedia*, 1955.

HARBORNE, J. B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. 2ª edition. London, New York: Chapman and Hall Ltda, 1984.

HOFMANN, T.; NEBEHAJ, E.; ALBERT, L. Antioxidant properties and detailed polyphenol profiling of Europeanhornbeam (*Carpinus betulus* L.) leaves by multiple antioxidant capacity assays and high-performance liquidchromatography/multistage electrospray mass spectrometry. *Industrial Crops and Products*, v. 87, p. 340 - 349, 2016.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027 - 1031, 2002.

JORK. H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. Thin-Layer Chromatography-Reagents and detection the methods, v. 1a. República Federal da Germânia: VCH Verlagsgesellschaft, 1990.

KANG, C. I.; KIM, S. H.; PARK, W. B.; LEE, K. D.; KIM, H. B.; KIM, E. C.; OH, M. D.; CHOE, K. W. Bloodstream Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli: Risk Factors for Mortality and Impact of Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy on Outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 2, p. 760 - 766, 2005.

KAWANISHI, K., & RAFFAUF, R. F. *Caryocar microcarpum*: an ant repellent and fish poison. *Journal of Natural Products*, v. 49, p. 1167 - 1168, 1986.

KOBORI, C. N. & JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciências agrotécnicas*, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1008-1014, 2005.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 7, p. 2352 - 2355, 1990.

LAGARDA, M. J.; GARCIA LIATAS, G; FARRE, R. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1486 - 1496, 2006.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a espectrometria de massas: finalmente compatíveis?. *Scientia Chromatographica*, v. 1, 2009.

LI, X. C.; ELSOHLY, H. N.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M.; NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 37, p. 856 - 859, 1999.

LJUNGSTRÖM, I.; PERLMANN H.; SCHICHTHERLE, M.; SCHERF A.; WAHLGEN M. *Methods in Malaria Research*. 4ª edição. Manassas, Virginia: Editora MR4/ATCC, 130 p., 2004.

MACEDO, A. L.; SANTOS, R.S.; PANTOJA, L. SANTOS, A. S. Pequi cake composition, hydrolysis and fermentation to bioethanol. *Brazilian Journal of Chemical engineering*, v. 28, n. 01, p. 9 - 15, 2011.

MAGID, A. A.; VOUTQUENNE, L.; HARAKAT, D.; POUNY, I. & CARON, C. Triterpenoid Saponins from the Fruits of *Caryocar villosum*. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 919 - 926, 2006a.

MAGID, A. A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; RENIMEL, I.; DOMINIQUE HARAKAT C, CHRISTIAN MORETTI D, CATHERINE LAVAUD A. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Caryocar villosum*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2096 - 2102, 2006b.

MAGID, A. A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; HARAKAT, D.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Phenolic Glycosides from the Stem Bark of *Caryocar villosum* and *C. glabrum*. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 914 - 917, 2008.

MAIA, J.; ANDRADE, E. H. & SILVA, M. H. Aroma volatiles of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 574 - 576, 2008.

Mapa de distribuição *Caryocaraceae*, disponível em:

<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/malpighialesweb.htm>

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. O.; LOTUFO, L. V. C.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21, n. 3, p. 456 - 464, 2011.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. *Z Lebensm Unters Forsch A*, v. 204, p. 442 - 444, 1997.

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCIA-VIGUERA, C. BRUNI, R.; CROZIER, A.; DEL RIO, D. Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly)phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum L.*) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, v. 17, p. 14821-14840, 2012.

MILLER, W. M. P.; CRUZ, F. G. G.; CHAGAS, E. O.; SILVA, A. F.; ASSANTE, R. T. Farinha do resíduo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) na alimentação de poedeiras. *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias Ambiental*, v. 11, n. 1, p. 105 - 114, 2013.

NASCIMENTO, L.C.; da SILVA, L. A. de O.; CESARINO, F. N. Characterization of castanha residue as a substrate in the protease production by filamental fungus of the amazon. *The Journal of Engineering and exact sciences*, v. 03, n. 04, p. 0603 - 0607, 2017.

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*, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NAWWAR, M. A. M.; HUSSEIN, S. A. M.; MERFORT, I. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry*, v. 36, n. 3, p. 793 - 798, 1994.

NEVES, L. C.; CAMPOS, A. J.; BENEDETTE, R. M.; TOSIN, J. M.; CHAGAS, E. A. Characterization of the antioxidant capacity of natives fruits from the Brazilian Amazon region. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 4, p. 1165 - 1173, 2012.

NOGUEIRA, F; ROSARIO, V. E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 3, p. 109 - 124, 2010.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O. & FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301 - 307, 2008.

PAULA-JÚNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, p. 625 - 630, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. E VIVIAN, J. S. Introduction to spectroscopy. 4ª edição. Brooks/ Cole, Cengage Learning, 2009.

PEREIRA, C. V. L. Extratos bioativos de frutos amazônicos por química verde: extração por líquido pressurizado (Ple) e fluido supercrítico (Sfe). 2015. 270f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas.

PESCE, CELESTINO. Oleaginosas da Amazônia. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, Núcleo de estudos Agrários e Desenvolvimento rural. 2ª ed. 2009.

PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 57 - 60, 2005.

PRANCE, G.T. & SILVA, M.F. da. Monograph of Caryocaraceae. *Flora Neotropica*, 12:1-75. In: RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, M. J.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PERREIRA, E. C.; SILVA, C. S.; MESQUITA, M. R.;

PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA. 1999.

RABELO, A. Frutos nativos da Amazônia: comercializados nas feiras de Manaus - AM. Manaus: INPA, 2012.

RIOS, J., RECIO, M. C., & VILLAW, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 23, p. 127 - 149, 1988.

ROMANI, A.; PINELLI, P.; GALARDI, C.; MULINACCI, N.; TATTINI, M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p. 79 - 86, 2002.

SANTANA, A. L. B. D. Estudo químico, antitérmico e antifúngico da madeira de lei *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) von Reis Alt. (Angico-de-carço). 2011. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco.

SANTOS, A. T. L.; HENRIQUE, N. S.; SHHINLINDWEIN, J. A.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. Aproveitamento da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos para produção de composto orgânico. *Revista Brasileira de Ciências da Amazônia*, v. 3, n. 1, p. 15 - 28, 2014.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 711 - 740, 2004.

SHANLEY, P.; CYMERYYS, M.; GALVAO, J. Frutíferas da mata na vida amazônica. Belém: [s.n.], 125p., 1998.

SHANLEY, P., MEDINA, G. Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. Belém: CIFOR, Imazon, p. 123 - 132, 2005.

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*, v. 101, n. 3, p. 1012 - 1018, 2007.

SILVA, I. Q. da.; OLIVEIRA, B. C. F.; LOPES, A. S.; PENA, R. S. Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial de maracujá. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 321 - 329, 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos naturais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC. 2007.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª edição. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS e UFSC. 2007.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE. C. B. Química Orgânica, volume 1. 9ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

SOUZA, R. O. S. Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de resíduos de frutos amazônicos. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 14, p. 2923 - 2925, 1978.

SUGANUMA, E.; VIANA, C. A. dos S. *Caryocaraceae: Caryocar villosum*. In: RIOS, M. N. S.; PASTORE JR. F. Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral. Brasília:



Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. Livro digital disponível em: <http://leunb.bce.unb.br/>.

VALGAS, C.; DE SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F.; JUNIOR, A. S. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 369 - 380. 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drugs analysis: a thin layer chromatography atlas. 2ª edição. Springer: 1995.

YAMAGUCHI, K. K. L. Caracterização de substâncias fenólicas de Resíduos de frutos amazônicos e avaliação para o uso biotecnológico. 2015. 198 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Curso de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, C. V. L.; LIMA, E. S. VEIGA JUNIOR, V. F. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). *Scientia Amazonia*, v. 3, n. 2, p. 39 - 46, 2014.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, C. V. L.; ARANHA, E. S. P.; SOUZA, R. O. S.; OLIVEIRA, P. D. A.; VASCONCELLOS, M. C.; LIMA, E. S. L.; VEIGA JUNIOR, V. F. HPLC-DAD profile of phenolic compounds, cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of the amazon fruit *Caryocar villosum*. *Química Nova*, v. 40, n. 5, p. 483 - 490, 2017.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçú”). *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1501 – 1504, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 577 - 614, 2004.

ZHANG, X.; CAMBRAL, A.; MIESCH, M.; ROUSSI, S.; RAUL, F.; WERNER, D. A.; MARCHIONI, E. Separation of  $\Delta 5$ - and  $\Delta 7$ - phytosterols by adsorption chromatography and semipreparative reversed phase high-performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterol in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 1196 - 1202, 2006.