

**ELISA PEREZ**

**DIAGNOSE FITOQUÍMICA DOS FRUTOS DE *Caryocar brasiliense* CAMB.,  
CARYOCARACEAE**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Tomoe Nakashima  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira

**CURITIBA**

**2004**

À minha família e meu companheiro,  
dedico esse trabalho.

## **Agradecimentos**

A Deus,

Ao Álvaro Rogério, pela dedicação incansável, pela paciência gigantesca, pelo apoio e amor incondicionais,

Aos meus familiares, pelo apoio e amor,

Às professoras Dra. Tomoe Nakashima e Dra. Sandra M. W. Barreira, pela amizade, apoio e orientação,

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, pela oportunidade,

Ao colega Waldemar de Paula Jr., por ter nos entregue os frutos e exsicata,

À estudante de farmácia Rafaela M. Guarise, pela colaboração nos experimentos e amizade,

Ao professor Dr. Olavo A. Guimarães, do departamento de Botânica da UFPR, pela classificação botânica,

À Me. Maria da Graça T. Toledo, pelo auxílio incansável junto ao aparelho de clae,

À professora Dra. Tânia Maria Bordin Bonfim, pelos conselhos, correções e apoio,

Ao Laboratório de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade da UFPR, na pessoa do professor Dr. Roberto Pontarolo e técnica Waleska Pereira pelos empréstimos de reagentes e coluna cromatográfica,

Ao Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR, na pessoa do professor Dr. Guilherme Lanzi Sasaki e mestrando Lauro Mera de Souza, pelas análises em CG/MS,

Ao Laboratório de Enzimologia da UFPR, pelo empréstimo do aparelho de UV-vis,

Ao Laboratório de Farmacognosia da UFPR, pelo empréstimo de reagentes,

Ao Laboratório de Citologia e Hematologia da UFPR, pelo empréstimo de reagentes,

Ao Laboratório de Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa da UFPR, pelo empréstimo de reagentes e equipamentos,

Ao professor Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelo auxílio nas análises em clae,

À indústria de cosméticos Phytoderm, na pessoa da farmacêutica Angélica Vanhoni, pelas doações de reagentes,

À indústria de cosméticos Botica Comercial Farmacêutica, pelas doações de reagentes,

À indústria de medicamentos Laboratório Catarinense, na pessoa do farmacêutico Jessé B. Lagos, pela doação do padrão de  $\beta$ -caroteno,

À farmácia de manipulação Salvena, na pessoa da farmacêutica Maristela Andruski, pela doação de insumos cosméticos de carotenóides,

À farmácia de manipulação Apparenza, na pessoa da farmacêutica Helga Maria Franke, pela doação de insumos cosméticos de carotenóides,

À Universidade Tuiuti do Paraná, na pessoa do professor Me. Carlos André Domingues Fernandes, pelo empréstimo de equipamentos,

À indústria de cosméticos Kendra, pelo apoio,

À Hilda A. Santos e Maria Cristina Barbosa, pela amizade e apoio,

Aos professores do Laboratório de Fitoquímica da UFPR e colegas, em especial a Luzia Franco, Luciane Cavalheiro, Gustavo Bertuol, Christian Boller, Suzane Virtuoso, Aline Davet, Kettelin A. Arbos, João Luiz S. Carvalho e Miriam M. Cúnico,

Aos colegas de pós-graduação, em especial:

Maria Luíza D. Fávero – ainda bem que o mundo não é só espectrometria!!

Lílian L. Hirata – valeu as madrugadas nos laboratórios em sua companhia!!

Fabiana De Toni – obrigada pelo nivelamento e por sua amizade nesses sete anos!!

Carolina B. Wandsheer – obrigada pelo apoio e liofilizações...!!

Cláudia A. Andrade – sua amizade foi uma das minhas principais forças!!

Waldemar de Paula Jr. – juntos, com o mesmo sofrimento, o pequi!!

Giovanna A. Pereira – obrigada pelos conselhos e afeto!!

Joceline Franco – uma amizade sincera e valiosa!!

Ana Cristina O. Toledo – seu apoio foi fundamental, e sua amizade... imprescindível!!!

“Pois vós nos provastes, ó Deus, acisolaste-nos como se faz com a prata.  
Deixaste-nos cair no laço, carga pesada pusestes em nossas costas.  
Submeteste-nos ao jugo dos homens, passamos pelo fogo e pela água;  
Mas, por fim, nos destes alívio.”  
Bíblia Sagrada, Salmo 65, 10-12.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
3.1 A FAMÍLIA CARYOCARACEAE	4
3.2 O GÊNERO CARYOCAR	5
3.2.1 Aplicações do gênero	5
3.2.2 Dados agronômicos do gênero	6
3.2.3 Constituintes químicos do gênero	7
3.3 A ESPÉCIE <i>Caryocar brasiliense</i> CAMB., CARYOCARACEAE	10
3.3.1 Enquadramento taxonômico	11
3.3.2 Descrição macroscópica da espécie	11
3.3.3 Dados agronômicos da espécie	14
3.3.4 Conteúdo químico da espécie	15
3.4 CARBOIDRATOS	17
3.5 CAROTENÓIDES	21
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	33
4.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS	33
4.2.1 Obtenção dos extratos	33
4.2.1.1 Extratos para a avaliação fitoquímica e partição líquido-líquido	33
4.2.1.2 Extrato para a obtenção dos carotenos	35
4.2.1.3 Extrato para a obtenção dos carboidratos	35
4.2.2 Avaliação preliminar	37
4.3 SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS POR MÉTODOS FÍSICOS E QUÍMICOS	38

4.3.1 Separação dos carboidratos	38
4.3.2 Separação dos carotenos	38
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	40
4.4.1 Obtenção dos padrões de $\beta$ -criptoxantina, licopeno, $\beta$ -caroteno e luteína	40
4.4.2 Identificação e quantificação dos carotenóides presentes no fruto de <i>C. brasiliense</i>	44
4.4.3 Composição monossacarídica	46
4.4.4 Avaliação do potencial antioxidante por espectrometria	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
5.1 RENDIMENTO DOS FRUTOS	48
5.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR E EXTRAÇÃO DE ÓLEO VOLÁTIL	48
5.3 CARBOIDRATOS	51
5.4 CAROTENÓIDES	53
5.4.1 Padrões utilizados	53
5.4.1.1 $\beta$ -criptoxantina	53
5.4.1.2 Licopeno	56
5.4.1.3 Luteína	57
5.4.1.4 Curvas de calibração	59
5.4.2 Separação dos carotenóides e identificação	60
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	84
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ALGUNS TANINOS EM <i>C. microcarpum</i> DUCKE	8
FIGURA 2 – ALGUNS CAROTENÓIDES EM <i>C. villosum</i>	9
FIGURA 3 – ASPECTO GERAL DO <i>Caryocar brasiliense</i> CAMB. NA REGIÃO DE MONTES CLAROS, MG.	12
FIGURA 4 – ASPECTO GERAL DA FLOR DE <i>C. brasiliense</i> CAMB. NA REGIÃO DE MONTES CLAROS, MG	2
FIGURA 5 – ASPECTO GERAL DOS FRUTOS JOVENS E FOLHAS DE <i>C. brasiliense</i> CAMB	13
FIGURA 6 – ASPECTO GERAL DO FRUTO DE <i>C. brasiliense</i> CAMB.	13
FIGURA 7 – ALGUNS ESTERÓIDES EM <i>C. brasiliense</i>	16
FIGURA 8 – ALGUNS CAROTENÓIDES EM <i>C. brasiliense</i>	17
FIGURA 9 – EXEMPLOS DE MONOSSACARÍDEOS NA FORMA FURANOSÍDICA E PIRANOSÍDICA	18
FIGURA 10 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DO $\alpha$ E $\beta$ -CAROTENO E XANTOFILAS	23
FIGURA 11 – CÁLCULO DA % III/II (% III/II = III/II X 100)	25
FIGURA 12 – ESTRUTURA DO RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRIL HIDRAZINA	32
FIGURA 13 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA CASCA	34
FIGURA 14 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA AMÊNDOA	34
FIGURA 15 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E PRECIPITADOS VISANDO A SEPARAÇÃO DOS CARBOIDRATOS	36
FIGURA 16 – OBTENÇÃO DOS CAROTENÓIDES	41
FIGURA 17 – ESTRUTURA DA LUTEÍNA	43
FIGURA 18 - PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM OS HALOS DE HEMÓLISE EM PRESENÇA DE DIVERSOS EXTRATOS	50
FIGURA 19 – ESPECTRO UV-vis DA FRAÇÃO CONTENDO A $\beta$ -CRIPTOXANTINA EM ÉTER DE PETRÓLEO	54
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA 98:2)	55
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA 95:5)	55
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LICOPENO ISOLADO DO MAMÃO (METANOL: ÁGUA 98:2)	56
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LICOPENO EM INSUMO COSMÉTICO (METANOL: ÁGUA 98:2)	57
FIGURA 24 – ESPECTRO DO INSUMO CONTENDO LUTEÍNA EM ETANOL	57
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LUTEÍNA EM INSUMO COSMÉTICO (METANOL: ÁGUA, 95:5)	58
FIGURA 26 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LUTEÍNA EM INSUMO COSMÉTICO (METANOL: ÁGUA, 98:2)	58
FIGURA 27 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O $\beta$ -CAROTENO	59
FIGURA 28 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA A $\beta$ -CRIPTOXANTINA	59
FIGURA 29 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA A LUTEÍNA	60
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL (METANOL: ÁGUA, 98:2)	66
FIGURA 31 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL CO-ELUÍDA COM $\beta$ -CAROTENO E $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA, 98:2)	67
FIGURA 32 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL (METANOL: ÁGUA, 95:5)	67
FIGURA 33 – DETALHE DO CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL, COM A SEPARAÇÃO DO PICO EM 4,5917 MIN. (METANOL: ÁGUA, 95:5)	68
FIGURA 34 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL COELUÍDA COM LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	68
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAsobr (METANOL: ÁGUA, 98:2)	69
FIGURA 36 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAsobr COM PADRÕES DE $\beta$ -CAROTENO, $\beta$ -CRIPTOXANTINA E LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 98:2)	69

FIGURA 37– CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAppt (METANOL: ÁGUA, 98:2)	70
FIGURA 38 – DETALHE DO CROMATOGRAMA EM CLAE DA frAppt, COM SUBSTÂNCIAS EM TORNO DE 3 MIN. (METANOL: ÁGUA, 98:2)	70
FIGURA 39 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAppt COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 98:2)	71
FIGURA 40 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frB (METANOL: ÁGUA, 95:5)	71
FIGURA 41 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frB COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	72
FIGURA 42- CROMATOGRAMA EM CLAE DA frB COM O PADRÃO DE $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	72
FIGURA 43 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frCsobr (METANOL: ÁGUA, 95:5)	73
FIGURA 44 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frCsobr COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	73
FIGURA 45 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frCppt (METANOL: ÁGUA, 95:5)	74
FIGURA 46 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frCppt COM O PADRÃO DE LUTEÍNA, DEMOSTRANDO A DEGRADAÇÃO DO MAIOR PICO E DA LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	74
FIGURA 47 - CROMATOGRAMA EM CLAE DO PADRÃO DE LUTEÍNA, DEMOSTRANDO A DEGRADAÇÃO DO MESMO DEPOIS DE ALGUMAS HORAS NO ETANOL (METANOL: ÁGUA, 95:5)	75
FIGURA 48 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frD (METANOL: ÁGUA, 95:5)	75
FIGURA 49 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frD COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	76
FIGURA 50 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frE (METANOL:ÁGUA, 95:5)	76
FIGURA 51 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frE COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	77
FIGURA 52 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frF (METANOL:ÁGUA, 95:5)	77
FIGURA 53 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frF COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)	78
FIGURA 54 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frG (METANOL:ÁGUA, 95:5)	78
FIGURA 55 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frG COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA,95:5)	79
FIGURA 56 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frF E frG, MOSTRANDO A SEMELHANÇA ENTRE AS DUAS (METANOL: ÁGUA 95:5)	79
FIGURA 57 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frH (METANOL:ÁGUA, 95:5)	80
FIGURA 58 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frI (METANOL:ÁGUA, 95:5)	80
FIGURA 59 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO EM mg/mL DE EXTRATO CETÔNICO DO MESOCARPO INTERNO MAIS ENDOCARPO VERSUS IC%	85
FIGURA 60 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO EM mg/mL DE ACETATO DE TOCOFEROL VERSUS IC %	85

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO SEGUNDO ENGLER (1964) E SEGUNDO CRONQUIST (1988)	11
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $p^*$ ) O OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE (1SG+, 1DG) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE (3SG- )	30
TABELA 3 – COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR DO $\beta$ -CAROTENO, $\beta$ -CRIPTOXANTINA E LUTEÍNA EM ALGUNS SOLVENTES	45
TABELA 4 – RENDIMENTOS DO FRUTO EM CASCA, POLPA EXTERNA, CAROÇO MAIS DRUPA E AMÊNDOA	48
TABELA 5 – RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA A ALCALINA DA AMÊNDOA DE <i>C. brasiliense</i> CAMB.	51
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NA AMÊNDOA	52
TABELA 7 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS EM CCD DA FRAÇÃO $\beta$ -CRIPTOXANTINA OBTIDOS COM DIVERSOS SISTEMAS ELUENTES	53
TABELA 8 – RFS OBTIDOS DO LICOPENO EM INSUMO E DO EXTRAÍDO DO MAMÃO	56
TABELA 9 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA FRAÇÃO TOTAL EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	61
TABELA 10 – RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES EM RELAÇÃO AO TOTAL OBTIDO PELA CROMATOGRAFIA EM COLUNA	62
TABELA 11 – FRAÇÕES CAROTENOÍDICAS, RESPECTIVOS PRECIPITADOS, QUANTIDADES E RENDIMENTOS	62
TABELA 12 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frAsobr EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	62
TABELA 13 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frAppt EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	63
TABELA 14 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frB EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	63
TABELA 15 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frCsobr EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	63
TABELA 16 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frCppt1 E frCppt2 EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	63
TABELA 17 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frD EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	64
TABELA 18 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frEsobr EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	64
TABELA 19 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frppt EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	64
TABELA 20 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frF EM DICLOROMETANO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	65
TABELA 21 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frG EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	65
TABELA 22 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frH EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	65
TABELA 23 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frI EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS	65
TABELA 24 - QUANTIDADES DE $\beta$ -CAROTENO, $\beta$ -CRIPTOXANTINA E LUTEÍNA NAS FRAÇÕES E AMOSTRA TOTAL DA PARTIÇÃO ETÉREA	81
TABELA 25 - QUANTIDADES OBTIDAS DE LUTEÍNA, $\beta$ -CRIPTOXANTINA E $\beta$ -CAROTENO	82
TABELA 26 – CONCENTRAÇÕES ([ ]), MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS E IC % DO EXTRATO CETÔNICO E DO ACETATO DE TOCOFEROL	84

## LISTA DE SIGLAS

TFA	Ácido trifluoroacético
ABTS <sup>•+</sup>	Radicais Alquilperóxidos
DPPH	Radical Difenilpicril Hidrazina
Rf	Índice ou fator de retenção

## LISTA DE ABREVIATURAS

Sobr	Sobrenadante
PPT	Precipitado
Fr	Fração
UV-vis	Região do Ultravioleta-Visível
<i>C. brasiliense</i>	<i>Caryocar brasiliense</i>
<i>C. butyrosomum</i>	<i>Caryocar butyrosomum</i>
<i>C. microcarpum</i>	<i>Caryocar microcarpum</i>
<i>C. nuciferum</i> L.	<i>Caryocar nuciferum</i> Linné
<i>C. villosum</i>	<i>Caryocar villosum</i>
Camb.	Cambessedes
CCD	cromatografia em camada delgada
CG/MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
DNA	ácido desoxirribonucléico
EXTR	extrato
IC %	concentração inibitória em percentual
p. e.	por exemplo
p.	página
RES	resíduo
subs.	Subespécie

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
$\alpha$	alfa
$\beta$	Beta
C <sub>20</sub>	20 unidades de carbono
cm	centímetros
h	horas
kcal	quilocalorias
kDa	quilodalton
L	litro
M	molar
mg	miligramas
min	minutos
ml	mililitros
<i>n</i>	ene
N	normal

nm	nanômetros
μm	micrometros
rpm	rotações por minuto
US\$	dólares
C-1	carbono um
C-2	carbono dois
C-4	carbono quatro
C-5	carbono cinco
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
H <sub>2</sub> O	água
HCl	ácido clorídrico
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sódio
NaBH <sub>4</sub>	borohidreto de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
O <sub>2</sub>	oxigênio molecular
<sup>1</sup> Δg	estado singlete excitado
<sup>1</sup> Σg+	estado singlete excitado
Fe <sup>2+</sup>	ion ferroso
Fe <sup>3+</sup>	ion férrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	água oxigenada
ArO•	radical ariloxi
ArOH	arila substituida com hidroxila
•OH	radical hidróxido
ROO•	radical carboxila
ROOH	ácido carboxílico
R <sup>3</sup> COOH	ácido carboxílico substituído
O <sub>2</sub> •	radical superóxido
MgO	óxido de magnésio
N	Nitrogênio
K	Potássio
P	Fósforo
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
Al	Alumínio
Mn	Manganês
Zn	Zinco
Cu	Cobre
Na	Sódio
Fe	Ferro
pH	Logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica

## RESUMO

Os frutos e folhas de *Caryocar brasiliense* Cambessedes, Caryocaraceae ou comumente chamado de pequi, são muito utilizados pela população da região do centro do Brasil, tanto para fins de alimentação quanto para fins terapêuticos. Estudos sobre os metabólitos dessa espécie são escassos. Objetivou-se realizar uma avaliação fitoquímica para a sugestão de possíveis compostos nos frutos dessa espécie, verificar a presença de óleo essencial, descrever a composição monossacarídica da amêndoa, identificar e quantificar por meio de clae alguns carotenóides da polpa e sugerir um potencial antioxidante baseando-se no método do DPPH. O mesocarpo interno mais endocarpo do fruto acusou a presença de heterosídeos flavônicos, heterosídeos saponínicos, ácidos fixos, aminogrupos, taninos condensados e açúcares. O exocarpo do fruto sugeriu a presença de esteróides e triterpenos, heterosídeos antraquinônicos, heterosídeos flavônicos; heterosídeos saponínicos, aminogrupos, taninos condensados e hidrolisáveis e açúcares. No teste de hemólise em placas de ágar sangue, a fração diclorometano, precipitado da partição diclorometano e o resíduo polar em metanol da casca, bem como o resíduo polar da amêndoa apresentaram uma acentuada hemólise no ágar sangue, sugerindo substâncias hemolíticas. Não foi separado óleo volátil do fruto. A composição monossacarídica da amêndoa do fruto revelou a presença de ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose. Provavelmente esses resíduos estão na forma de arabinoxilanas, arabinoglucanas e xiloglucanas. Foram separados do mesocarpo interno mais endocarpo por meio de clae os seguintes carotenóides: luteína (4,57 µg/g fruto total), β-criptoxantina (2,26 µg/g fruto total) e β-caroteno (0,702 µg/g fruto total). Existe um potencial antioxidante no extrato cetônico do fruto de *C. brasiliense*, provavelmente devido a presença dos carotenóides.

## ABSTRACT

The fruit and leaves of *Caryocar brasiliense* Cambessedes Caryocaraceae or commonly called of pequiizeiro are widely used by population of the center of Brazil, for therapeutics and nutritional purposes. Studies about the metabolites of this species are rare. The objective of this work was perform an phytochemical evaluation in order to suggest the possible compounds present on the fruits of this species, verify the presence of essential oil, describe the sugar composition of the nut, identify and quantify by means of HPLC some carotenoids from pulp and determine an antioxidant potential based in the method of the DPPH. The internal mesocarp plus endocarp of the fruit showed the presence of flavonic heterosides, saponin heterosides, fixed acids, aminogroups, condensed tannins and sugars. The fruit exocarp suggested the presence of steroids and triterpenes, anthraquinone heterosides, flavonic heterosides, saponin heterosides, aminogroups, condensed and hydrolizable tannins and sugars. In the test of hemolysis in Petri dish of blood agar, the diclorometane fraction, precipitated of diclorometane fraction and the polar methanol residue from peel, as well as the residue polar from nut, has presented intense hemolysis into the blood agar, suggesting hemolytical substances. It was not separated volatile oils from the fruit. The sugar composition from the nut of the produce presented the attendance rhamnose, fucose, arabinose, xylose, manose, galactose e glucose. Probably it is a kind of arabinoxylans, arabinoglucans and xyloglucans. The following carotenoids from internal mesocarp plus endocarp were separated and identified by means of HPLC: lutein (4,57  $\mu\text{g/g}$  total fruit),  $\beta$ -cryptoxanthin (2,26  $\mu\text{g/g}$  total fruit) and  $\beta$ -carotene (0,702  $\mu\text{g/g}$  total fruit). It was observed an antioxidant potential of the cetonic extract of the produce of *C. brasiliense*, probably due to presence from the carotenoids.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática antiga. Estima-se que a maioria das plantas usadas na medicina popular não foi estudada a respeito de seus componentes químicos, ações farmacológicas e suas reais indicações terapêuticas, sem considerar os vegetais que ainda não foram identificados.

A indústria farmacêutica busca novos fármacos como potencial agente terapêutico. Nessa perspectiva, nossa flora possui inúmeras espécies ainda pouco estudadas. Se considerarmos o universo possível de moléculas, aquelas que poderiam chegar a um fármaco são estimadas em  $10^{40}$  moléculas, um número muito expressivo (VALLER; GREEN, 2000, p. 286, 2000<sup>1</sup> apud YUNES; CALIXTO, 2001, p. 48). Entretanto, o máximo conseguido até hoje é de 0,5 a 1 milhão de moléculas, apresentando-se como um número muito aquém do desejado. Assim, encontrar uma molécula com propriedades farmacológicas potenciais é como procurar uma “agulha num palheiro”. Esses motivos, somados a outros como custo e tempo de síntese, levaram muitas indústrias e cientistas a procurarem moléculas protótipos nas plantas medicinais, as que possuem informação histórica importante referente à medicina popular (YUNES; CALIXTO, 2001, p. 48).

As informações existentes sobre a magnitude do mercado de compostos de origem vegetal são pouco precisas. Por um lado, estima-se um mercado mundial de drogas de origem vegetal avaliado em US\$ 12,4 bilhões. Outros autores consideram US\$ 20 bilhões originados de produtos com substâncias ativas derivadas de plantas. No Brasil, cerca de 25 % dos US\$ 8 bilhões de faturamento em 1996 da indústria farmacêutica nacional foram originados de medicamentos derivados de plantas. Apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais; destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para sua comercialização (NODARI; GUERRA, 2000, p. 12).

---

<sup>1</sup> VALLER, M. J; GREEN, D. Diversity screening versus focused screening in drug discovery. **Drug**

Os frutos e folhas de *Caryocar brasiliense* Cambessedes, Caryocaraceae ou comumente chamado de pequi, são muito utilizados pela população da região do centro do Brasil, tanto para fins de alimentação quanto para fins terapêuticos, como por exemplo no tratamento de resfriados, bronquites, tosses e como afrodisíaco (VIEIRA; MARTINS, 2000, p. 21). A planta é característica da vegetação do Cerrado, um dos mais ricos biomas do planeta, e apresenta carência de dados mais aprofundados e recentes na área de produtos naturais bioativos. As pesquisas em Farmacognosia e Fitoquímica são de vital importância, aliadas à Farmacologia, Microbiologia, Biologia Celular e Molecular, entre outras. Sob esse aspecto, a referida pesquisa pode contribuir na busca de novas substâncias ativas com possível potencial farmacológico. O presente projeto engloba estudos sobre Farmacognosia e Fitoquímica do fruto de *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae, pois este poderá trazer contribuições relevantes para as pesquisas relativas às suas propriedades medicinais.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto é a realização de estudos fitoquímicos no fruto de *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae, visando separar e identificar seus metabólitos.

Os objetivos específicos são:

1. Avaliar a composição fitoquímica do fruto, com relação aos metabólitos secundários;
2. Separar e identificar tetraterpenos (carotenóides) do mesocarpo interno mais endocarpo (por meio de métodos cromatográficos e identificação por espectrometria);
3. Separar o óleo volátil do fruto e identificar seus componentes;
4. Verificar a composição monossacarídica dos carboidratos presentes na semente;  
e
5. Avaliar a atividade antioxidante dos extratos cetônico do mesocarpo interno mais endocarpo do fruto.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estima-se que dois terços da diversidade biológica mundial esteja nas zonas tropicais, distribuída principalmente nos países em desenvolvimento. Cerca de 37 % desta encontra-se na América tropical, que contém cerca de 90 mil espécies de fanerógamas, representadas no Brasil por aproximadamente 60 mil espécies (VIEIRA; MARTINS, 2000, p. 14). A biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, visto que o país detém a maior diversidade genética vegetal do mundo (NODARI; GUERRA, 2000, p. 13). O bioma Cerrado possui uma flora vegetal estimada em sete mil espécies, sendo o segundo bioma brasileiro de maior diversidade vegetal, após a floresta amazônica (VIEIRA; MARTINS, 2000, p. 13).

Poucos estudos etnobotânicos foram realizados e publicados sobre o uso de plantas medicinais do Cerrado, com identificação criteriosa das espécies utilizadas. Considerando essa riqueza florística, as estimativas citam que menos de 1 % deste potencial já foi quimicamente estudado (VIEIRA; MARTINS, 2000, p. 18). Além disso, a diversidade das espécies aumenta as oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização econômica (NODARI; GUERRA, 2000, p.16).

#### 3.1 A FAMÍLIA CARYOCARACEAE

A família Caryocaraceae, da ordem Theales (CRONQUIST, 1988), contém somente 25 espécies em dois gêneros: o *Anthodiscus* G. F. W. Meyer (nove espécies) e o *Caryocar* L. (16 espécies) (PRANCE, 1990, p. 178). É uma família de dicotiledôneas confinada entre os trópicos, excluindo a região do Caribe. Estão presentes da Costa Rica até o sul do Brasil e Paraguai, alcançando a melhor diversidade na Amazônia baixa e nas Guianas (DICKINSON, 1990, p. 123). São plantas geralmente de porte médio a grande, com folhas estipuladas, trifoliadas, que podem ser opostas ou alternadas, e flores de tamanho médio a grande, actinomórficas, com clara diferenciação, usualmente em cálice com cinco sépalas e corola também, com cinco pétalas. As flores apresentam androceu com muitos estames longos e unidos na base e gineceu com 3 a 20 lóculos (DICKINSON, 1990, p. 123). O fruto pode ser drupáceo ou esquizocárpico (JOLY, 1985, p. 324).

## 3.2 O GÊNERO CARYOCAR

As árvores desse gênero são grandes, com galhos opostos e horizontais. As estípulas são caducas ou ausentes. As folhas são opostas, usualmente longas e pecioladas, raramente sésseis, trifoliadas, com margens serradas, crenadas, dentadas ou raramente inteiras (PRANCE, 1990, p. 178). As inflorescências são paniculadas e presentes nos racemos terminais (JOLY, 1985, p. 325), os pedicelos são articulados próximos à flor (PRANCE, 1990, p. 178). As flores são hermafroditas, cíclicas, grandes, de simetria radial (JOLY, 1985, p. 325) e geralmente abrem à noite. O cálice geralmente é penta-lobado (raramente seis), imbricado e a flor apresenta cinco pétalas (raramente seis), soldadas na base juntamente com filamentos e, freqüentemente, depois da antese (desabrochamento), cai juntamente com os estames. Esses são numerosos – em torno de 57 a 750, excedendo as pétalas. Os filamentos dobram-se em forma de “S” em botão e sua porção basal apresenta um tecido glandular secretor de néctar. As anteras são biloculares, oblongas, longitudinalmente deiscentes. O ovário pode ter de quatro a seis lóculos, com um óvulo em cada lóculo. O fruto é uma drupa, com quatro a seis lóculos, mesocarpo fino ou carnosos, gorduroso, endocarpo lenhoso, muricado, tuberculado ou espinhoso no exterior, sementes reniformes ou sub-reniformes e o embrião apresenta uma radícula reta e arqueada. A germinação é criptocotilar, com folhas opostas. O número de cromossomos é  $2n=46$  (PRANCE, 1990, p. 178-179).

### 3.2.1 Aplicações do gênero

O gênero é freqüentemente usado como fonte de óleo a partir do fruto. O alto índice de ácido oléico potencializa o óleo do fruto como um óleo comestível. Além disso, o fruto é altamente nutritivo e é utilizado para fazer sucos e licores. As sementes são utilizadas pelos europeus sob o nome de “souari”, “sowari” ou ainda “butternut”<sup>2</sup>. As sementes também são utilizadas nas Guianas na manufatura de sabonetes. A madeira é resistente e durável, empregada na construção de barcos, estacas e postes.

---

<sup>2</sup> butternut – nome em inglês para um tipo de noqueira branca, podendo ser do gênero *Caryocar*

A madeira de *C. coccineum* foi altamente resistente ao ataque de cinco espécies de fungos xilófagos. (PRANCE, 1990, p. 182-184). Há relatos de que as folhas de *C. microcarpum* apresentam atividade de repelência contra insetos, especialmente formigas cortadoras de folhas, usadas por tribos de Tukanoan e a utilização das folhas como veneno de peixe pelos índios Kubeo, ambos do noroeste amazônico (KAWANISHI; RAFFAUF, 1986, p. 1167). Os índios utilizam a polpa de *C. glabrum*, *C. gracile* e *C. microcarpum* como veneno de peixe – acredita-se que seja pelo elevado conteúdo em saponinas (PRANCE, 1990, p. 185). O gênero é, em sua maioria, polinizado por morcegos (DICKISON, 1990, p. 130).

### 3.2.2 Dados agronômicos do gênero

A espécie *C. villosum* detém crescimento rápido e produção de madeira de boa qualidade, apresentando potencial para plantios florestais. Sua produção anual de sementes não é abundante (VASTANO JR; BARBOSA, 1983, p. 143) e seu poder germinativo foi considerado baixo – cerca de 32 % (ALENCAR; MAGALHÃES, 1979, p. 417). Para compensar tal fato, foi estudado um método de propagação vegetativa com estacas de material juvenil. Essas estacas enraizaram-se bem sob 50 % de sombreamento e com ausência de reguladores de crescimento (VASTANO JR; BARBOSA, 1983, p. 143). Como o gênero comporta espécies que detém usos importantes para a população, foi observada a utilização da mesma espécie para fornecimento de frutos e madeira num estudo sobre as principais plantas utilizadas em projetos de agrofloresta na região da Amazônia (SMITH et al., 1996, p. 16).

A subespécie *C. brasiliense* subsp. *intermedium* – chamado de “pequizeiro-anão” - apresenta potencial para exploração em cultivos comerciais e em programas de melhoramento genético: seus frutos são menores (em torno de oito gramas), possui em média duas sementes e começa a frutificar aos 18 a 24 meses de plantio, com aproximadamente 60 cm de altura, o que revela ser uma planta precoce, pois o pequizeiro comum do Cerrado inicia sua frutificação aos cinco anos após o plantio. O porte baixo dessa subespécie favorece a colheita e permite um plantio de uma maior densidade de plantas por área fornecendo, juntamente com a precocidade de frutificação, um retorno mais rápido de investimentos (SILVA et al., 2001, p. 728).

Uma praga do *C. villosum* foi o *Holopothrips anacardii* Hood, uma espécie de

trips. O ataque forte fez murchar os rebentos de folhas jovens e em tempo de chuva esse evento foi considerado uma praga especial dos piquiás jovens. A planta liberta-se quase totalmente deles quando troca de folhas (ADIS; KERR, 1979, p. 790).

Num estudo sobre aprendizado colaborativo entre pesquisadores e comunidades rurais, percebeu-se que a orientação profissional sobre o potencial econômico de plantas da região amazônica é um passo crucial para o desenvolvimento sustentável da região. Uma das plantas presentes na lista de frutos nativos da região é o *C. villosum* que, por não deter sabor doce em sua polpa não é considerado agradável aos habitantes da região. Contudo, o fruto detém uma grande quantidade de vitamina A e um grande valor calórico, itens faltantes na maioria das dietas dos moradores da região amazônica e que passariam despercebidos se não houvesse uma devida orientação de profissionais (SHANLEY; GAIA, 2002, p. 86).

### 3.2.3 Constituintes químicos do gênero

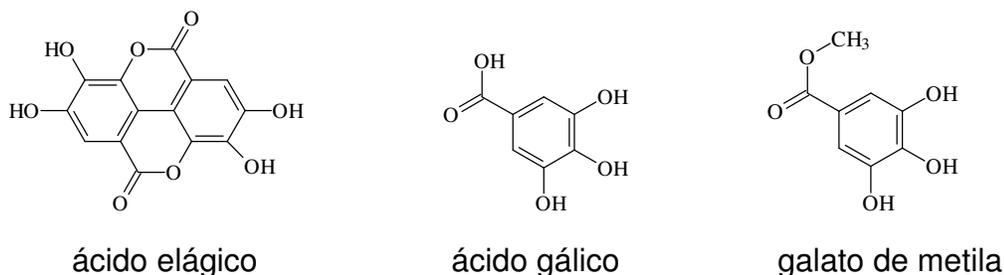
Alguns estudos foram realizados com o gênero *Caryocar*, dentre os quais resalta-se o percentual significativo de ácidos graxos na polpa e semente de *C. butyrosam Aubl.* (FREISE, 1929); presença de cristais de oxalato em *C. nuciferum L.* (FREY-WYSSLING, 1938) e a presença de ferro e fitosteróides da polpa e cerne da noz de *C. villosum* (CERQUEIRA, 1943). Dados relatam que frutos desse gênero apresentam em torno de 31,75 % de polpa e 67 % de gordura, de cor amarela, consistência de vaselina, com cheiro e gosto agradáveis, com 27,8 % de acidez, densidade de 0,856 g/mL a 100 °C, índice de saponificação igual a 196, índice refratométrico igual a 1,4569. A amêndoa apresenta 70,4 % de um óleo branco, sólido, de gosto e aroma agradáveis, com ponto de fusão em torno de 37 °C – esse ponto de fusão o torna interessante para a perfumaria (BORGES, 1944, p. 93).

Foi verificada a presença de mono e di-glicerídeos de palmitodioleína e palmito-oleolinoleína, além de  $\beta$ -oleopalmitina na gordura do fruto de *C. villosum* (MEARA, 1947) e um alto valor de extrato etéreo da parte edível do fruto de *C. coriaceum* Wittm. por extração com Soxhlet, além da presença de cálcio (31,34 mg/100 g da parte comestível), fósforo (30,55 mg/100 g da parte comestível) e ferro (1,16 mg/100 g da parte comestível) (GUEDES; ORIÁ, 1978, p. 94-95).

Em estudo comparativo da quantidade de óleo de *C. coriaceum* Wittm., coletado no Piauí e no Ceará, percebeu-se que o fruto detém uma quantidade de óleo na polpa e amêndoa que excede os 50 %, enquadrando-se como oleaginosa rica em substância graxa, semelhante ao gergelim; o mesocarpo externo estaria numa categoria inferior, entre 14 a 23 %, valores próximos aos da semente de algodão (SALES, 1972, p.109). Outros autores propuseram a presença de ácido oléico (56,34 %), ácido palmítico (27,63 %), ácido linoléico (5,2 %) e linolênico (4,42 %) no óleo da polpa de *C. coriaceum* Wittm. (LIMA et al., 1981, p. 95).

De outros metabólitos, indicou-se a presença de galitaninos com ácido elágico, gálico e galato de metila (Figura 1), glicosídeos do ácido oleanólico e derivados hidroxilados, ácido 2  $\beta$ -hidroxioleanólico, hederagenina e baiogenina de folhas de *C. microcarpum* Ducke (KAWANISHI; RAFFAUF, 1986, p. 1168).

FIGURA 1 - ALGUNS TANINOS EM *C. microcarpum* DUCKE



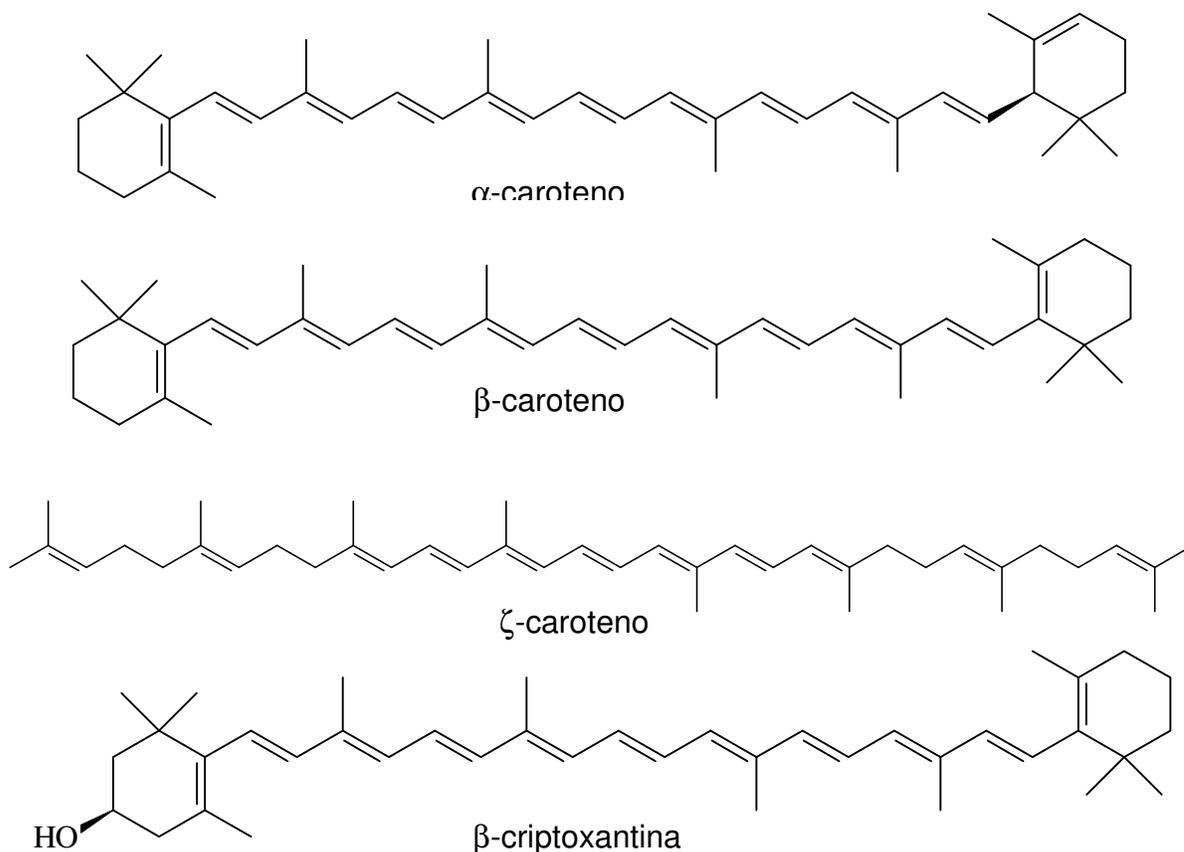
Um estudo envolvendo a composição de carotenóides presentes no fruto de *C. villosum* revelou a presença de  $\alpha$ -caroteno (0,1  $\mu\text{g/g}$  de fruto),  $\beta$ -caroteno (1,2  $\mu\text{g/g}$  de fruto),  $\zeta$ -caroteno (0,5  $\mu\text{g/g}$  de fruto), *cis*- $\beta$ -criptoxantina (0,4  $\mu\text{g/g}$  de fruto),  $\beta$ -criptoxantina (4,4  $\mu\text{g/g}$  de fruto), zeaxantina (7,8  $\mu\text{g/g}$  de fruto) (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1995<sup>3</sup> apud RODRIGUEZ-AMAYA, 1999) (Figura 2).

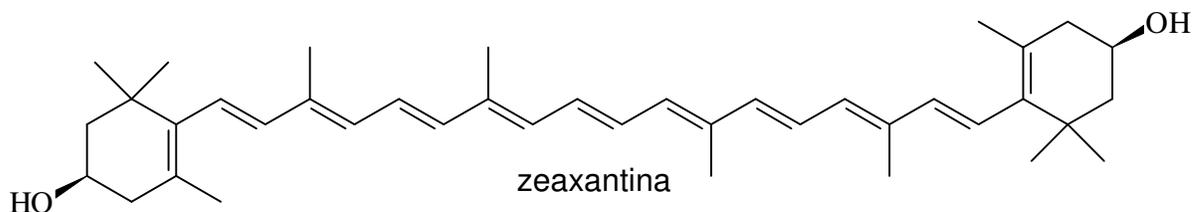
Em estudo sobre os frutos da espécie *C. villosum* (Aubl.) Pers. foi apresentado que esses teriam em torno de 64,5 % de conteúdo lipídico, 33,5 % de ácido palmítico, 29, 5 % de ácido oléico, 3,12 % de carboidratos, 0,1297 % de  $\beta$ -sitosterol, 0,0802 % de estigmasterol 0,083 % de cálcio, 0,58 % de esteróides totais,

<sup>3</sup> RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; GODOY, H. T.; MERCADANTE, A. Z.; RAMOS, D. M. R. Carotenoid composition of underexploited brazilian fruits. **Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Congress of Food Science and Technology**; 1995 July 30- Aug 4; Budapest: International Union of Food Science and

referentes ao peso seco. Foram obtidos também componentes voláteis por arraste de vapor, dos quais os principais foram a 2-heptanona (19,3 %), o furfural (14,62 %), o bisaboleno (18,07 %) e o (E)-nerolidol (19,75 %) em relação ao total de componentes voláteis extraídos (MARX; ANDRADE; MAIA, 1997 p. 443-444). Em estudo envolvendo análise de classes de compostos, o extrato etanólico (95 %) das folhas de *C. microcarpum* (DC.) Sargot revelou por cromatografia a presença de triterpenos, flavonóides e 3',4'-diidroflavonóis; além disso, forneceram resultados na inibição da hidrólise de glucose-6-fosfato mediada por glucose-6-fosfatase *in vitro*, uma das enzimas responsáveis pela gluconeogênese e considerada um dos possíveis alvos para a quimioterapia de diabetes (JIMÉNEZ et al., 2001, p. 78, 80).

FIGURA 2 – ALGUNS CAROTENÓIDES EM *C. villosum*





### 3.3 A ESPÉCIE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., CARYOCARACEAE

O fruto do pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae), o pequi, já conhecido pelos indígenas (pyqui, de py: pele e qui: espinho), é um recurso alimentar importante das populações de baixa renda em Pernambuco, Piauí, Goiás e Mato Grosso, onde vegeta nos chapadões areníticos e constitui um largo recurso alimentar, pelo alto teor nutritivo (MAGALHÃES et al., 1988, p. 31), constituindo pratos deliciosos e nutritivos (CRUZ, 1995, p. 499). Seu fruto é muito utilizado na culinária da região do centro do Brasil. Além disso, o fruto e as folhas são utilizados no tratamento de várias enfermidades, sendo a planta citada como uma das espécies com potencial medicinal da flora do Cerrado (VIEIRA; MARTINS, 2000, p. 14). As indicações sobre o uso do pequi na medicina popular são as seguintes: a folha é utilizada para resfriados, gripes, edemas; o óleo do fruto é usado para resfriados, gripes, edemas, bronquites, tosses, queimaduras; a semente é usada como afrodisíaca, para resfriados e como béquica (VIEIRA; MARTINS, 2000, p. 21).

A planta inteira apresenta excelente madeira para xilografia, construção civil e naval. A casca e folhas são adstringentes e dão matéria tintorial. O fruto apresenta uma massa que envolve o caroço, muito apreciada para alimentação quando cozida em água salgada (PECHNIK; GUIMARÃES, 1957, p. 13). O caroço dá a “manteiga” e o “sebo de pequi” ou de “piquiá” e serve para preparar um licor muito apreciado, sendo industrializado em cidades de Minas Gerais e do Mato Grosso (PIO CORRÊA, 1984). Na medicina popular o *C. brasiliense* é usado como cicatrizante em ferimentos, contusões, peladuras e inchaços, tanto em pessoas como em animais (MAGALHÃES et al., 1988, p. 32). A literatura cita efeitos do *C. brasiliense* contra Sarcoma 180 em animais pelo conteúdo de ácido oleanólico (OLIVEIRA et al., 1970, p. 25). Há indícios de atividade proteásica e hemolítica de lectinas de *C. brasiliense*, bem como atividade enterotóxica *in vivo* em camundongos (SANTIAGO, 1998).

Como sinonímia popular tem-se para a planta o nome de pequizeiro (MAGALHÃES et al., 1988; CRUZ, 1995). Para o fruto: piquiá-bravo (PIO CORRÊA, 1984), pequim, pequiá, piquiá, piqui, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá-pedra, pequerim, suari (CRUZ, 1995, p. 499). Não apresenta sinonímia científica, a não ser o *Caryocar intermedium* que pode ser chamado de *Caryocar brasiliense* subs. *intermedium*.

### 3.3.1 Enquadramento taxonômico

O enquadramento taxonômico do *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae está demonstrado na Tabela 1:

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO SEGUNDO ENGLER (1964) E SEGUNDO CRONQUIST (1988)

Enquadramento taxonômico	Segundo ENGLER (1964)	Segundo CRONQUIST (1988)
DIVISÃO	Angiospermae (ou Anthophyta)	Magnoliophyta
CLASSE	Dicotyledonae	Magnoliopsida
SUBCLASSE	Archichlamydeae	Dilleniidae
ORDEM	Guttiferales	Theales
FAMÍLIA	Caryocaraceae	Caryocaraceae
GÊNERO	<i>Caryocar</i>	<i>Caryocar</i>
ESPÉCIE	<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.	<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.

### 3.3.2 Descrição macroscópica da espécie

O pequizeiro, *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae é uma árvore de tronco robusto, com dois metros de circunferência e mais de 10 metros de altura, revestido de casca escura gratada, galhos grossos, compridos, inclinados, com ramificação basal, o que resulta em vistosa e agradável copa (MAGALHÃES et al., 1988, p. 32). Há autores que consideram que o *C. brasiliense* pode se apresentar em arbustos, com galhos freqüentemente horizontais e opostos (PRANCE, 1990, p. 178). Apresenta folhas opostas ternadas com folíolos ovais (MAGALHÃES et al., 1988, p. 32), verde brilhantes e de textura coriácea, sendo trifoliadas. Flores

amarelas ou brancas, grandes e vistosas reunidas em inflorescências terminais paniculadas, hermafroditas, cíclicas, de simetria radial com 5 a 6 sépalas e outro tanto de pétalas, soldadas na base ou livres. O cálice possui um nectário extrafloral (OLIVEIRA; PIE, 1998, p. 161). Seu androceu é formado por numerosos estames vermelhos, soldados na base ou formando grupos com filetes glandulares, ovário formado por 4 até 20 carpelos com outros tantos lóculos, cada qual com um só óvulo (JOLY, 1985; DICKINSON, 1990, p.125). O fruto é uma drupa globosa com cinco a sete centímetros de diâmetro, com o pericarpo verde amarelado e mesocarpo gorduroso alvacento, encerrando de um até quatro sementes com endocarpo dotado de pêlos – “espinhos agudos” (JOLY, 1985; MAGALHÃES et al., 1988).

FIGURA 3 – ASPECTO GERAL DO *Caryocar brasiliense* CAMB. NA REGIÃO DE MONTES CLAROS, MG.



FONTE: PAULA JR, 2002

FIGURA 4 – ASPECTO GERAL DA FLOR DE *C. brasiliense* CAMB. NA REGIÃO DE MONTES CLAROS, MG



FONTE: PAULA JR, 2002

FIGURA 5 – ASPECTO GERAL DOS FRUTOS JOVENS E FOLHAS DE *C. brasiliense* CAMB.



FONTE: PAULA JR, 2002

FIGURA 6 – ASPECTO GERAL DO FRUTO DE *C. brasiliense* CAMB.



FONTE: NAKASHIMA, PEREZ, 2003

### 3.3.3 Dados agronômicos da espécie

Foi observado que as plantas jovens apresentavam sementes persistentes, enterradas a uma profundidade do solo de até 10 cm, cicatrizes de folhas e ramos mortos e forte lignificação de ramos e raízes, indicando germinação não recente, devendo a planta já ter atravessado um período de seca depois de germinada (LABOURIAU et al., 1963, p. 230). A dispersão de suas sementes ocorre na estação chuvosa, ao contrário de muitas espécies do Cerrado, que dispersam suas sementes no fim da estação seca (admite-se como fim da estação em setembro) (LABOURIAU et al., 1963, p. 233). Nota-se que espécies com a mesma característica de liberação de sementes na estação chuvosa têm suas plântulas eliminadas na estação seca subsequente. Isso não ocorre com o *C. brasiliense* (LABOURIAU et al., 1963, p. 235-236), provavelmente devido a um possível tecido que se assemelhe a um tubérculo aquífero, posteriormente descoberto (LABOURIAU; VÁLIO; HERINGER, 1964, p. 460). Em fevereiro de 1963 foi verificada a germinação natural do *C. brasiliense* no Cerrado, com plântulas detendo suas sementes em profundidades de 5 a 20 cm do solo. O ramo e a raiz são ortotropos e crescem em direção oposta, mas a região do coleto apresenta-se como uma curva torsa e funciona, nos primeiros cinco anos de vida, como um órgão fisiologicamente análogo a um tubérculo aquífero (LABOURIAU; VÁLIO; HERINGER, 1964, p. 450, 458-460).

Estudos afirmam que formigas atraídas por nectários extraflorais podem beneficiar a planta hospedeira numa relação de mutualismo: as formigas protegem a planta contra herbívoros, promovem o crescimento e a sobrevivência da planta hospedeira por cortar as folhagens vizinhas, alimentam a hospedeira com nutrientes, dispersam sementes e frutos e auxiliam na polinização da planta; a planta forneceria o néctar, com açúcares, aminoácidos, proteínas, gorduras e outros compostos orgânicos em pequenas quantidades. No caso do *C. brasiliense*, os nectários florais encontrados no cálice da flor foram relatados como elo de interação com as formigas. As principais visitantes seriam a *Zacryptocerus pusillus* (de dia) e a *Camponotus rufipes* (à noite) (OLIVEIRA; PIE, 1998, p. 162-163,169).

*C. brasiliense* apresenta uma antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, verificada na região do Distrito Federal, BR. Além disso, outras doenças já

foram relatadas em pequizeiro: a podridão das raízes, causada por *Cylindrocladium clavatum* Hodges & May; o mal do cipó, causado por *Phomopsis* sp.; a morte descendente dos ramos, causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffone & Maubl. e a podridão dos frutos, causada por *L. theobromae* (Pat.) Griffone & Maubl. e por *Phomopsis* sp. (ANJOS; CHARCHAR; AKIMOTO, 2002, p. 96).

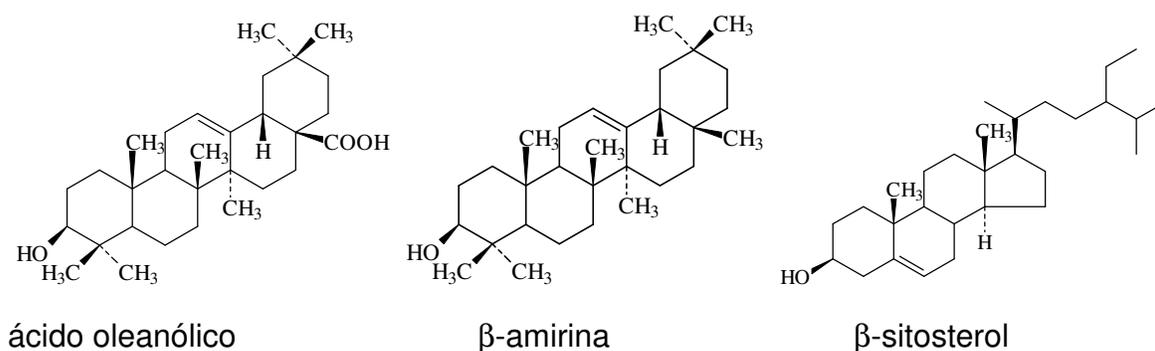
### 3.3.4 Conteúdo químico da espécie

Poucos estudos evidenciaram a composição química de *C. brasiliense*, sendo uma espécie não acumuladora de Al, mantendo os níveis desse entre 0,01 a 0,06 % e nunca acima de 0,08 % - contra teores de 1,0 a 1,8 % e nunca abaixo de 0,9 %, característico das plantas acumuladoras. *C. brasiliense* apresenta níveis baixos desse metal na época chuvosa (entre novembro a fevereiro), independente se a área de sua localização teve queimadas ou não na estação anterior. Com relação a outros nutrientes como o N, P, K, Ca ou Mg, com variação sazonal de concentração nas folhas, não há tendências que relacionem essa variação com o acúmulo ou não o Al (MEDEIROS; HARIDASAN, 1985, p. 433–436). Outro estudo, relacionando os minerais existentes no fruto coletado na região do Mato Grosso do Sul, afirma que a amêndoa é uma fonte interessante de Mn, Zn, Cu, Mg e P, além da presença de Na, Fe e Ca sendo esses minerais presentes tanto na amêndoa quanto no fruto. A concentração de P (1,21 g %) é bastante elevada, atingindo o teor da ingestão diária recomendada pela NAS/NRC (National Academy of Science/National Research Council- EUA) (HIANE et al., 1992, p.210-212).

Em estudo dos aspectos fenológicos, com relação ao conteúdo de clorofila *a* e *b*, constatou-se que nas fenofases (floração, frutificação, queda foliar e brotamento) não ocorreram diferenças significativas da proporção entre os dois tipos de clorofila entre o período de total expansão foliar, (janeiro) até a o período próximo da senescência (julho). A variação aumenta no início da senescência e diminui até zero (folhas recém-caídas em agosto), sendo detectada nos primórdios foliares. Entre janeiro até junho há uma quantidade maior de clorofila *a* em relação a *b* e, no período de julho até setembro, há o aumento da quantidade de clorofila *b* em relação a *a* (SOAVE; SILVA, 1993, p. 62-63). Foi verificada vitamina A e alto nível energético no óleo do fruto de *C. brasiliense* (CAMPOS, 1944, p. 13); presença de

carotenóides, detendo 64,2 mg de pró-vitamina A /100 g do óleo da polpa (PECHNIK; GUIMARÃES, 1957, p. 15); presença de friedelina, friedelanol, ácido oleanóico,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, ácido elágico,  $\beta$ -amirina e ácido oleanóico em folhas (OLIVEIRA; GILBERT; MORS, 1968, p. 432) (Figura 7); presença de heterosídeos antociânicos, saponinas, taninos, flavonóides, esteróides e osídios redutores em folhas (MAGALHÃES et al., 1988, p. 40); açúcares redutores, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenos e saponinas na folha e botão floral (MARQUES, 2001, p. 45-46); presença de lectinas e proteínas com pesos variando de 12 a 82 kDa no fruto (SANTIAGO, 1998, p. 78).

FIGURA 7 – ALGUNS ESTERÓIDES EM *C. brasiliense*

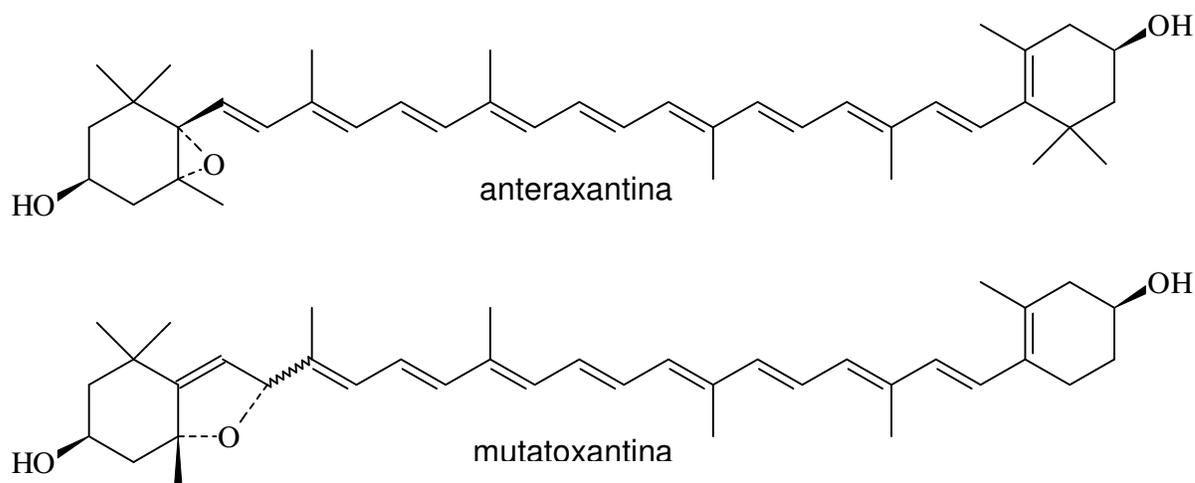


A literatura afirma que não há diferença significativa entre a composição química dos óleos de *C. villosum* e *C. brasiliense* (PRANCE, 1990, p. 182). O óleo do fruto contém ácido mirístico, ácido palmítico, esteárico, oléico e linoléico (FERREIRA; MOTIDOME, 1962, p. 28; HANDRO; BARRADAS, 1971<sup>4</sup> apud LIMA et al., 1981, p. 93) e um estudo recente aponta 45,7 % de ácido oléico, 38,8 % de ácido palmítico, 11,1 % de ácido esteárico e 4,5 % de ácido linoléico (SEGALL et al., 2002, p. S18). Com relação à composição carotenóidica do fruto, foram identificados e quantificados os principais carotenóides presentes no mesocarpo interno, antes e depois de um cozimento convencional, semelhante ao que é realizado na culinária regional da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os frutos apresentaram, antes do cozimento,  $\beta$ -caroteno (9,35  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno),  $\zeta$ -caroteno (17,79  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno), criptoflavina (12,14  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno),  $\beta$ -

<sup>4</sup> HANDRO, W.; BARRADAS, M. M. Sobre os óleos do fruto e da semente do piqui, *Caryocar*

criptoxantina (93,67  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno), anteraxantina (79,14  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno), zeaxantina (4,32  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno) e mutatoxantina (14,68  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno). Após o cozimento, acusou-se a presença dos carotenóides  $\beta$ -caroteno (12,17  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno),  $\zeta$ -caroteno (8,17  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno), criptoflavina (12,65  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno),  $\beta$ -criptoxantina (7,99  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno), anteraxantina (31,28  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno), zeaxantina (79,73  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno) e mutatoxantina (2,07  $\mu\text{g/g}$  mesocarpo interno) (RAMOS et al., 2001, p. 27) (Figura 8).

FIGURA 8 – ALGUNS CAROTENÓIDES EM *C. brasiliense*



Em estudo mensurando-se a capacidade moluscicida de extratos contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário da esquistossomose, foi encontrado que os extratos etanólicos das folhas e cascas de *C. brasiliense* provocaram a morte de 90 % dos organismos após 48 horas, na concentração de 100 ppm, com a presença de taninos condensados, hidrolisáveis e flavonóides em ambos os extratos e presença de terpenos no extrato da folha (BEZERRA et al., 2002, p. 429-430).

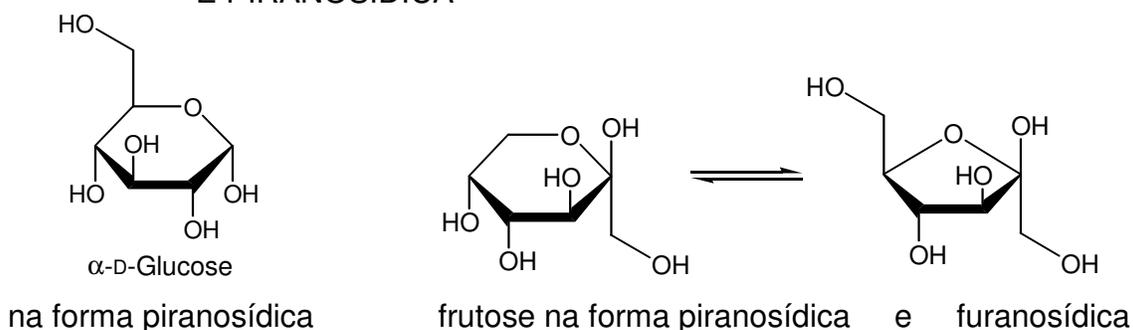
### 3.4 CARBOIDRATOS

São produtos do metabolismo primário. Os polissacarídeos são policondensados de monossacarídeos ou seus derivados por ligação glicosídica –

cada monossacarídeo é ligado ao outro por meio de uma ligação osídica resultante da ligação da hidroxila hemiacetálica em C-1 com quaisquer hidroxilas do outro monossacarídeo, com eliminação de uma molécula de água (VON POSER, 2000, p. 417). Já os monossacarídeos são poliidroxicetonas (cetoses) ou poliidroxi-aldeídos (aldoses) de 3-7 átomos de carbono, em cadeia linear alifática ou em estrutura cíclica. Geralmente na natureza os monossacarídeos de cinco unidades de carbono – pentoses – e de seis – hexoses – são mais abundantes nos polissacarídeos.

Os monossacarídeos do tipo pentoses e hexoses possuem estruturas cíclicas, que podem ser furanosídica ou piranosídica (Figura 9), resultantes da reação intermolecular do grupo carbonílico no C-1 ou C-2 com grupos hidroxílicos em C-4 ou C-5 da estrutura em cadeia aberta, correspondendo a um hemiacetal cíclico (CORRÊA, 1971, p. 2).

FIGURA 9 – EXEMPLOS DE MONOSSACARÍDEOS NA FORMA FURANOSÍDICA E PIRANOSÍDICA



Essa estrutura cíclica possui um carbono assimétrico a mais que a estrutura aberta, fornecendo assim formas isoméricas, denominadas anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ . Esses hemiacetais  $\alpha$  e  $\beta$  se interconvertem facilmente, via estrutura aberta, por hidrólise.

A ligação glicosídica é formada pela condensação dos grupos OH do carbono anomérico (C-1 para as aldoses e C-2 para as cetoses) com qualquer dos grupos OH dos carbonos não anoméricos do outro monossacarídeo; portanto, a ligação glicosídica terá configuração  $\alpha$  ou  $\beta$ , e essa configuração geralmente se repete ao longo da cadeia. As ligações glicosídicas podem envolver os mesmos ou diferentes grupos hidroxílicos das unidades monossacarídicas, que podem ser da mesma espécie (homopolissacarídeos) ou de diferentes espécies (heteropolissacarídeos) (CORRÊA, 1971, p. 2). Exemplos são a amilose e a celulose

(homopolissacarídeos lineares), homopolissacarídeos ramificados como a amilopectina e o glicogênio, e os heteropolissacarídeos, como o peptidoglicano das paredes das células bacterianas e o ácido hialurônico nos animais.

Apresentam funções energéticas, estruturais, de transporte de informação genética, sinalização celular e são considerados atualmente como drogas em potencial (LEHNINGER, 1995, p. 222-223).

Há estudos de polissacarídeos de origem vegetal como uma importante classe de compostos bioativos. Atividade antitumoral, imunoestimulante, anticomplemento, antiinflamatória, anticoagulante, antiviral, redutora dos níveis de uréia plasmática (em pacientes com insuficiência renal crônica), hipoglicêmica e hipocolesterolemizante têm sido relatadas para uma grande variedade de polissacarídeos (VON POSER, 2000, p. 417). Os nucleosídeos (carboidratos mais uma base nitrogenada) são resultantes do metabolismo e muitos apresentam atividade biológica (SOARES; SOUZA; FERREIRA, 2001, p. 209).

As galactomananas são polissacarídeos formados por uma cadeia principal de unidades de D-manopiranosose ligadas glicosidicamente  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Unidades de D-galactopiranosose ligadas glicosidicamente  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) estão distribuídas na cadeia principal do polissacarídeo. Esse tipo de polissacarídeo apresenta-se como agente na regulação do equilíbrio hídrico durante a germinação (GANTER, 1988, p. 7).

Sementes de leguminosas detêm com freqüência galactomananas. Em estudo sobre a composição dos polissacarídeos solúveis em água não amiláceos em grãos de ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Vicia faba*) e soja (*Glycine max*), percebeu-se que a arabinose era o principal constituinte na ervilha e feijão, seguido de galactose, ácido galacturônico, glucose e traços de ramnose, manose e xilose. A composição dos polissacarídeos do soja (solúveis em água) deteve concentrações maiores de galactose ao invés de arabinose (BRILLOUET; CARRÉ, 1983, p. 841).

As paredes celulares de plantas superiores são caracterizadas como amálgamas de microfibrilas de celulose enoveladas por ligações cruzadas com glicanas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4), em matriz rica em pectina (BUCKERIDGE; VERGARA; CARPITA, 2001, p. 1045). As paredes celulares primárias do grão de soja apresentaram grandes quantidades de arabinose, galactose e ácido galacturônico como açúcares pécnicos não celulósicos e, no caso da ervilha e do feijão, menores quantidades de galactose, xilose, ramnose e fucose (BRILLOUET; CARRÉ, 1983, p. 841, 843).

Em grãos de cevada (*Hordeum distocon*) foram encontradas arabinoxilanas. Essas são cadeias de resíduos de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xilopiranosil, substituído de forma diversa nas posições 2' e 3' com resíduos de L-arabinofuranosil, fornecendo polímeros altamente ramificados (MORRAL, BRIGOS, 1978, p. 1495).

As arabinogalactanas são divididas em dois grupos: arabino-4-galactanas (Aspinall tipo 1) e arabino-3,6-galactanas (Aspinall tipo 2). Esses grupos são constituintes de complexos pécticos em sementes e bulbos, sendo que arabino-3,6-galactanas ocorrem mais freqüentemente em angiospermas (BUCHALA, MEIER, 1981, p. 137).

As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos com respeito ao tipo de monossacarídeo e a natureza das ligações. O termo hemicelulose é usado para abranger polissacarídeos da matriz celular, diferentes de celulose e pectina, que fazem parte da parede celular, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1959, p. 429; CARNEIRO, 2000, p. 8). As hemiceluloses de plantas terrestres são constituídas principalmente pelos monossacarídeos D-xilose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, ácido 4-O-metilglucurônico, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico e D-manose, podendo ter em menor quantidade L-ramnose, L-fucose e vários açúcares neutros O-metilados (RECHIA, 1992, p. 5; CARNEIRO, 2000, p. 8). Seus polissacarídeos geralmente são glucuronoxilanas, arabinoxilanas, mananas, arabinogalactanas, glucomananas, galactoglucomananas e xiloglucanas. Nas dicotiledôneas predomina a xiloglucana, composta por uma cadeia principal de unidades de glucose em ligação (1 $\rightarrow$ 4) com algumas unidades substituídas em O-6, por unidades de  $\alpha$ -xilopiranosose (CARNEIRO, 2000, p. 8-9). Outros autores afirmam que em tecidos lenhosos de angiospermas há a predominância de glucuronoxilanas (BOCHICCHIO, REICHER, 2003, p. 127).

Geralmente o termo hemicelulose é restrito a substâncias extraídas em soluções alcalinas. Hemiceluloses com L-arabinose são conhecidas há algum tempo; entretanto, hemiceluloses baseadas em resíduos de D-xilose contendo L-arabinose só foram conclusivamente demonstradas em 1951 (ASPINALL, 1959, p. 431).

Polissacarídeos com cadeia de D-manose estão em maior ocorrência em sementes de plantas. Mananas e glucomananas de vegetais contém cadeias lineares de resíduos de  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)D-manose e  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)D-glucose como principais

constituintes, podendo apresentar pequena proporção de D-galactose, geralmente encontrados como grupos finais não redutores. Galactanas em pectinas de *Lupinus albus* e em sementes de *Strychnos nux vomica* são de estruturas totalmente diferentes, contendo essencialmente cadeias lineares de  $\beta(1\rightarrow4)$ D-galactopiranosose. Outras hemiceluloses podem conter D-glucose, geralmente associadas à D-manose, principalmente em plantas superiores (ASPINALL, 1959, p. 449, 454, 459).

### 3.5 CAROTENÓIDES

Os carotenóides são tetraterpenos, metabólitos secundários derivados do metabolismo do acetato, isopreno ou também chamados de derivados do mevalonato. São, com exceções, metabólitos polioleofínicos com 40 carbonos. Ocorrem em plantas verdes e organismos menores, como algas, bactérias e fungos (MANN, 1995, p. 159).

A América Latina é rica em alimentos com carotenóides advindos de plantas, contendo espécies pouco ou absolutamente desconhecidas em relação ao conteúdo de carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999, p. 74-S) – em regiões frias as antocianidinas são predominantes (RODRIGUEZ-AMAYA, 2002, p. 6). Apresentam-se geralmente com coloração amarelo-laranja e dividem-se em duas classes: carotenos e xantofilas. O caroteno cíclico mais comum é o  $\beta$ -caroteno, seguido do  $\alpha$ -caroteno. O licopeno é um caroteno acíclico; sua ciclização produz  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno. Modificações são comuns e os derivados oxigenados (geralmente produtos de processos fotoprotetores) são chamados xantofilas. Modificações oxidativas drásticas formam metabólitos como a capsantina das pimentas vermelhas. A fucoxantina ocorre em algas marrons e organismos menores e é um dos mais abundantes carotenóides naturais; acredita-se que ela faça parte de uma rota essencial na fotossíntese das algas (MANN, 1995, p.163-164).

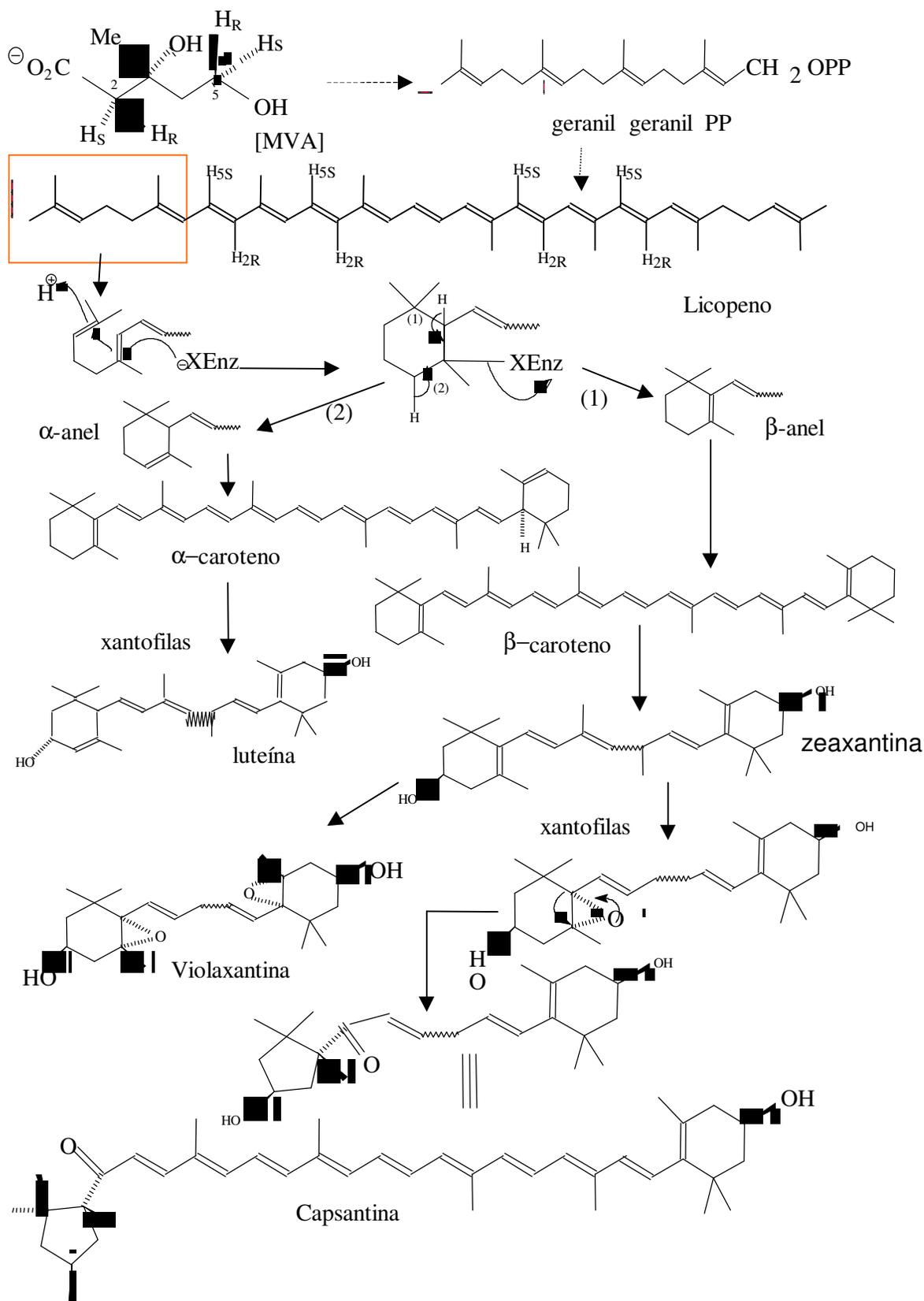
Mais de 600 variantes estruturais estão caracterizadas. A produção natural mundial é estimada em 100 milhões de toneladas por ano e é encabeçada pela fucoxantina das algas fotossintéticas marrons (FONTANA et al., 2000, p. 42). Nas áreas tropicais e subtropicais da América Latina, as plantas carotenogênicas apresentam-se em grandes quantidades, muitas vezes parcial ou totalmente desconhecidas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999, p. 74S).

Os mamíferos não são capacitados para a biossíntese de carotenóides, mas podem acumular e/ou converter precursores que obtêm da dieta (conversão de  $\beta$ -caroteno em vitamina A) (FONTANA et al., 2000, p. 42).

Os carotenóides comumente encontrados nos vegetais são  $\beta$ -caroteno, encontrado na cenoura (*Daucus carota*), buriti (*Mauritia vinifera* Mart.); licopeno, encontrado no tomate (*Lycopersicum esculentum*); várias xantofilas (zeaxantina, luteína e outros oxigenados) encontradas no milho (*Zea mays*) e na gema de ovo;  $\beta$ -criptoxantina no mamão (*Carica papaya*), cajá (*Spondias lutea*) pitanga (*Eugenia uniflora*) e nectarina (*Prunus persica*); violaxantina, xantofila epoxilada encontrada na manga (*Mango indica*); e bixina (aditivo culinário e corante dérmico usado por indígenas amazônicos), obtido do urucum (*Bixa orellana*). Outros são a capsantina e capsorubina da páprica (*Capsicum annum*) e a crocina encontrada no açafrão (*Crocus sativus*), que é solúvel em água e um dos raros glicosídeos diterpênicos (C<sub>20</sub>) encontrados em plantas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999, p. 75S-76S; FONTANA et al., 2000, p. 42).

Os carotenóides apresentam variações de estrutura, e seus frutos são classificados em grupos conforme o grupo de carotenóides majoritário (GOODWIN; BRITTON, 1988, p. 72):

Grupo	Característica dos pigmentos
I	frutos com quantidades insignificantes de pigmentos
II	pequenas quantidades, geralmente carotenóides de cloroplastos
III	quantidades grandes de licopeno e seus hidroxí-derivados
IV	quantidades grandes de $\beta$ -caroteno e seus hidroxí-derivados
V	quantidades grandes de epóxidos, principalmente furanos
VI	carotenóides incomuns (p. e., capsantina)
VII	poli-Z carotenóides (p. e., prolicopeno)
VIII	apocarotenóides (p. e., persicaxantina)

FIGURA 10 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DO  $\alpha$  E  $\beta$ -CAROTENO E XANTOFILAS

FONTE: TOLEDO et al., 2002

Como a cadeia é repleta de ligações insaturadas, os carotenóides são muito sensíveis à presença de oxigênio, calor, luz e ácidos. Os carotenóides de origem ácida que estejam esterificados geralmente são hidrolisados na presença de bases fortes. Para minimizar problemas de artefatos são ideais as seguintes condições:

- Atmosfera inerte: a estocagem dos extratos deve ser realizada preferencialmente sob vácuo ou atmosfera de nitrogênio ou ainda dióxido de carbono e as manipulações podem ser realizadas em atmosfera normal de forma muito rápida.
- Temperatura: os processos extrativos, de manipulação e reações em geral devem ser realizadas em temperatura próxima a 25 °C ou abaixo. As soluções de pigmentos devem ser estocadas em congelador a -20 °C ou refrigerador a 5 °C. A concentração das soluções pode ser feita por meio de pressão reduzida com auxílio de banhos de água que não supere 40 °C, tendo cautela para que não ocorra superaquecimento quando o pigmento ou a mistura estão quase secos.
- Ausência de luz: todas as soluções devem ser estocadas no escuro. Durante a manipulação, devem ser mantidas em recipientes que não permitam a passagem de luminosidade (p.e., vidros âmbar e cobertura com papel alumínio).
- Ausência de agentes ácidos: a manipulação de ácidos deve ser evitada quando estiver ocorrendo a separação de carotenóides – os 5,6- epóxidos, p.e, são clivados e sofrem rearranjo a 5,8-epóxidos na presença de ácidos.
- Agentes alcalinos: a maioria dos carotenóides é estável ao tratamento de saponificação com soluções metanólicas de KOH a 5-10 % e adsorventes alcalinos, como o hidróxido de cálcio, utilizados em cromatografias.
- Solventes e reagentes: livres de peróxidos, neutros e recentemente destilados.

As extrações que visam a obtenção de carotenóides devem ser realizadas preferencialmente em material fresco, tendo como líquido extrator acetona ou metanol, ou uma mistura de ambos, sendo a trituração realizada com auxílio de um liquidificador (LIAAEN-JENSEN; JENSEN, 1971, p. 587; DAVIES, 1976, p. 54-61).

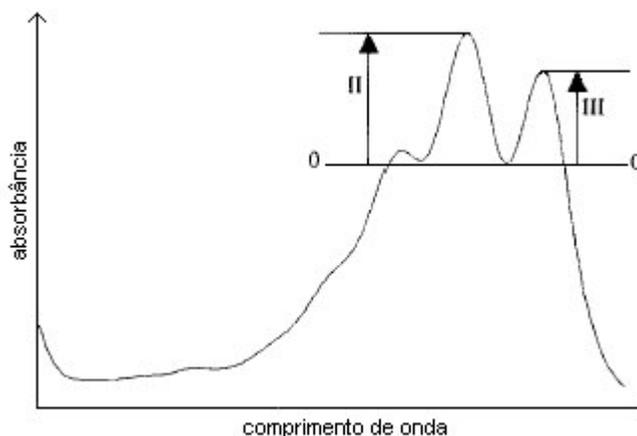
A identificação dos carotenóides pode ser obtida por meio de vários parâmetros de análise. O ideal é trabalhar com vários parâmetros associados para uma identificação mais precisa, tais como (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 45): ordem de eluição na coluna (depende da fase estacionária e móvel utilizada);

valores de Rf e coeluição em CCD; espectro em UV-visível; e testes químicos.

A ordem de eluição na coluna é um parâmetro variável, pois pode ocorrer coeluição de alguns carotenóides de difícil separação, como a violaxantina e a luteína em extratos de alface (KIMURA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002, p. 391). As frações podem ser recromatografadas, podendo ocorrer perda do carotenóide por aumento de manipulação (exposição ao oxigênio, luz etc.). Os valores de Rf também podem ser imprecisos: variações de qualidade no solvente, temperatura da análise, saturação da cuba e espessura da fase estacionária podem desenvolver cromatogramas diferentes; portanto é um parâmetro que necessita de confirmação para ser significativo. A coeluição em CCD pode ser acoplada a um densitômetro, podendo assim inclusive servir para auxiliar a quantificação da substância.

O espectro de UV-visível fornece dados relevantes na pesquisa de carotenóides. Apesar da maioria deter absorvância na região de 450 nm e seus grupamentos cromóforos serem parecidos, há dados que facilitam a identificação. No espectro obtido em dado solvente, a razão percentual da altura dos dois máximos de absorvância ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) é chamada de % III/II. É a razão da altura da absorvância no maior comprimento de onda, designado por III, pela altura do segundo maior comprimento de onda, chamado de II. Essas alturas têm como linha base a inflexão entre esses picos e o quociente é multiplicado por 100 (Figura 11).

FIGURA 11 – CÁLCULO DA % III/II ( $\% \text{ III/II} = \text{III/II} \times 100$ )



FONTE: RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 18.

Os testes químicos auxiliam na identificação dos carotenóides,

principalmente aqueles que podem ser submetidos a reações simples, como acetilação, metilação, redução e rearranjo de grupamentos epóxido. As xantofilas podem ser facilmente identificadas por reações químicas específicas e de fácil execução, pois suas hidroxilas são facilmente acetiladas em presença de anidrido acético e piridina. Já hidroxilas em posição alílica (dupla isolada ou pertencente a um cromóforo) podem ser metiladas com metanol em meio ácido. A visualização da acetilação ou metilação é feita pelo aumento de Rf em CCD, e os produtos formados são de acordo com o número de hidroxilas presentes. Grupamentos epóxidos em posição 5,6 ou 5,6-5',6' são facilmente identificados pela sua conversão a epóxidos do tipo furano em presença de ácido como catalisador, originando um efeito hipsocrômico de 20-25 nm ou 40-50 nm, respectivamente. Além disso, em CCD, epóxidos em posição 5,6 ou 5,8 ao serem expostos a vapores de HCl, mudam sua cor de amarelo para azul-esverdeado. Carotenóides que apresentem grupamentos cetônicos ou aldeídicos podem ser submetidos a reduções com  $\text{LiAlH}_4$  ou  $\text{NaBH}_4$  (DAVIES, 1976, p. 142; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 22).

A atividade antioxidante dos carotenos é significativa e ocorre naturalmente nos constituintes da dieta (MOURE et al., 2001, p. 147), sendo essa atividade o principal interesse de comercialização da mesma. Há participação dos carotenos na fotossíntese e na proteção das plantas de injúria oxidativa por fotossensibilização (PALOZZA; KRINSKY, 1992). Se essa fotoproteção dos carotenóides for prejudicada, a planta morre. A biossíntese dos carotenóides é um alvo em potencial para a descoberta de substâncias com ação herbicida (BRITTON, 1988, p.174).

A verificação da atividade antioxidante já foi realizada com  $\beta$ -caroteno (FOOTE; CHANG; DENNY, 1970, p. 5217), capsantina e xantofilas em geral (MATSUFUJI et al., 1998, p. 3468). Esta propriedade relaciona-se com indícios de que o  $\beta$ -caroteno auxilie na prevenção de alguns tipos de câncer, como o de pulmão (NOMURA et al., 1985) e o mecanismo de proteção não necessariamente envolva a atividade pró-vitamina A (PETO et al., 1981, p. 201, 207). Existem evidências que fenômenos oxidativos são fatores importantes em doenças cardiovasculares (ROBERFROID; CALDERON, 1995<sup>5</sup> apud KURILICH; JUVIK, 1999, p. 1949). Há

---

<sup>5</sup> ROBERFROID, M. D. CALDERON, P. B. **Free radicals and oxidation phenomena in biological systems**. New York: Dekker, 1995, 272 p.

referência de que os carotenóides podem inibir transformações neoplásticas (BERTRAM; BORTKIEWICZ, 1995) e fornecer fotoproteção (MATHEUS-ROTH, 1986<sup>6</sup> apud KURILICH; JUVIK, 1999, p. 1949). Acredita-se que o  $\beta$ -caroteno é um colaborador na resposta imunitária por aumentar a quantidade de linfócitos encontrados no sangue periférico (BENDICH; SHAPIRO, 1986, p. 2254). Os carotenóides luteína e zeaxantina são os pigmentos amarelos da região da mácula na retina humana. Verificou-se que um aumento significativo na ingestão de fontes desses carotenóides está associado com a redução do risco de desenvolvimento de catarata e degeneração macular associada à idade em humanos (KNEKT et al., 1992; SEDDON et al., 1994; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002, p. 4).

### 3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

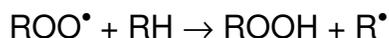
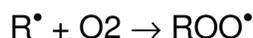
A peroxidação lipídica *in vivo* é uma das possíveis causas do envelhecimento celular e da geração de células cancerosas. Essa fornece radicais livres que se propagam, causando danos em moléculas lipídicas.

Esse processo pode ser ilustrado por três estágios:

Iniciação:

produção do radical livre  $R^\bullet$  de um precursor molecular

Propagação:



Terminação:



Nesse exemplo, RH representa o lipídio (geralmente um ácido graxo poliinsaturado) e  $R^\bullet$  um radical livre em carbono. O precursor molecular do processo de inicialização é geralmente um produto de hidroperoxidação (ROOH) (BURTON; INGOLD, 1984, p. 569; CHIMI et al., 1991, p. 307). Para controlar e reduzir a

---

<sup>6</sup> MATHEUS-ROTH, M. M. Carotenoids quench evolution of excited species in epidermis exposed to UV-B (290-320 nm) light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, p. 91-93, 1986.

peroxidação lipídica, a natureza faz uso dos antioxidantes. Esses são divididos em duas classes: antioxidantes preventivos e inibidores da propagação em cadeia. Os antioxidantes preventivos reduzem a taxa de inicialização da reação em cadeia enquanto que os antioxidantes inibidores de propagação interferem na propagação por capturar os radicais  $\text{ROO}^\bullet$  e/ou  $\text{R}^\bullet$ . Os mecanismos são explicados a seguir:

1. Antioxidantes preventivos (ou decompositores de peróxido): reduzem estequiometricamente os hidroperóxidos a seus álcoois correspondentes

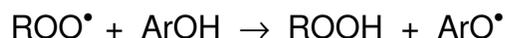


ou decompõem cataliticamente o hidroperóxido em produtos não radicalares



Exemplo disso são as enzimas, como a catalase e peroxidase, que atuam destruindo hidroperóxidos sem gerar radicais livres.

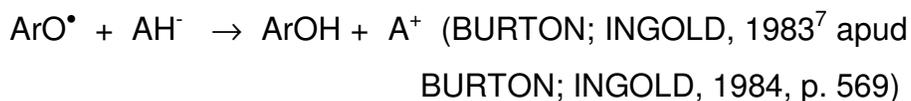
2. Antioxidantes inibidores da propagação em cadeia: são geralmente fenóis ou aminas aromáticas. A habilidade dessa classe consiste em capturar radicais peroxila. Para um fenol, p.e., um tocoferol, o passo inicial envolve uma transferência rápida do hidrogênio da hidroxila fenólica



O radical fenoxila é estabilizado por ressonância e é relativamente inativo frente ao  $\text{RH}$  e  $\text{O}_2$ , não dando continuidade à cadeia. Pode ser eventualmente destruído por reação com um segundo radical peróxido



ou, em alguns sistemas, o radical fenoxila pode ser reduzido a fenol pela reação com agentes redutores hidrossolúveis como a vitamina C:



Os antioxidantes principais em organismos vivos são a enzima superóxido dismutase, atuando em fase aquosa, e a vitamina E, que atua em fase lipídica. A vitamina E é considerada (principalmente  $\alpha$ -tocoferol) como o maior e provavelmente um dos únicos “capturadores” de radicais peroxila - antioxidante inibidor da propagação em cadeia - solúvel em lipídios, presente no sangue humano. O anel heterocíclico na molécula de  $\alpha$ -tocoferol representa um importante papel na otimização da atividade antioxidante (BURTON; INGOLD, 1984, p. 569-570).

Outra classificação organiza os antioxidantes em três tipos:

1. Substâncias redutoras de radicais oxigênio nas formas de singlete, substâncias redutoras (ácido ascórbico) e antioxidantes do tipo carotenóides
2. Antioxidantes primários ou de inibição de propagação de cadeia
3. Substâncias queladoras de metais (essenciais para a atividade de algumas enzimas) (BORONAT; TAMAMEZ, 1997<sup>8</sup> apud MOURE et al., 2001, p.150)

Há evidências do  $\beta$ -caroteno como pró-oxidante (OLCOVICH; MATTILL, 1931, p. 105) enquanto outros autores afirmam sua atividade antioxidante (TERAO, 1989, p. 660). BURTON E INGOLD (1984, p. 570) concluíram que o  $\beta$ -caroteno pode funcionar como antioxidante em sistemas nos quais o oxigênio na forma de singlete não está presente, ao contrário da vitamina E, que reage com altas concentrações de oxigênio; entretanto, não seria por mecanismo clássico de prevenção da decomposição de peróxido nem inibição da propagação em cadeia.

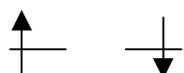
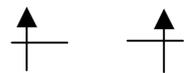
Formas de oxigênio singlete são átomos/moléculas com distribuição eletrônica nos orbitais moleculares no estado excitado, conforme a Tabela 2:

---

<sup>7</sup> BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. **Protective agents in cancer**. McBrien, D. C. H.; Slater, T. F. (ed), London: Academic Press, 1983, p. 83

<sup>8</sup> BORONAT, M. C. T.; TAMAMEZ, E. L. El papel de los antioxidantes. **Alimentaria**, v. 6, p. 19-27, 1997

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $\pi^*$ ) DO OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE ( $^1\Sigma_g^+$ ,  $^1\Delta_g$ ) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE ( $^3\Sigma_g^-$ )

Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia (kcal/mol)
$^1\Sigma_g^+$		37,5
$^1\Delta_g$		22,5
$^3\Sigma_g^-$		-

FONTE: MARTINEZ; MEDEIROS; DI MASCIO, 2000, p. 686

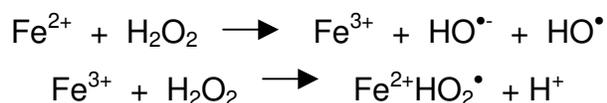
O oxigênio no estado excitado pode apresentar-se em duas formas, o  $^1\Delta_g$  e o  $^1\Sigma_g^+$ , tendo o primeiro energia 22 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (aproximadamente 2-4  $\mu$ s em  $H_2O$ ) e o segundo tem energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado  $^1\Delta_g$ . Considerando estas características, a única forma de oxigênio singlete que apresenta interesse em sistema biológicos é a forma  $^1\Delta_g$ , que será denotado por  $^1O_2$ . O  $^1O_2$  apresenta alta reatividade, oxida muitas funções orgânicas ricas em elétrons, como sulfetos, aminas e fenóis. Sendo assim, serão importantes alvos biológicos do  $^1O_2$  moléculas fundamentais como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA (MARTINEZ; MEDEIROS; DI MASCIO, 2000, p. 686).

Um método desejável de avaliação antioxidante (ou afim, como a de captura de substâncias radiculares) de um composto deve ser rápido, reprodutível, requerer pouca quantidade de analitos e reagentes e não deve ser influenciado por propriedades físicas dos compostos (MARCO, 1968, p. 594).

A atividade antioxidante deve ser avaliada por diversas metodologias. Os métodos mais freqüentes para mensurar os níveis do dano oxidativo em humanos utilizam leituras do dano oxidativo total ao DNA; quantidades de enzimas antioxidantes, substâncias antioxidantes; nível de dano em lipídios; e dano protéico.

Dentro dos métodos possíveis de avaliação antioxidante, tem-se aqueles que utilizam cátions metálicos como catalisadores da reação de oxidação ou

moléculas que tenham esse íon em forma de complexo, como a hemoglobina. Entretanto, a presença desses íons, dependendo da natureza do antioxidante, pode determinar que o suposto antioxidante atue como um pró-oxidante. Íons como o  $\text{Fe}^{3+}$  apresentam grande possibilidade redução a  $\text{Fe}^{2+}$  que, por sua vez podem induz à molécula de antioxidante um comportamento pró-oxidante. A atividade pró-oxidante é resultado do potencial redutor contra metais, originando formas que reagem com  $\text{O}_2$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , originando os iniciadores da cadeia de oxidação. O próprio íon ferroso pode desencadear uma reação de decomposição da  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando o radical  $\cdot\text{OH}$ , demonstrada por Fenton em 1894 (PRYOR, 1970<sup>9</sup> apud BIANCO, 2003, p. 31):



Um exemplo do fenômeno de ação pró-oxidante é a clorofila que, em extratos brutos de *Camellia sinensis* L., é a responsável por um fenômeno de pró-oxidação frente a óleos. Os metais de transição induzem ação pró-oxidante nas moléculas de ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol; contudo, isso não deve ser importante *in vivo*, pois os metais geralmente estão quelados (MOURE et al., 2001, p. 152, 154).

Muitos métodos baseiam-se na “captura” de radicais livres diferentes; entretanto, a absorção de raios ultravioleta e a capacidade de quelação colabora na atividade antioxidante. Vários testes utilizam substâncias diferentes, como o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidróxido ( $\cdot\text{OH}$ ), óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), radicais alquilperóxidos,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  (cátion radicalar do 2,2-azinobis-3-etilbenzotiozolina-6-sulfonada) e o DPPH (radical  $\alpha,\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picril hidrazina) (MOURE et al., 2001, p. 150).

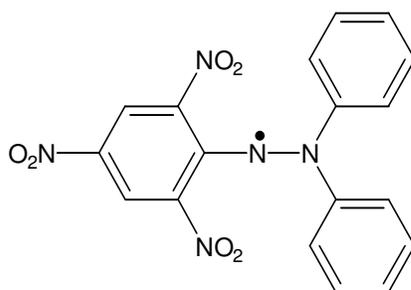
O radical  $\alpha,\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picril hidrazina ou 1,1-difeníl-2-picril hidrazina (Figura 12) é um radical livre “estável”, que detém um máximo de absorção na região do visível em 517 nm. Facilmente é reduzido em presença de substâncias antioxidantes. Estudos de relação estrutura-atividade apresentam que ácidos fenólicos dispõem de melhor atividade antioxidante que os análogos do ácido benzóico pela presença de duplas conjugadas, o que facilita a deslocalização dos radicais livres resultantes do antioxidante (LU; FOO, 2001, p. 198). Ensaio com

---

<sup>9</sup> PRYOR, W. A. **Introdução ao estudo dos radicais livres**. São Paulo: Edgar Blücher, 1970

DPPH são considerados eficientes na pesquisa de atividade antioxidante relacionada à captura de radicais livres, sendo mencionado como um agente de baixo custo, de fácil manuseio, fornecendo um teste rápido e reprodutível (IOSET et al., 2001, p. 38).

FIGURA 12 – ESTRUTURA DO RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRIL HIDRAZINA



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Os frutos maduros de *C. brasiliense* Camb., Caryocaraceae foram coletados na região de Montes Claros, no estado de Minas Gerais, nos meses de janeiro a fevereiro de 2002 e de 2003. O material botânico foi identificado pelo professor Dr. Olavo A. Guimarães do Departamento de Botânica e foi depositada uma exsicata sob o número 46279 no herbário do Departamento de Botânica da UFPR.

### 4.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

#### 4.2.1 Obtenção dos extratos

##### 4.2.1.1 Extratos para a avaliação fitoquímica e partição líquido-líquido

O fruto foi separado em exocarpo (casca), mesocarpo interno mais endocarpo (polpa oleosa com drupa) e semente (amêndoa). Foram preparados os extratos aquoso e hidroalcoólico a 20 % com o exocarpo, mesocarpo interno mais endocarpo pelo método da maceração (MATOS, 1988) para a avaliação preliminar.

Preparou-se um extrato *n*-hexânico a frio por maceração com o lote contendo o exocarpo fresco (casca) até esgotamento total. O resíduo sólido da extração *n*-hexânica foi seco em estufa e sofreu extração até esgotamento total com metanol a 80 % em água, com auxílio de extrator tipo Soxhlet. Esse extrato metanólico foi concentrado em rota-evaporador sob pressão reduzida a 45 °C até a redução de 75 % do volume inicial. Esse líquido foi submetido a partição líquido-líquido com diclorometano em funil de separação, sendo o resíduo metanólico particionado com acetato de etila. O resíduo final foi ressuspenso em metanol (Figura 13).

As amêndoas (sementes) foram moídas e maceradas com metanol 80 % a frio por 15 dias. O extrato foi concentrado com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida a 45 °C, até a redução de 75 % do volume inicial. O líquido foi

submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, com *n*-hexano; em seguida, foi submetido à partição com diclorometano; esse procedimento foi repetido com acetato de etila e o resíduo polar foi ressuspensão em metanol (Figura 14).

FIGURA 13 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA CASCA

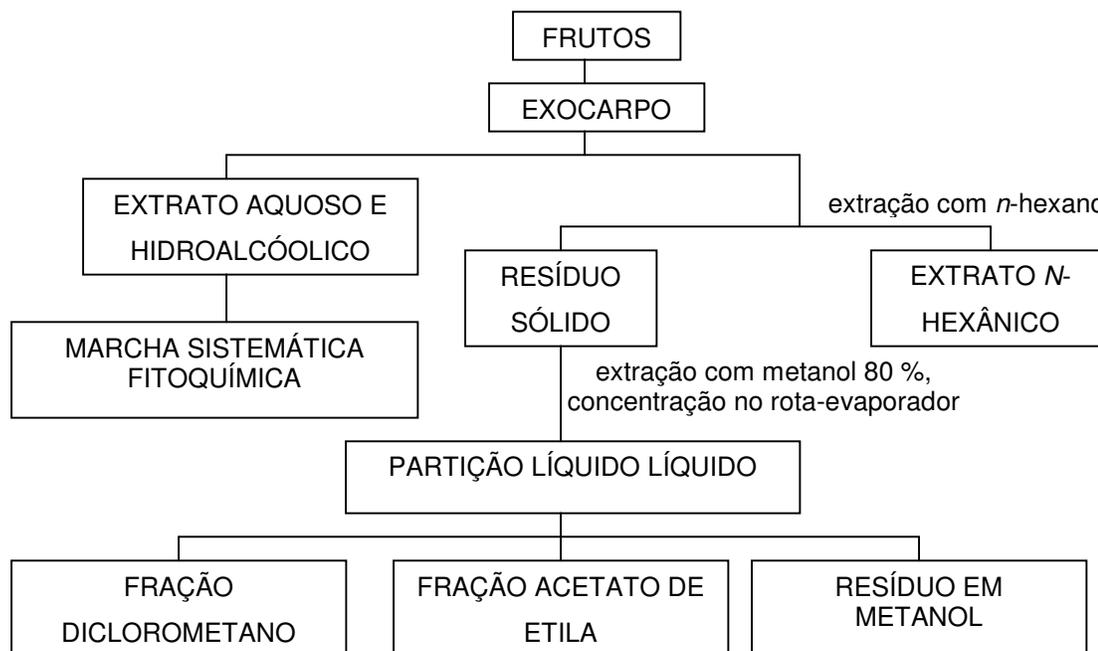
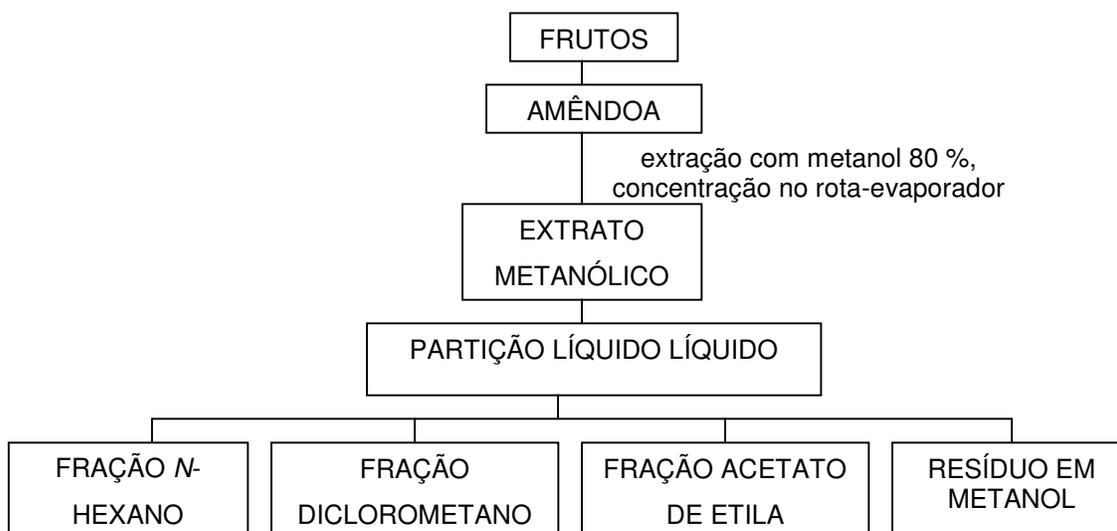


FIGURA 14 – OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA AMÊNDOA



#### 4.2.1.2 Extrato para a obtenção dos carotenos

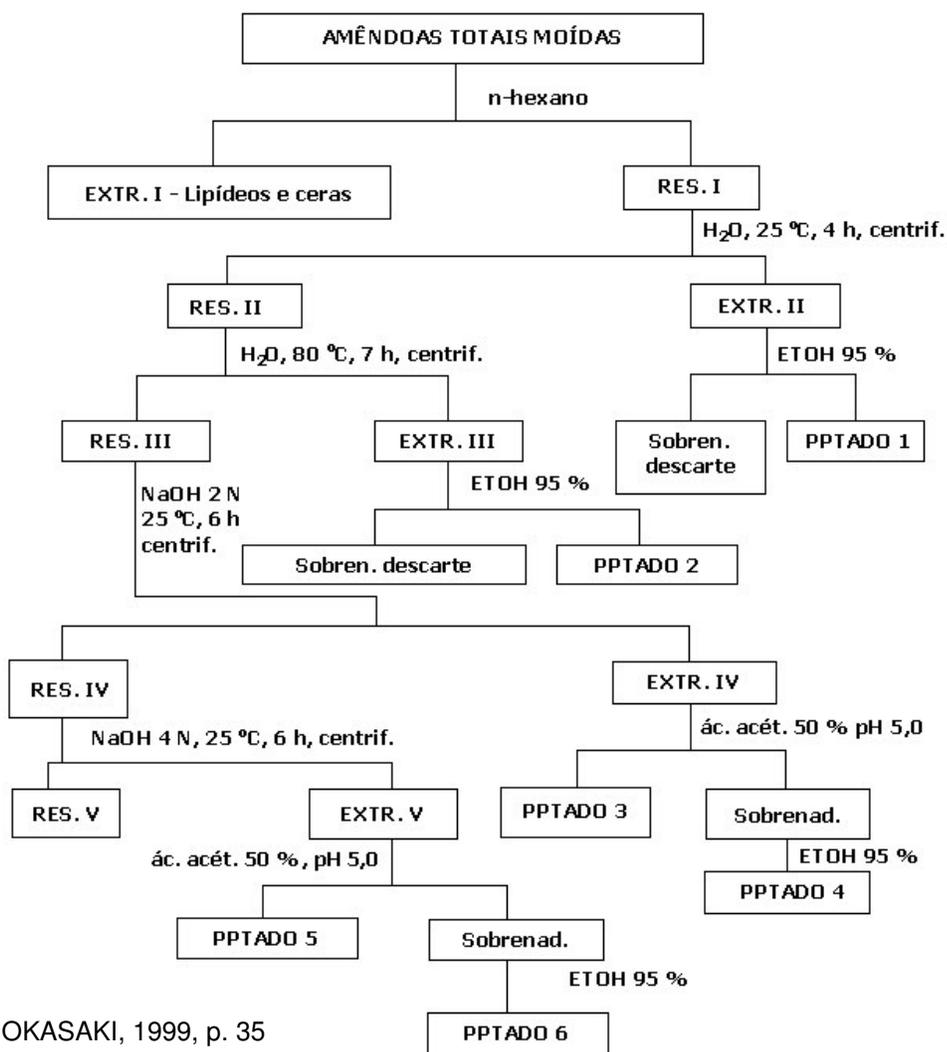
Outro lote de mesocarpo interno mais endocarpo (726,7 g) foi extraído com acetona gelada (aproximadamente 3 L) em liquidificador até esgotamento total (ausência de cor alaranjada) para a extração de carotenóides (MERCADANTE, RODRIGUEZ-AMAYA, 1991, p.1094)

#### 4.2.1.3 Extratos para a obtenção dos carboidratos

Os extratos para obtenção dos carboidratos foram realizados conforme a Figura 11. Um lote distinto de amêndoa, homogeneizada com gral e pistilo, foi desnaturada enzimaticamente com metanol: água (4:1) a quente sob refluxo por 20 min. A mistura foi resfriada e filtrada por meio de funil de Büchner. O resíduo foi deslipidificado com *n*-hexano em extrator tipo Soxhlet (OKASAKI, 1999) até que o *n*-hexano em contato com o resíduo 1 (RES I) não apresentasse fosfolipídios. Os fosfolipídios foram verificados com auxílio de placa cromatográfica de sílica gel G e revelador específico molibdato de amônio/ácido sulfúrico que, em contato com fosfolipídios, produz cor azul em fundo branco (VASKOVSKY; KOSTETSKY, 1968, p. 396). O resíduo 1 foi seco em estufa a 60 °C, foi macerado com água a 25 °C por quatro horas e centrifugado a 8000 rpm por 30 min, originando o resíduo 2 (RES II) e extrato 2 (EXTR II). Uma alíquota do extrato 2 foi submetida ao teste da presença de açúcares pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O extrato 2 foi tratado com etanol a 95 % e a mistura, conservada por 12 horas em geladeira, foi centrifugada a 8000 rpm por 30 min, originando o Precipitado 1 (PPTADO 1). O resíduo 2 foi macerado com água a 80 °C por sete horas e centrifugado a 8000 rpm por 30 min, o qual originou o resíduo 3 (RES III) e extrato 3 (EXTR III). O extrato 3 foi tratado com etanol a 95 % e a mistura, conservada por 12 horas em geladeira, foi centrifugada, o qual originou o Precipitado 2 (PPTADO 2). O resíduo 3 foi macerado com NaOH 2 N (WHISTLER; FEATHER, 1965, p. 144) a 25 °C por seis horas, foi centrifugado e orig o resíduo 4 (RES 4) e extrato 4 (EXTR IV). O extrato 4 foi neutralizado com ácido acético 50 % até pH 5,0 fornecendo, por centrifugação a 8000 rpm por 30 min, o Precipitado 3 (PPTADO 3) e um sobrenadante. Este sobrenadante foi tratado com etanol a 95 % e a mistura, conservada por 12 horas

em geladeira, foi centrifugada a 8000 rpm por 30 min, originando o Precipitado 4 (PPTADO 4), sendo o sobrenadante descartado. O resíduo 4 foi macerado com NaOH 4 N a 25 °C por seis horas, sendo posteriormente centrifugado, dando origem ao resíduo 5 (RES V) e extrato 5 (EXTR 5). O extrato 5 foi neutralizado com ácido acético 50 % até pH 5,0 fornecendo, por centrifugação a 8000 rpm por 30 min, o precipitado 5 (PPT 5) e um sobrenadante. Este sobrenadante foi tratado com etanol a 95 % e a mistura, conservada por 12 horas em geladeira, foi centrifugada a 8000 rpm por 30 min, originando o Precipitado 6 (PPTADO 6), sendo o sobrenadante descartado (OKASAKI, 1999, p. 35) (Figura 15).

FIGURA 15 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E PRECIPITADOS VISANDO A SEPARAÇÃO DOS CARBOIDRATOS



FONTE: OKASAKI, 1999, p. 35

#### 4.2.2 Avaliação preliminar

Foram determinadas características organolépticas (pH, cor, odor), perda por dessecação dos extratos aquosos (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985, p. 21-25) e foi realizada a hidrodestilação da casca em aparelho de Clevenger. Foi realizada a marcha sistemática fitoquímica preliminar nos extratos aquoso e hidroalcoólico a 20 %. No extrato hidroalcoólico foram pesquisados heterosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, heterosídeos antraquinônicos, cumarinas e aminogrupos; no extrato aquoso pesquisou-se aminogrupos, heterosídeos antociânicos, saponínicos, cianogénéticos, taninos (condensados e hidrolisáveis), ácidos fixos (MATOS, 1988), presença de açúcares (DUBOIS et al., 1956) e pectinas (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985, p. 59).

As reações realizadas para a caracterização dos metabólitos secundários foram as seguintes: testes da cianidina ou Shinoda, oxálico-bórica e reação com  $H_2SO_4$  para a detecção de heterosídeos flavônicos; reação de Bonträeger para a pesquisa de heterosídeos antraquinônicos; reação de Liebermann-Burchard para a detecção de esteróides e triterpenóides; método do ultravioleta (360 nm) para a caracterização de cumarinas, pois a maioria apresenta fluorescência azul brilhante ou verde; reações gerais para a pesquisa de alcalóides utilizando os reativos de Dragendorff, Mayer, Bouchardat e Bertrand; reação de Ninhidrina para caracterização de aminogrupos; reação de coloração em meio ácido, básico e neutro para a detecção de heterosídeos antociânicos, pelo comportamento dessas como indicadores ácido-base; reação com o papel picro-sódico para a pesquisa de heterosídeos cianogénéticos; reação com o reativo de Nessler para detectar os ácidos fixos; reação de Stanishy para a caracterização de taninos condensados e hidrolisáveis; teste de formação de espuma para detectar a presença de heterosídeos saponínicos; método do fenol-ácido sulfúrico para a verificação dos açúcares e aparecimento de fluorescência com solução de permanganato de potássio para a presença de pectinas. Foi realizado um teste de hemólise em placas de ágar sangue, aplicando os extratos em um disco de papel, bem como o solvente (como um teste branco). Nesse experimento foi analisada a fração diclorometano da casca, precipitado da fração diclorometano, resíduo polar da casca em metanol, fração diclorometano da amêndoa e resíduo polar da amêndoa em metanol.

## 4.3 SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS POR MEIO DE MÉTODOS FÍSICOS E QUÍMICOS

### 4.3.1 Separação dos carboidratos

Os Precipitados 3, 4, 5 e 6, advindos da extração com NaOH em gradiente foram dialisados contra água corrente por 20 horas. Os Precipitados 1 e 2 advindos da separação citada na Figura 15 (p. 36) sofreram purificação por meio de congelamento e degelo (GORIN; IACOMINI, 1984, p. 130), bem como os Precipitados 3, 4, 5 e 6 que foram previamente dialisados. O PPT 1 foi solubilizado em água destilada e submetido ao congelamento, sendo posteriormente descongelado em temperatura ambiente. O precipitado insolúvel após o degelo foi separado por centrifugação (8.000 rpm, 20 min.). Esse processo foi repetido, sendo os precipitados da mesma fração reunidos, bem como os sobrenadantes, até que o sobrenadante aquoso final não apresentasse mais a formação de precipitados por congelamento e degelo. Para confirmação do final da purificação, uma tentativa de solubilização do resíduo insolúvel final em água destilada a 25 °C foi realizada. O líquido foi submetido ao teste do fenol-ácido sulfúrico, não sendo detectada a presença de polissacarídeos (DUBOIS et al., 1956). O sobrenadante e o precipitado resultante dessa purificação foram liofilizados e, em seguida, pesados e identificados com a sigla SOBR G-D 1 (sobrenadante do gelo-degelo – Precipitado 1) e PPT G-D 1 (precipitado do gelo-degelo – Precipitado 1). Esse processo de purificação por meio de gelo-degelo foi repetido para todos os precipitados (2, 3, 4, 5 e 6), resultando nas frações SOBR G-D 2, PPT G-D 2, SOBR G-D 3, PPT G-D 3, SOBR G-D 4, PPT G-D 4, SOBR G-D 5, PPT G-D 5, SOBR G-D 6 e PPT G-D 6.

### 4.3.2 Separação dos carotenos

Todas as manipulações foram feitas em vidros âmbar, com ausência de luz solar direta e os recipientes, colunas de cromatografia, balões de rota-evaporador e cubas para CCD, envoltos em papel alumínio para minimizar a degradação pela luz.

O extrato cetônico (item 4.2.1.2, p. 35), visando a separação dos carotenóides, foi concentrado e particionado com éter de petróleo, sendo lavado

posteriormente com água por três vezes. A fração etérea foi saponificada com solução metanólica de hidróxido de potássio a 20 % por 16 horas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Retirou-se o sabão com auxílio de filtração com funil de Büchner e ao líquido restante foi adicionada uma solução aquosa de NaCl a 25% (adaptado de DAVIES, 1976, p. 66). Essa mistura sofreu partição com éter etílico e foi lavada com solução de cloreto de sódio 25 % por três vezes, e ao final foi acrescentado  $\text{CaCl}_2$  para a precipitação de sabão residual (adaptado de BROOKS, 2003). Foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para que a fração etérea ficasse ausente de água, seguido de filtração (adaptado de OFFICIAL Methods Of Analysis Of AOAC International, 2000, p. 5; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1976, p. 616; GODOY; RODRIGUEZ-AMAYA, 1995, p. 110-111). A fração éter etílico foi levada a secar com auxílio de rota-evaporador a 30 °C e ressuspendida em éter de petróleo. Para a separação de possíveis contaminantes esteroidais, essa fração etérea permaneceu a -10 °C por uma noite e o precipitado (esteróides) foi separado por centrifugação a 5000 rpm por 10 min (DAVIES, 1976, p. 67). O sobrenadante foi submetido a uma espectrometria de varredura em UV-vis (600-250 nm), aparelho Shimadzu 1601, para a obtenção da região de comprimento de onda de maior absorbância, direcionando possíveis carotenos presentes. Em paralelo, essa fração foi submetida a triagem multidesenvolvimento com auxílio de cromatografia em camada delgada (CCD), com fase estacionária sílica gel G em presença de três fases móveis sucessivas: 1<sup>a</sup> - éter de petróleo:acetona (96:4); 2<sup>a</sup> - éter de petróleo:acetona (85:15); e 3<sup>a</sup> - éter de petróleo:acetona (70:30) para uma estimativa de quantos carotenóides estão presentes na amostra e exposta a vapores de HCl para acusar a presença de epoxilados (MERCADANTE; RODRIGUEZ-AMAYA, 1991, p. 203-204).

A separação dos carotenos foi realizada por dois métodos – por intermédio de clae e por meio de cromatografia em coluna aberta com auxílio de vácuo, com fase estacionária MgO: terra diatomácea 1:2 e fase móvel contendo éter etílico nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 % em éter de petróleo, seguida de acetona nas concentrações de 4, 8, 10, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 50, 75 % em éter de petróleo, acetona pura, 10 e 20 % de água em acetona (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 1989, p. 151). As eluições obtidas foram reunidas em oito frações, de acordo com o comportamento cromatográfico apresentado em CCD (fase estacionária sílica gel, eluída em gradiente com 4, 15 e

30 % de acetona em éter de petróleo), chamadas de A, B, C, D, E, F, G e H. Essas frações foram secas com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida a 35 °C e ausência de luz, e seus pesos anotados.

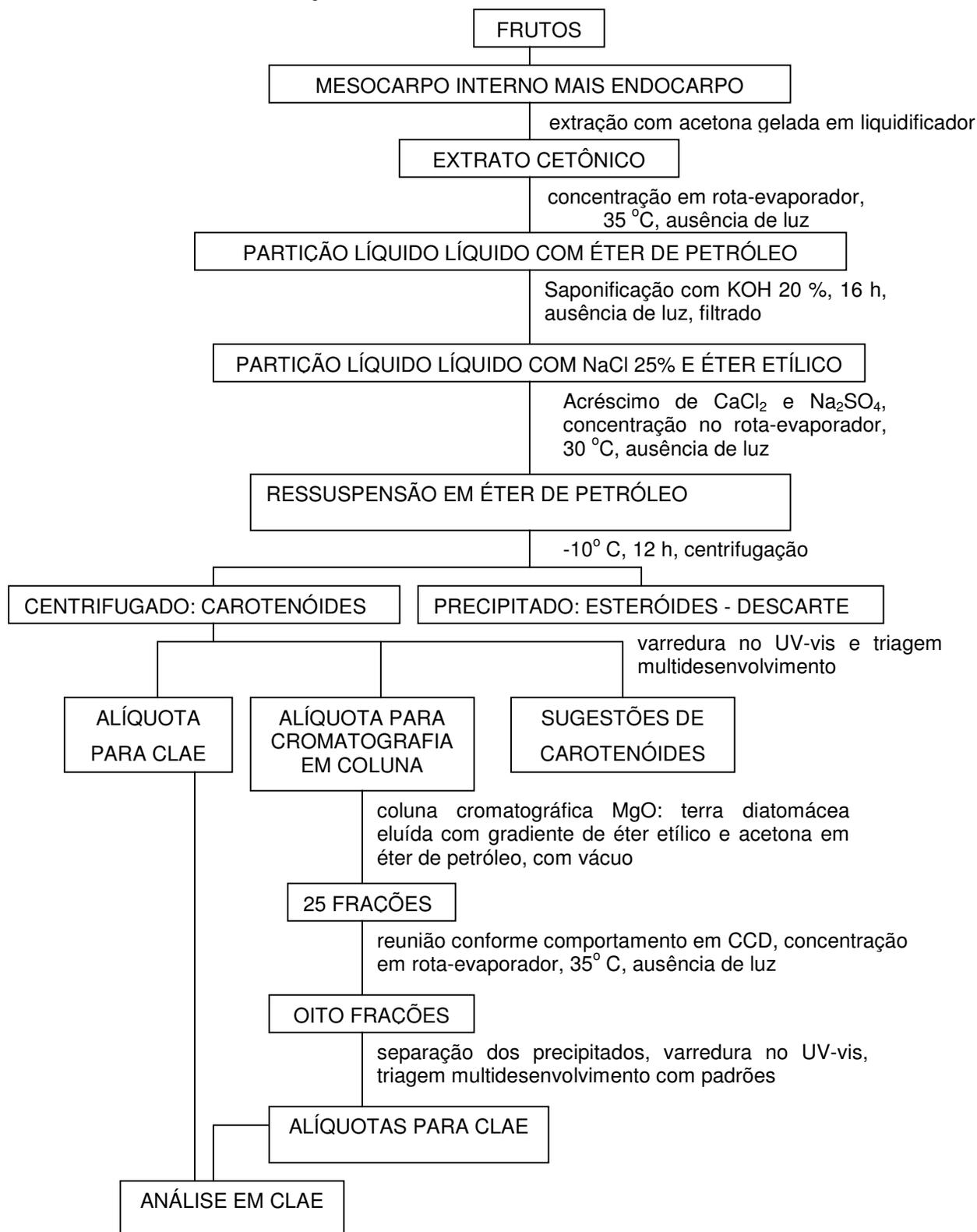
Em seguida, as frações A, B, C, D e E secas foram ressuspensas em éter de petróleo e identificadas pelas siglas frAsobr (fração A – sobrenadante), frB (fração B – total), frCsobr (fração C – sobrenadante), frD (fração D – total), frEsobr (fração E – sobrenadante). As frações A, C e E apresentaram precipitados que não foram solúveis em éter de petróleo, sendo secos e pesados; após, foram solubilizados em acetona e identificados como frAppt (fração A – precipitado), frCppt1 (fração C – precipitado 1) e frEppt (fração E – precipitado). A fração C, após uma noite no congelador, apresentou novo precipitado, sendo separado por centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos. Esse novo precipitado foi seco, pesado e ressuspensado em acetona e chamado de frCppt2. A fração F seca foi ressuspensa em éter de petróleo, não tendo nenhuma solubilização. Este solvente foi retirado com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida a 35 °C e o precipitado não solúvel foi seco, pesado e ressuspensado em diclorometano. As frações G, H e I secas foram ressuspensas em acetona. Após essa separação, todas as frações e seus respectivos precipitados foram sujeitos a uma espectrometria de varredura em UV-vis, aparelho Shimadzu 1601, para a obtenção da região de comprimento de onda de maior absorbância, visando direcionar quais são os possíveis carotenos presentes, bem como foram submetidos a mesma triagem multidesenvolvimento em CCD anteriormente citada (MERCADANTE; RODRIGUEZ-AMAYA, 1991, p. 203-204), sendo aplicadas também soluções-padrão de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno e luteína para as comparações de Rfs (Figura 16).

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

##### 4.4.1 Obtenção dos padrões de $\beta$ -criptoxantina, licopeno, $\beta$ -caroteno e luteína

Foram isolados os carotenóides licopeno e  $\beta$ -criptoxantina do fruto de *Carica papaya* L., Caricaceae, visto que, juntamente com o  $\beta$ -caroteno, são os três carotenóides majoritários no mamão.

FIGURA 16 – OBTENÇÃO DOS CAROTENÓIDES



Foram homogeneizados 700 g do fruto sem semente com auxílio de liquidificador de metal em presença de acetona gelada até esgotamento parcial. Esse extrato cetônico foi concentrado com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida em ausência de luz direta e ao fim ressuscendido em éter etílico. A essa fração etérea foi adicionada uma solução metanólica de hidróxido de potássio a 20 % para a saponificação de ácidos graxos presentes, sendo a mistura deixada ao abrigo da luz em repouso por 16 horas. Após isso, a mistura foi particionada com uma solução aquosa de cloreto de sódio a 25% em funil de separação por três vezes (adaptado de DAVIES, 1976, p. 66) e ao final foi acrescentado cloreto de cálcio a 1 % em solução aquosa para a precipitação de algum sabão residual. A fração etérea carotenóidica foi concentrada e cromatografada em coluna aberta (25 x 2 cm) com 10 g de fase estacionária sílica gel. A primeira eluição fez-se em gradiente de éter etílico com éter de petróleo para a retirada do  $\beta$ -caroteno; em seguida, o licopeno foi eluído com auxílio de 10 % de acetona em éter de petróleo e a próxima banda, eluída com 15 % de acetona em éter de petróleo, constatou-se como sendo a  $\beta$ -criptoxantina (adaptado de BREITHAUPT, BAMEDI, 2001, p. 2065). Ambos foram secos com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida a 35 °C e ressuscendidos em éter de petróleo. A identificação do licopeno foi feita por meio de cromatografia em CCD com um insumo cosmético contendo licopeno, doseado a 5,9 %, como único carotenóide; a identidade da  $\beta$ -criptoxantina foi confirmada por meio de comparação de Rfs em CCD citado na literatura: o primeiro na fase estacionária sílica gel, eluída com 5 % de acetona em éter de petróleo; o segundo, eluído na mesma fase estacionária com acetona:benzeno:éter de petróleo 20:10:70 (PHILIP, 1973, p. 965) e o terceiro, eluído em 5 % de metanol em tolueno (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 52), além de reação de acetilação e metilação. Realizou-se uma análise de varredura por espectrometria no UV-vis entre 200 a 600 nm para a confirmação da  $\beta$ -criptoxantina em éter de petróleo, comparando-se os dados de comprimento de onda de absorbância máxima e valores de % III/II (DAVIES, 1976, p. 112; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 15), e o tempo de retenção em clae.

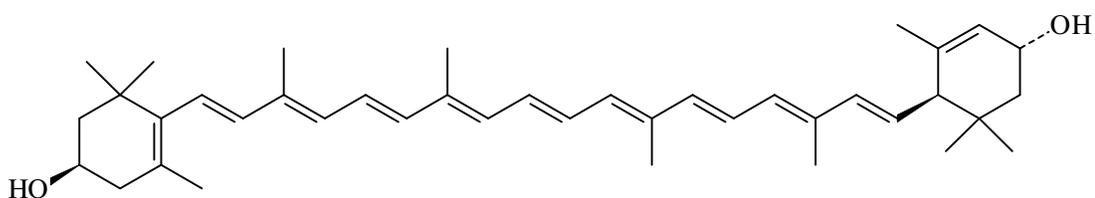
A reação de acetilação foi executada com 0,1 mg da substância com 2 mL de piridina e 0,2 mL de anidrido acético. Após 21 horas em ausência de luz, a amostra foi particionada com éter de petróleo em presença de água. A fração etérea

foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e cromatografada em CCD (fase estacionária sílica gel, eluente 5 % de metanol em tolueno) juntamente com a amostra original. A reação de metilação foi desenvolvida em presença de 0,1 mg da substância em 5 mL de metanol acidificado com algumas gotas de HCl 0,2 N. Após três horas em ausência de luz, a amostra foi particionada com éter de petróleo em presença de água. A fração etérea foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e cromatografada em CCD (fase estacionária sílica gel, eluente 5 % de metanol em tolueno) juntamente com a amostra original.

Foi verificada a pureza por meio de clae em cromatógrafo Varian, modelo Pró-Star 210/215, com coluna Hypersil ODS (Agilent) monomérica  $\text{C}_{18}$ , 200 x 4,6 mm (id), fluxo de 1,5 mL/min, alça de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e detector UV-vis a 450 nm monitorado por software Star Chromatography Workstation System Control version 6.00 (Varian). Para o licopeno foi usada a fase móvel metanol: água (98:2), e para a  $\beta$ -criptoxantina, a fase móvel metanol: água (98:2 e 95:5), com o etanol como líquido de injeção.

A luteína foi obtida de um insumo cosmético a 5,9 % de luteína, sendo esse carotenóide o principal da mistura (Figura 17). A amostra foi solubilizada em etanol e realizou-se uma análise de varredura por espectrometria no UV-vis entre 200 a 600 nm para a confirmação da luteína, tendo para comparação os dados de comprimento de onda de absorbância máxima e valores de % III/II (DAVIES, 1976, p. 112; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 15). Outro lote do insumo foi solubilizado em etanol, filtrado através de filtros com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e foi verificada a presença da luteína por cromatografia líquida de alta eficiência (clae) em cromatógrafo Varian, modelo Pró-Star 210/215, com coluna Hypersil ODS (Agilent) monomérica  $\text{C}_{18}$ , 200 mm comprimento x 4,6 mm diâmetro interno (id), fase móvel metanol: água (95:5), fluxo de 1,5 mL/min, com alça de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e detector UV-vis a 450 nm.

FIGURA 17 – ESTRUTURA DA LUTEÍNA



O padrão de  $\beta$ -caroteno Sigma foi gentilmente cedido pelo Laboratório Catarinense S.A. Para a confirmação de que a substância não estava oxidada, uma alíquota da mistura foi seca com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida a 35 °C e ausência de luz e, em seguida, foi ressuspensa em etanol. Realizou-se uma análise de varredura por espectrometria no UV-vis entre 200 a 600 nm para a confirmação do *trans*- $\beta$ -caroteno, tendo para comparação o espectro cedido pela empresa acima citada. Além disso, a solução de  $\beta$ -caroteno foi cromatografada por meio de clae no momento da elaboração da solução e depois de quatro dias, para a verificação da geração de produtos de oxidação. Esse experimento foi realizado em cromatógrafo Varian, modelo Pró-Star 210/215, com coluna Hypersil ODS (Agilent) monomérica C<sub>18</sub>, 200 x 4,6 mm (id), fase móvel metanol: água (98:2), fluxo de 1,5 mL/min, com alça de injeção de 20  $\mu$ L e detector UV-vis a 450 nm.

#### 4.4.2 Identificação e quantificação dos carotenóides presentes no fruto de *C. brasiliense*

A identificação dos carotenóides foi realizada por meio de coeluição dos padrões de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e luteína com a fração total e as frações parciais; a quantificação foi realizada por meio de padrão externo, sendo os experimentos realizados em clae. Foi utilizado cromatógrafo Varian, modelo Pró-Star 210/215, com coluna Hypersil ODS (Agilent) monomérica C<sub>18</sub>, 200 x 4,6 mm (id), fluxo de 1,5 mL/min, com alça de injeção de 20  $\mu$ L e detector UV-vis a 450 nm.

As frações foram direcionadas para a coeluição em função do comportamento cromatográfico (R<sub>f</sub>) comparativo aos padrões em CCD (fase estacionária sílica gel 0,2  $\mu$ m MERCK<sup>®</sup>, eluída em gradiente com acetona a 4, 15 e 30 % em éter de petróleo). As que tiveram substâncias com R<sub>f</sub>s próximos aos dos padrões de  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina foram eluídas em clae com auxílio de fase móvel metanol: água (98:2) e as que tiveram substâncias com R<sub>f</sub> próximo ao padrão de luteína foram eluídas com metanol: água (95:5). As frações foram solubilizadas com etanol, filtradas em filtros com 0,22  $\mu$ m de poro e injetadas no cromatógrafo.

Comparando-se os tempos de retenção obtidos pelos padrões e pelas

substâncias das frações, foi possível escolher quais seriam os padrões adequados para a coeluição. O aumento relativo do tamanho do pico no tempo de retenção correspondente confirma a identidade da substância.

Para a quantificação dos carotenóides identificados utilizou-se padrão externo de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e luteína e curvas de calibração dos mesmos em clae. As soluções clorofórmica de  $\beta$ -caroteno e etérea de  $\beta$ -criptoxantina foram levadas à secura, com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida a 35 °C e ausência de luz direta e os resíduos ressuspensos em etanol. As diluições da solução de  $\beta$ -caroteno foram nas concentrações de 0,328  $\mu\text{g/mL}$ , 0,698  $\mu\text{g/mL}$ , 1,45  $\mu\text{g/mL}$ , 2,28  $\mu\text{g/mL}$  e 3,32  $\mu\text{g/mL}$ . A solução de  $\beta$ -criptoxantina foi diluída nas concentrações de 0,391  $\mu\text{g/mL}$ , 0,7  $\mu\text{g/mL}$ , 0,947  $\mu\text{g/mL}$ , 1,12  $\mu\text{g/mL}$ , 1,44  $\mu\text{g/mL}$  e 14,537  $\mu\text{g/mL}$ . A solução etanólica de luteína foi diluída nas concentrações de 1,04  $\mu\text{g/mL}$ , 2,52  $\mu\text{g/mL}$ , 4,38  $\mu\text{g/mL}$ , 9,92  $\mu\text{g/mL}$ , 14,6  $\mu\text{g/mL}$  e 34,2  $\mu\text{g/mL}$ .

As diluições foram realizadas com auxílio de vidraria volumétrica e a concentração confirmada por absorvância em aparelho de espectrometria no UV-vis de acordo com os valores tabelados dos coeficientes de extinção molar ou absortividade molar (DAVIES, 1976, p. 149-152), dependendo do solvente em questão e comprimento de onda utilizado, conforme a Tabela 3:

TABELA 3 – COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR DO  $\beta$ -CAROTENO,  $\beta$ -CRIPTOXANTINA E LUTEÍNA EM ALGUNS SOLVENTES

Carotenóide	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	$\lambda$ (nm)	Solvente
$\beta$ -caroteno	2620	453	Etanol
$\beta$ -criptoxantina	2386	452	Éter de petróleo
Luteína	2550	445	Etanol

Conhecendo o coeficiente extinção ou absortividade molar, é possível conhecer a concentração exata da solução carotenóidica que se deseja.

Exemplo: Uma solução etanólica de  $\beta$ -caroteno apresentou uma leitura de 0,317 de absorvância em espectrômetro de UV-vis a 453 nm. Portanto:

$E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2620 \Rightarrow$  uma solução a 1 % de  $\beta$ -caroteno em etanol, lida em 453 nm com caminho ótico de 1 cm, apresenta uma absorvância de 2620.

$$\therefore 1 \text{ g \% de } \beta\text{-caroteno} \text{ ----- abs: } 0,317$$

$$x \text{ ----- } 0,317$$

$$x = 1,21 \cdot 10^{-3} \text{ g/100 mL ou } 1,21 \text{ } \mu\text{g/mL de } \beta\text{-caroteno em etanol}$$

#### 4.4.3 Composição monossacarídica

A composição monossacarídica foi realizada com os Precipitados e Sobrenadantes dos Precipitados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (Figura 9, p. 35). Cinco miligramas de cada fração sofreu hidrólise com TFA (ácido trifluoroacético) por oito horas a 100 °C (MANKARIOS et al., 1971, p. 421). Após a evaporação do TFA, as aldoses foram reduzidas a alditóis com NaBH<sub>4</sub> (borohidreto de sódio) em meio aquoso, por 16 horas a 25 °C. Para a purificação dos alditóis correspondentes, foram adicionados à solução 2 g de resina trocadora de íons grau I fortemente ácida, com o intuito de troca dos íons Na<sup>+</sup> por H<sup>+</sup>. O líquido remanescente foi filtrado em algodão e levado à secura com auxílio de pressão reduzida em rota-evaporador a 60 °C. O resíduo sólido foi redissolvido em metanol e evaporado até a secura com auxílio de pressão reduzida em rota-evaporador para a eliminação do borato na forma volátil de borato de trimetila, sendo esse repetido quatro vezes (WOLFROM; THOMPSON, 1963a, p. 67). Os alditóis foram acetilados com piridina e anidrido acético na proporção de 1:1 por 12 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963b, p. 211). Os acetatos de alditóis foram submetidos a cromatografia gasosa em aparelho Varian modelo Saturn 2000R, com coluna capilar OV225 Phenomenex, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, fluxo de 1,5 mL/min, com hélio como gás de arraste, acoplado a detector de espectrometria de massa, tendo como condição de temperatura do injetor de 250 °C.

Para a avaliação dos precipitados, o aparelho foi programado em rampa de 50 °C por 0,1 min, seguido de 225 °C com velocidade de 40 °C/min durante 23 min. Para a avaliação dos sobrenadantes, o aparelho foi programado em rampa de 50 °C por 0,1 min, seguido de 225 °C com velocidade de 40 °C/min durante 11 min, seguido de 240 °C com velocidade de 40 °C/min durante 8 min.

#### 4.4.4 Avaliação do potencial antioxidante por espectrometria

O extrato cetônico do mesocarpo interno mais endocarpo do fruto foi avaliado pelo método de avaliação antioxidante utilizando o radical livre difenil-picril-hidrazina (DPPH). A avaliação consta na redução do radical livre DPPH perante substâncias com caráter antioxidante, visto que o DPPH em solução etanólica apresenta coloração violeta e, quando reduzido, muda para amarelo. O extrato cetônico foi seco com auxílio de rota-evaporador sob pressão reduzida a 35 °C e ausência de luz e, em seguida foram realizadas diluições para as concentrações finais de 0,35 mg de extrato cetônico/mL, 0,7 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL, e 2,0 mg/mL em etanol. O controle positivo da atividade antioxidante foi a reação com acetato de tocoferol (vitamina E – grau cosmético com 96 a 102 %), um agente antioxidante muito utilizado em produtos cosméticos e farmacêuticos, nas concentrações de 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL.

A cada 2,5 mL de cada diluição da amostra acrescentou-se 1 mL de solução de DPPH a 0,3 mM, mantidos em ausência de luz direta. Essa mistura foi lida após 30 minutos de espera a 25 °C em aparelho de UV-vis, Shimadzu 1601 na região de 518 nm. Para cada diluição foi feito um branco, constando de 2,5 mL da diluição com 1 mL de etanol. A partir do valor lido foi calculada a concentração inibitória do percentual reduzido da solução para cada diluição (IC %) (BIANCO, 2003, p. 94):

$$IC \% = 110 - \left[ \frac{Abs (amostra) - Abs (branco)}{Abs (controle)} \right] \times 100$$

De posse dos dados de IC %, foi traçado um gráfico relacionando a concentração do extrato *versus* a IC % e foi verificado em qual intervalo as leituras de absorvância eram lineares. Nesse intervalo linear foi determinada a equação de reta de primeiro grau e, com isso, qual a concentração de extrato capaz de inibir à metade da quantidade de DPPH no teste (IC 50 %).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTOS DOS FRUTOS

Os frutos totais apresentaram uma quantidade de 1111,9 g. Após a separação, as partes denominadas casca (exocarpo), polpa externa (mesocarpo externo), caroço mais drupa (mesocarpo interno mais endocarpo) e amêndoa tiveram os seguintes rendimentos (Tabela 4):

TABELA 4 – RENDIMENTOS DO FRUTO EM CASCA, POLPA EXTERNA, CAROÇO MAIS DRUPA E AMÊNDOA

Parte utilizada	Quantidade em gramas	% em relação ao peso total (1111,9 g)
Casca (exocarpo)	194,5	17,49
Polpa externa (mesocarpo externo)	158,8	14,28
Caroço mais drupa (mesocarpo interno mais endocarpo)	726,7	65,36
Amêndoa (semente)	30,8	2,7
Total	1110,8	99,83

### 5.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR E EXTRAÇÃO DE ÓLEO VOLÁTIL

A avaliação preliminar sugeriu os seguintes grupos de compostos:

- Extrato hidroalcoólico do mesocarpo interno mais endocarpo: cor de caramelo, odor característico, cítricas e adocicadas, insípido, pH levemente ácido (em torno de 6,0), mostrando presença de heterosídeos flavônicos (reações oxalo-bórica e com  $H_2SO_4$ ) e aminogrupos (reação de Ninhidrina).
- Extrato aquoso do mesocarpo interno mais endocarpo; cor castanho claro, odor de castanha, insípido, pH neutro ao tornassol, mostrando presença de heterosídeos saponínicos (teste de formação de espuma), ácidos fixos (reativo de Nessler), aminogrupos (reação de ninhidrina), taninos condensados (reação de Stanishy) e açúcares (método do fenol-ácido sulfúrico). A média da triplicata do peso seco foi de 0,95 % de extrato seco.

- Extrato hidroalcoólico do exocarpo do fruto: cor esverdeada, odor característico, insípido, mostrando presença de esteróides e triterpenos (reação de Liebermann-Burchard), heterosídeos antraquinônicos (reação de Bonträeger), heterosídeos flavônicos (reações de Shinoda, oxalo-bórica e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e aminogrupos (reação de ninhidrina).
- Extrato aquoso do exocarpo do fruto: cor castanho escuro, odor parecido com o de mato, sabor amargo, pH ácido (em trono de 5,0), mostrando presença de heterosídeos saponínicos (teste de formação de espuma), aminogrupos (reação de ninhidrina), taninos condensados e hidrolisáveis (reação de Stanishy) e açúcares (método do fenol-ácido sulfúrico). A média da triplicata do peso seco foi de 13,51 g % de extrato seco.

Foi realizada a extração de óleos voláteis por arraste de vapor d'água em aparelho Clevenger, tanto com a polpa e casca quanto com o extrato *n*-hexânico e em nenhuma das extrações foi obtido óleo essencial. Provavelmente as substâncias voláteis não estão em quantidade suficiente para promover uma diferença de densidade que se enquadre como óleo volátil; não é descartada a possibilidade do fruto deter substâncias voláteis que possam estar solubilizadas em água.

No teste de hemólise em placas de ágar sangue, a fração diclorometano, precipitado da fração diclorometano e o resíduo polar em metanol da casca apresentaram uma acentuada hemólise no ágar sangue (Figura 18), sugerindo a presença de saponinas esteroidais heterosídicas no resíduo polar em metanol e saponinas esteroidais não heterosídicas na fração diclorometano e no precipitado da mesma. Percebeu-se que os solventes não provocaram hemólise. Nas folhas da mesma espécie, foi verificada a presença de triterpenóides por OLIVEIRA; GILBERT; MORS (1968), MAGALHÃES et al. (1988), bem como saponinas na folha e botão floral por MARQUES (2001). Estudos recentes realizados por BEZERRA et al. (2002) demonstraram a presença de terpenos no extrato etanólico da folha, que teve atividade contra *Biomphalaria glabrata*. Os testes de hemólise, realizados com as frações da amêndoa, revelaram compostos hemolíticos no resíduo polar da amêndoa em metanol. A presença de lectinas na amêndoa de *C. brasiliense* foi reportada num estudo realizado por SANTIAGO (1998). Não há relatos da presença de heterosídios saponínicos em amêndoas de *C. brasiliense*.

FIGURA 18 - PLACAS DE ÁGAR SANGUE COM OS HALOS DE HEMÓLISE EM PRESENÇA DE DIVERSOS EXTRATOS\*



Resíduo polar da casca em metanol



Precipitado da partição diclorometano da casca



Resíduo polar da amêndoa em metanol



Partição diclorometano da casca

\* os discos no centro são os solventes (branco)

### 5.3 CARBOIDRATOS

Detectou-se carboidratos no extrato aquoso da amêndoa pelo método de fenol-sulfúrico. Não há citações sobre carboidratos na amêndoa de *C. brasiliense*.

Os 30,8 g de amêndoa fresca, após deslipidificação e desnaturação enzimática, forneceu 8,84 g de amêndoa seca, apresentando rendimento de 28,7 %.

Os rendimentos das frações Precipitado e Sobrenadante do precipitado, advindos da purificação por meio de gelo-degelo são listados na Tabela 5 :

TABELA 5 – RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA A ALCALINA DA AMÊNDOA DE *C. brasiliense* CAMB.

Fração	Pesos (mg)	% (100 g amêndoa seca)	% (100 g amêndoa fresca)
SOBR G-D 1	243,9	2,76	0,79
PPT G-D 1	Insignificante	-	-
SOBR G-D 2	234,3	2,65	0,76
PPT G-D 2	93,0	1,05	0,30
SOBR G-D 3	200,6	2,27	0,65
PPT G-D 3	1528,3	17,29	4,96
SOBR G-D 4	191,1	2,16	0,62
PPT G-D 4	269,2	3,05	0,87
SOBR G-D 5	14,7	0,17	0,05
PPT G-D 5	188,9	2,14	0,61
SOBR G-D 6	527,2	5,96	1,71
PPT G-D 6	104,8	1,19	0,34
RESÍDUO V	5240,3	59,28	17,01
Água + lipídios	-	-	71,3
Total	8836,3	99,97	99,97

A cromatografia gasosa dos precipitados e sobrenadantes da amêndoa, acoplada à espectrometria de massa, revelou a presença de ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose. Provavelmente essas unidades estão na forma de arabinoxilanas, arabinoglucanas e xiloglucanas. A composição monossacarídica, de acordo com os dados fornecidos pela análise em CG/MS, está listada na Tabela 6:

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NA AMÊNDOA

Origem das extrações	Frações	Monossacarídeos (%)								
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Outros**	
Aquosa a frio	SOBR G-D 1*	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Aquosa a 80° C	SOBR G-D 2	-	-	55,66	44,34	tr	tr	tr		
Aquosa a 80° C	PPT G-D 2	-	-	-	-	-	-	-	-	100
NaOH 2N	SOBR G-D 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaOH 2N	PPT G-D 3	-	-	-	-	-	-	-	-	100
NaOH 2N	SOBR G-D 4	2,42	3,52	11,62	18,87	4,57	14,73	29,5	14,77	
NaOH 2N	PPT G-D 4		-	-	-	-	-	-	-	100
NaOH 4N	SOBR G-D 5	5,61	4,76	16,73	13,07	9,92	13,59	30,47	11,85	
NaOH 4N	PPT G-D 5	4,88	-	12,22	10,56	20,93	12,13	20,7	18,58	
NaOH 4N	SOBR G-D 6	9,72	4,82	33,73	13,3	3,41	12,64	18,98	3,4	
NaOH 4N	PPT G-D 6	3,44	5,12	13,33	15,71	10,65	11,95	32,87	6,93	

\*a fração do PPT 1 não teve precipitado pelo gelo-degelo significativo

\*\*provavelmente outros carboidratos

Há possibilidade de, no SOBR G-D 2, existir uma arabinoxilana praticamente pura, necessitando de outros métodos para confirmação. No caso da molécula estar pura, a elucidação da estrutura molecular pode ser feita com auxílio de métodos físicos e químicos, como análises de ressonância nuclear de próton e carbono.

Como existe uma relação inversa de proporções de glucose e arabinose entre o SOBR G-D 6 e o PPT G-D 6, pode ter ocorrido uma contaminação de polissacarídeos entre essas frações. Possivelmente a amêndoa apresenta arabinoglucanas, glucoarabinanas, arabinoxilanas, xiloglucanas e glucomananas. As arabinoxilanas foram encontradas em grãos de cevada (MORRAL, BRIGOS, 1978, p. 1495) e são consideradas, junto com xiloglucanas, arabinogalactanas e glucomananas como possíveis cadeias de hemiceluloses, principalmente de dicotiledônias (CARNEIRO, 2000, p. 8).

A quantidade de manose está superior no PPT G-D 5. A literatura afirma que polissacarídeos de D-manose estão em maior ocorrência em sementes de plantas. Mananas e glucomananas podem apresentar cadeias lineares de unidades de  $\beta(1\rightarrow4)$ D-manose e  $\beta(1\rightarrow4)$ D-glucose como principais constituintes, podendo apresentar pequena proporção de D-galactose; a quantidade de glucose na fração

PPT G-D 5 está elevada, com significativa presença de galactose. Outras hemiceluloses podem conter D-glucose associadas a D-manose em plantas superiores (ASPINALL, 1959, p. 449, 454, 459).

Alguns fragmentos obtidos por meio da espectrometria de massa sugerem a presença de outros carboidratos, não necessariamente monossacarídeos, tais como glicerol, inositol ou monossacarídeos incomuns, como os carboidratos metilados. Para sua confirmação, o ideal seria realizar novos experimentos com respectivos padrões para análise. Polissacarídeos ácidos são comuns em sementes; entretanto, outras metodologias são necessárias para sua elucidação.

Percebeu-se que o método de purificação por meio de gelo-degelo é eficiente e barato. Todavia, para a separação de moléculas de polissacarídeos puras, devem ser utilizadas metodologias como a separação por meio de precipitação com sais de cobre (solução de Fehling) e sais de amônio quaternário (cetiltrimetil amônio, Cetavlon<sup>®</sup>), além de cromatografias em geral.

## 5.4 CAROTENÓIDES

### 5.4.1 Padrões utilizados

#### 5.4.1.1 $\beta$ -criptoxantina

A fração com a  $\beta$ -criptoxantina, eluída com 15 % de acetona em éter de petróleo do mamão, foi submetida a cromatografias em CCD com comparação dos Rfs obtido com o da literatura. Os Rfs obtidos estão expressos na Tabela 7:

TABELA 7 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS EM CCD DA FRAÇÃO  $\beta$ -CRIPTOXANTINA OBTIDOS COM DIVERSOS SISTEMAS ELUENTES

Sistema eluente	Rf literatura	Rf obtido
Acetona: éter de petróleo (5: 95)	0,09*	0,09
Acetona: benzeno: éter de petróleo (20:10:70)	0,51*	0,55
Metanol: tolueno (5: 95)	0,44**	0,47

\*PHILIP, 1973, p. 965

\*\*RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 52

A reação de acetilação originou um único produto, que apresentou Rf maior que o da amostra original. O fato de apresentar um único produto de acetilação confirma a presença de uma hidroxila. Produtos hidroxilados quando expostos nas condições do experimento, fornecem um número de produtos de acordo com o número de hidroxilas, que é dado pela fórmula:

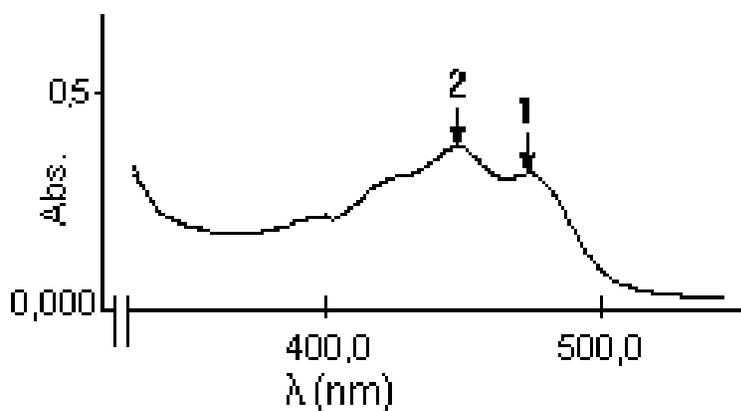
$$P = 2^n - 1$$

onde P= número de produtos acetilados e n= número de OH

A reação de metilação não forneceu nenhum produto com Rf superior. Isso é explicado porque a  $\beta$ -criptoxantina não contém hidroxila alílica. A presença de uma hidroxila alílica, sob as condições estipuladas, forneceria um produto metilado com Rf superior ao da amostra original.

O espectro UV-vis da fração  $\beta$ -criptoxantina em éter de petróleo teve uma absorvância máxima em 474 nm, 448 nm e um “ombro” em 424 nm. O % III/II desse espectro foi igual a 25 (Figura 19).

FIGURA 19 – ESPECTRO EM UV-vis DA FRAÇÃO CONTENDO A  $\beta$ -CRIPTOXANTINA EM ÉTER DE PETRÓLEO



A literatura afirma que o espectro UV-vis da  $\beta$ -criptoxantina em éter de petróleo apresenta duas bandas em 476 nm e 449 nm, com % III/II de 25, e um “ombro” em 424 nm. A  $\alpha$ -criptoxantina tem dados de comprimento de onda parecidos; mas a % III/II é diferente (= 60) (DAVIES, 1976, p. 112; RODRIGUEZ-

AMAYA, 2001, p. 15). Na análise por clae, a fração  $\beta$ -criptoxantina em etanol, com a fase móvel metanol: água (98:2) teve um pico em 10,3 minutos (Figura 20) e na fase 95:5, a  $\beta$ -criptoxantina teve um pico em 21,4 minutos (Figura 21). A literatura cita que a  $\beta$ -criptoxantina isolada de frutos de *Carica papaya* é do tipo *trans* e seu tempo de retenção na fase móvel metanol: água 98:2 (coluna Vydac 201 TP54 C<sub>18</sub> 250 x 4,6 mm) é em torno de 11 minutos (GODOY, RODRIGUEZ-AMAYA, 1994, p. 1310).

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE  $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA 98:2)

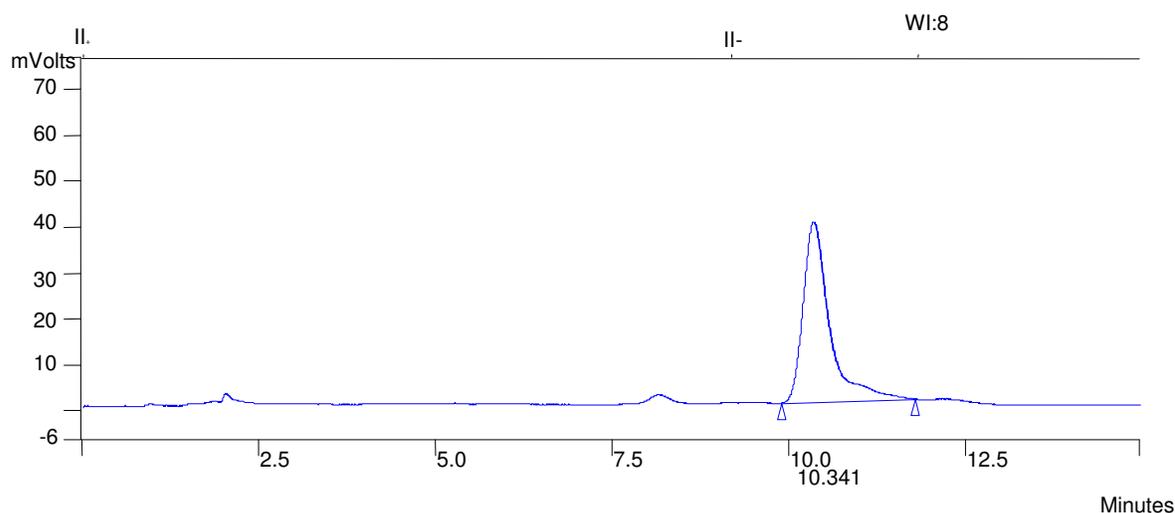
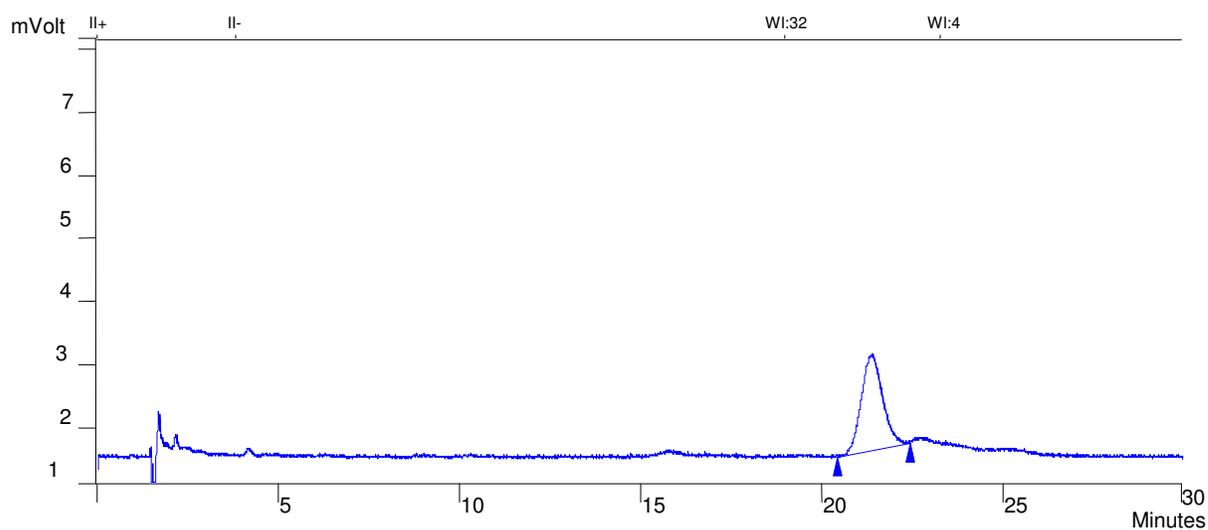


FIGURA 21 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE  $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA 95:5)



### 5.4.1.2 Licopeno

O licopeno foi eluído com auxílio de 10 % de acetona em éter de petróleo. A sua identificação foi demonstrada por meio de cromatografia em CCD com um insumo cosmético doseado a 5,9 % de licopeno como único carotenóide. Ambos apresentaram o mesmo Rf (Tabela 8) e, no caso do licopeno obtido por extração do mamão, não foi visualizado nenhum outro carotenóide como contaminante.

TABELA 8 – RFS OBTIDOS DO LICOPENO EM INSUMO E DO EXTRAÍDO DO MAMÃO

Fase móvel	Rfs obtidos	
	licopeno 1*	licopeno 2**
Acetona: benzeno: éter de petróleo (20:10:70)	0,96	0,96
Acetona: éter de petróleo (4:96)	0,79	0,78
Acetona: éter de petróleo (5:95), seguido de (15:85)	0,91	0,91

\*obtido via insumo cosmético

\*\* isolado do mamão

Confirmada a presença do licopeno na segunda fração do mamão (obtida pela cromatografia em coluna), a sua pureza foi verificada por meio de clae. Foram injetadas as amostras do licopeno na forma de insumo cosmético e do licopeno isolado do mamão (Figuras 22 e 23) e percebeu-se que a amostra de licopeno isolado estava menos contaminada que a do insumo.

FIGURA 22 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LICOPENO ISOLADO DO MAMÃO (METANOL: ÁGUA 98:2)

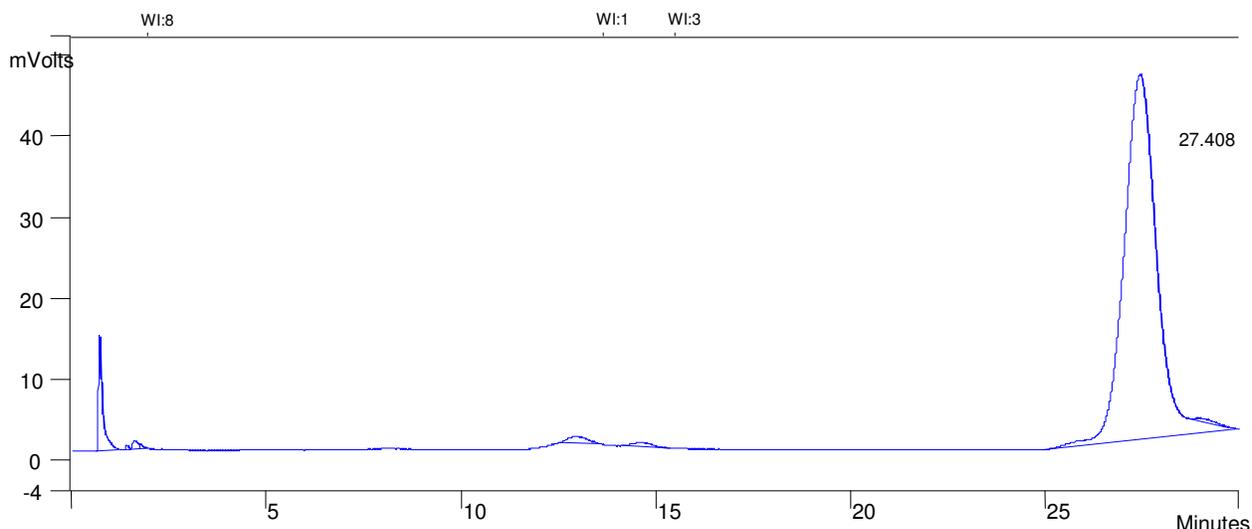
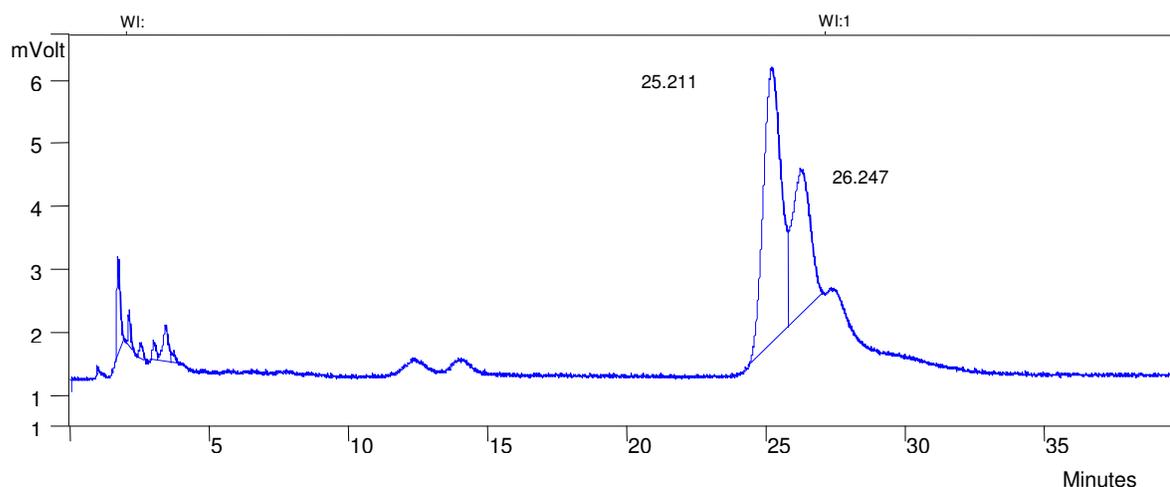


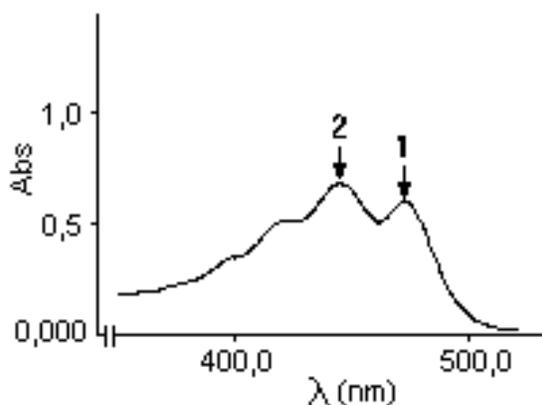
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LICOPENO EM INSUMO COSMÉTICO (METANOL: ÁGUA 98:2)



#### 5.4.1.3 Luteína

A amostra do insumo contendo luteína, solubilizada em etanol, foi submetida a uma análise de varredura por espectrometria no UV-vis entre 200 a 600 nm, onde se obteve como comprimentos de onda de maior absorbância os valores de 474 nm, 446 nm e 423 nm (Figura 24). O valor de % III/II foi de 60.

FIGURA 24 – ESPECTRO DO INSUMO CONTENDO LUTEÍNA EM ETANOL



Os dados de comprimento de onda de absorbância máxima da luteína na literatura são de 473 nm, 445 nm e um “ombro” em 422 nm; o valor de % III/II é de 60 (DAVIES, 1976, p. 112; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 15). Os dados obtidos, quando comparados aos publicados, confirmam a identidade da luteína.

Outro lote desse insumo cosmético foi solubilizado em etanol, filtrado por filtros com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e foi verificada a presença da luteína por clae com fase móvel metanol: água (98:2 e 95:5) (Figura 25 e 26). A luteína foi cromatografada para a verificação da sua presença e de outros carotenóides. A luteína está praticamente pura, podendo ser utilizada no experimento de coeluição.

FIGURA 25 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LUTEÍNA EM INSUMO COSMÉTICO (METANOL: ÁGUA, 95:5)

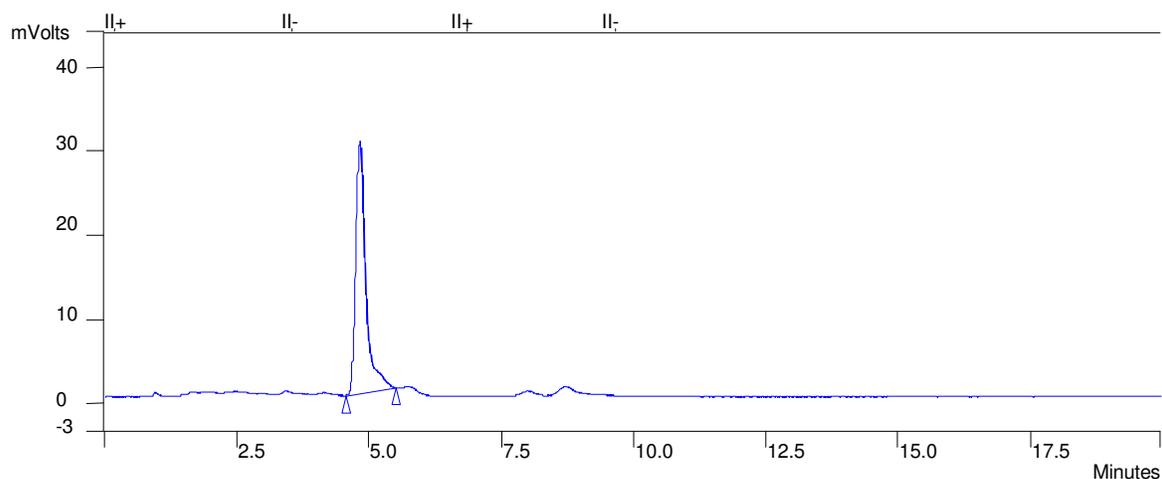
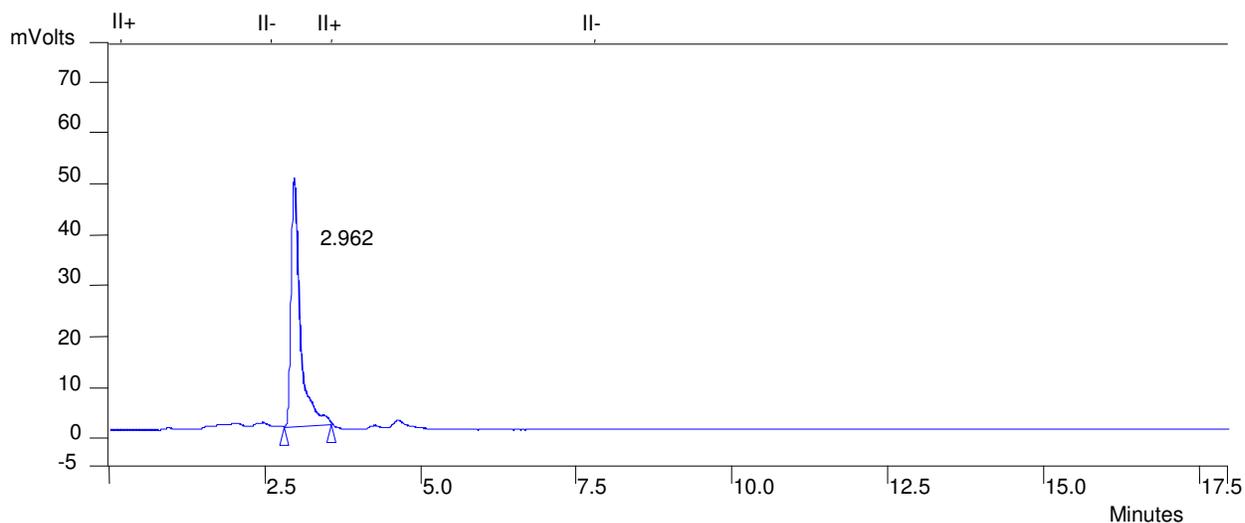


FIGURA 26 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DE LUTEÍNA EM INSUMO COSMÉTICO (METANOL: ÁGUA, 98:2)



#### 5.4.1.4 Curvas de calibração

As curvas de calibração da luteína,  $\beta$ -criptoxantina e  $\beta$ -caroteno foram executadas com os dados aplicados em triplicata (Figura 27, 28 e 29).

FIGURA 27 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O  $\beta$ -CAROTENO

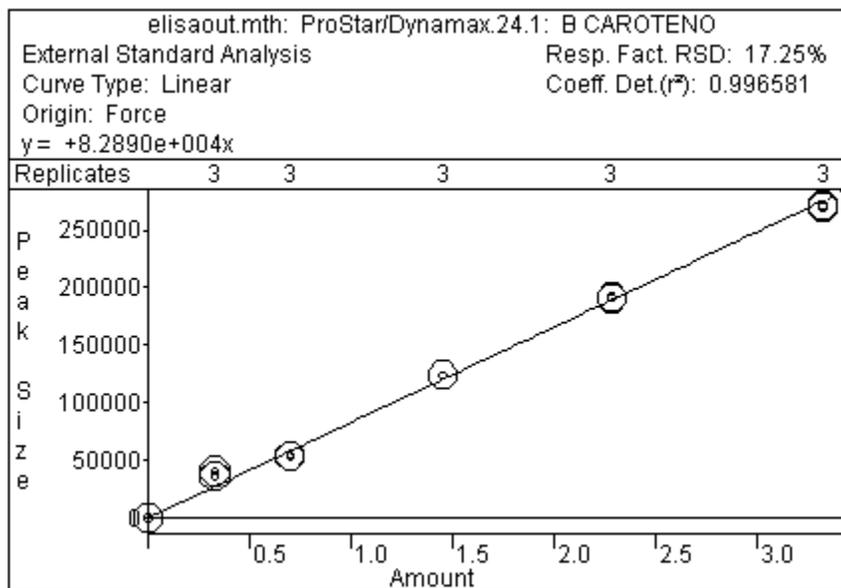


FIGURA 28 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA A  $\beta$ -CRIPTOXANTINA

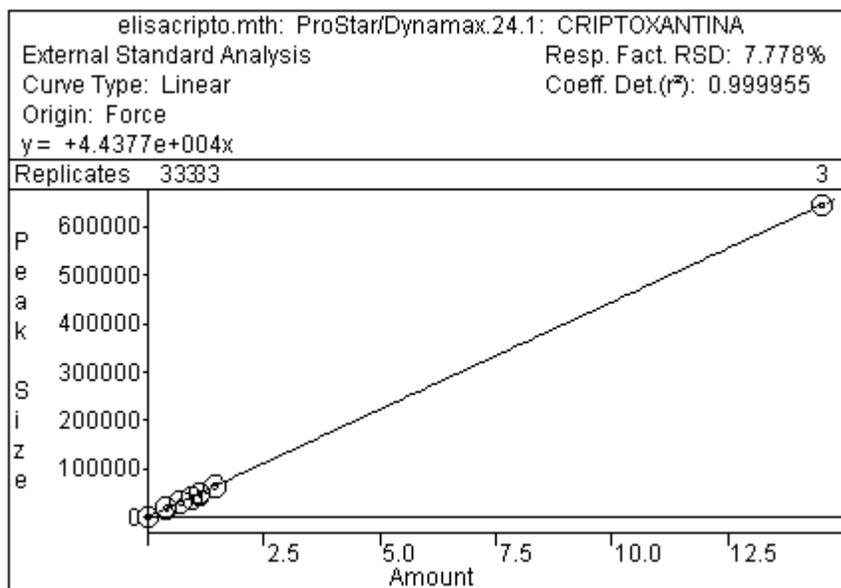
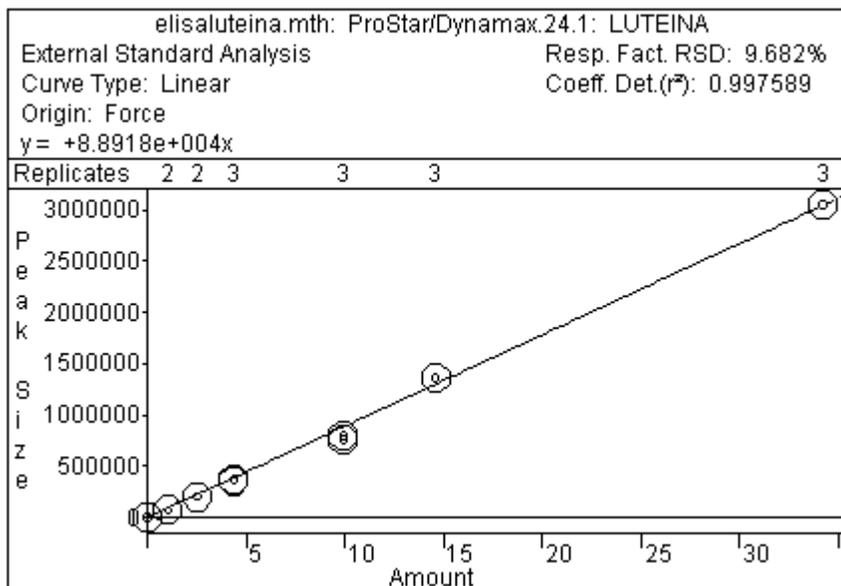


FIGURA 29 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA A LUTEÍNA



#### 5.4.2 Separação dos carotenóides e identificação

Devido ao alto índice de gorduras (a literatura afirma em torno de 60 % no pequi), o tratamento de saponificação do extrato cetônico com solução de KOH a 20 % por 16 horas não foi suficiente para a extração de todo o sabão sólido gerado. Os sabões de potássio têm a tendência de serem mais maleáveis e com um ponto de fusão menor que os de sódio; provavelmente, em função da temperatura ambiente, todo o sabão não atingiu o ponto de solidificação necessário, mesmo colocando a mistura em geladeira. Além disso, o efeito da precipitação do sabão com NaCl não foi suficiente. Uma maneira de se retirar o sabão que não precipitou é adicionar na mistura uma solução de cloreto de cálcio – sais de ácidos graxos de cálcio são insolúveis em água. Com isso obteve-se a eliminação de todo o sabão.

A triagem multidesenvolvimento da fração etérea, advinda da saponificação, apresentou sete tipos de carotenos na fração éter etílico do extrato cetônico do mesocarpo interno mais endocarpo. Na revelação com HCl para a verificação de carotenóides epoxilados, foram detectados dois carotenos epoxilados na fração éter etílico do extrato cetônico. Esse dado concorda com a literatura, pois há registros da presença das xantofilas epoxiladas anteraxantina, criptoflavina e mutatoxantina (RAMOS et al., 2001, p. 27).

O sobrenadante, submetido à espectrometria de varredura em UV-vis, evidenciou alguns comprimentos de onda que sugerem a presença de alguns carotenóides. Segue, na Tabela 9, as sugestões dos possíveis carotenóides presentes:

TABELA 9 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA FRAÇÃO TOTAL EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

Comprimentos de onda - $\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
471	Afanizofila, apo-8'-licopenal, astaceno, bisdeidro- $\beta$ -caroteno, capsantina, capsantina-5,6-epóxido, licopeno, pirroxantina
447	Anteraxantina $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, luteína, zeaxantina
425	Anteraxantina, aurocroma, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno-1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina
347	fitoflueno
283	fitoeno

Os comprimentos de onda de 329 nm, 276 nm e 214 nm, que tiveram absorbância significativa, não apresentaram sugestões de possíveis carotenóides, de acordo com dados de DAVIES (1976).

A triagem multidesenvolvimento do extrato cetônico total mostrou a presença de sete carotenóides, sendo que a exposição a vapores de HCl detectou a presença de três epoxilados. RAMOS et al. (2001) citam a presença de três epóxidos no mesocarpo interno dessa espécie, a anteraxantina, criptoflavina ( $\beta$ -criptoxantina-5,8-epóxido) e a mutatoxantina, além de outros quatro carotenóides. Já RODRIGUEZ-AMAYA et al. (1995) encontraram seis carotenóides na polpa de *C. villosum*; entretanto, nenhum epoxilado.

As 25 eluições coletadas por meio da cromatografia em coluna, submetidas à CCD em triagem multidesenvolvimento, sugeriram a presença de 14 carotenóides, com três epoxilados. Esses foram verificados, por exposição aos vapores de HCl, nas frações C, F e H.

Os rendimentos das frações resultantes em relação a quantidade total obtida pela cromatografia em coluna estão listados na Tabela 10.

TABELA 10 – RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES EM RELAÇÃO AO TOTAL OBTIDO PELA CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Fração	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Rendimentos (%)	19,01	19,91	21,03	11,78	23,65	1,54	0,12	1,81	1,15

As frações A, C e E apresentaram precipitados que não foram solúveis em éter de petróleo, possivelmente substâncias oxigenadas que são menos solúveis nesse solvente. Na Tabela 11 estão listadas as frações, seus respectivos precipitados, quantidades e rendimentos:

TABELA 11 – FRAÇÕES CAROTENOÍDICAS, RESPECTIVOS PRECIPITADOS, QUANTIDADES E RENDIMENTOS

Frações	frA	frAppt	frC	frCppt1	frCppt2	frE	frEppt
Quantidades (mg)	421,3	4,3	465,9	23,3	5,2	524,3	14,3
Rendimentos (%)	-	1,02	-	5,0	1,12	-	2,73

As frações e seus respectivos precipitados apresentaram, por meio de espectrometria de varredura em UV-visível, regiões de comprimento de onda de maior absorbância, direcionando assim quais são os possíveis carotenos presentes (Tabelas 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23)

TABELA 12 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frAsobr EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
446	Afanizofila, anteraxantina $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, luteína, zeaxantina
424	Anteraxantina, aurocroma, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno-1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina
347	fitoflueno

TABELA 13 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frAppt EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
476	Afanizofila, licopeno, licofila, licoxantina, mixoxantofila, mixol 2'-O-metil-metil-pentosil
448	Afanizofila, $\beta$ -caroteno, filosamiaxantina, licoxantina, mixol 2'-O-metil-metil-pentosil, zeaxantina

TABELA 14 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frB EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
423	Anteraxantina, aurocroma, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno-1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, criptoflavina, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina
397	$\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno 1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno

TABELA 15 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frCsobr EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
445	Afanizofila, anteraxantina, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, luteína, zeaxantina
423	Anteraxantina, aurocroma, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno-1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, criptoflavina, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina

TABELA 16 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frCppt1 E frCppt2 EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS\*

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
476	Afanizofila, licopeno, licofila, licoxantina, mixoxantofila, mixol 2'-O-metil-metil-pentosil
450	Anteraxantina $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, filosamiaxantina, licoxantina, mixol 2'-O-metil-metil-pentosil, zeaxantina

\*ambos os precipitados tiveram o mesmo perfil

TABELA 17 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frD EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
446	Afanizofila, anteraxantina $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, luteína, zeaxantina
423	Anteraxantina, aurocroma, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno-1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, criptoflavina, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina

TABELA 18 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frEsobr EM ÉTER DE PETRÓLEO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
448	Afanizofila, $\beta$ -caroteno, $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, luteína, zeaxantina
423	Anteraxantina, aurocroma, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno-1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, criptoflavina, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina

TABELA 19 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frEppt EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
447	Afanizofila, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, luteína, zeaxantina
423	Anteraxantina, aurocroma, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno-1,2-epóxido, $\eta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina
402	Aurocroma, auroxantina, crocetina, flavoxantina, neocroma

TABELA 20 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frF EM DICLOROMETANO DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
456	Anteraxantina, caloxantina, $\alpha$ -caroteno, $\alpha$ -caroteno-5,6-epóxido, fanizofila, $\beta$ -criptoxantina-5,6-epóxido, diatoxantina, heteroxantina, lodoxantina, luteína, nostoxantina
431	Anteraxantina, caloxantina, $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina-5,6-5',6'-diepóxido, diatoxantina, flavoxantina, flavocroma, lodoxantina, nostoxantina, taraxantina, zeaxantina

TABELA 21 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frG EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
452	$\beta$ -caroteno, filosamixantina, mixol 2'-O-metil-metil-pentosil, zeaxantina
425	$\alpha$ -caroteno, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina
403	Aurocroma, auroxantina, crocetina, flavoxantina, neocroma

TABELA 22 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frH EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
426	$\alpha$ -caroteno, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina
402	Aurocroma, auroxantina, crocetina, flavoxantina, neocroma

TABELA 23 - POSSÍVEIS CAROTENÓIDES NA frI EM ACETONA DE ACORDO COM A VARREDURA EM UV-VIS

$\lambda$ (nm)	Sugestões de carotenóides
426	$\alpha$ -caroteno, crocetina, flavoxantina, luteína, luteoxantina, mutatoxantina, neocroma, zeaxantina
402	Aurocroma, auroxantina, crocetina, flavoxantina, neocroma

A triagem multidesenvolvimento realizada com todas as frações, precipitados e as soluções-padrão de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno e luteína resultou em indicativos da presença de  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina na frAsobr, presença de luteína nas frAsobr, frAppt frCppt, frCppt2 e ausência de licopeno em todas as frações por comparação de Rf – por esse motivo não foi utilizado o licopeno na coeluição em clae. A frEsobr e a frEppt tiveram o mesmo comportamento em CCD, bem como a frCppt1 e a frCppt2. A frC, frF e a frH tiveram reação positiva para epóxido em presença de HCl. A frF, frG e a frI apresentaram um único ponto na CCD, sugerindo uma possível substância pura em cada fração.

Relacionando as informações obtidas por meio das espectrometrias de varreduras das frações com os comportamentos cromatográficos em CCD, percebe-se que há possibilidades do  $\beta$ -caroteno e da  $\beta$ -criptoxantina estarem presentes na frAsobr e a luteína estar presente na frAsobr, frAppt, frCsobr, frCppt1 e frCppt2.

Para confirmar essas sugestões, a fração total foi eluída em clae com as fases móveis metanol: água nas proporções de 98:2 e 95:5. Após, foi realizada uma coeluição com os padrões de  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina. Foi percebido um aumento de área do pico relativo ao  $\beta$ -caroteno e o da  $\beta$ -criptoxantina, confirmando a presença dos dois padrões na fração total (Figura 30 e 31).

FIGURA 30 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL (METANOL: ÁGUA, 98:2)

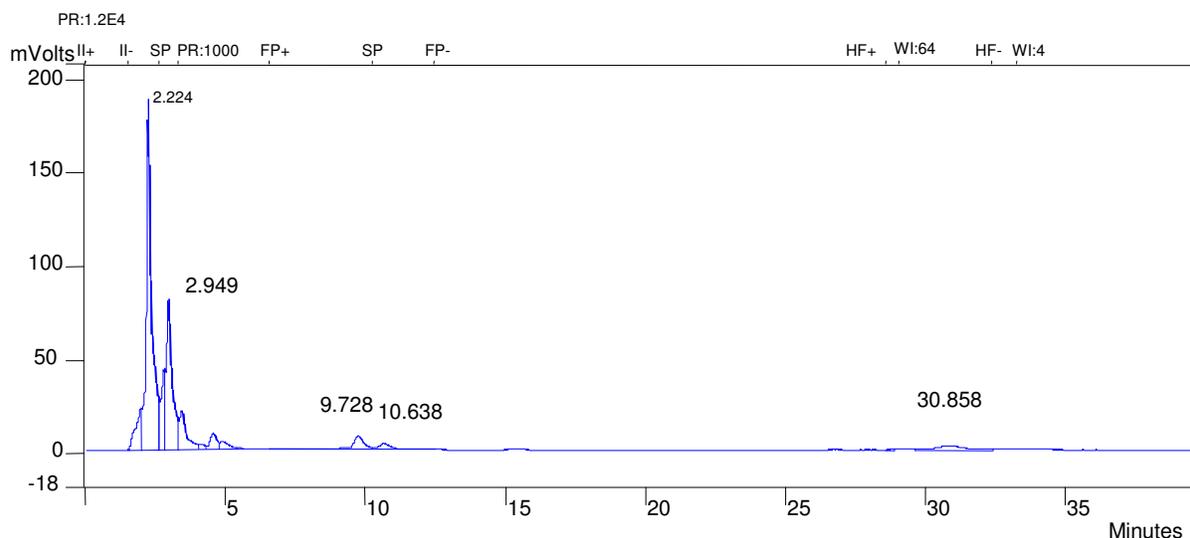
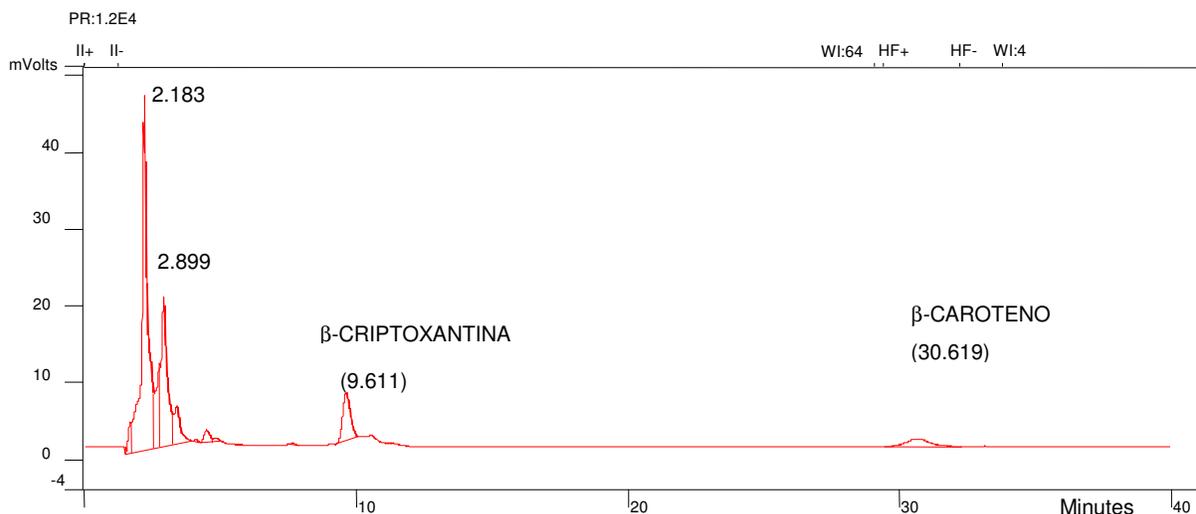


FIGURA 31 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL COELUÍDA COM  $\beta$ -CAROTENO E  $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA, 98:2)



Como a separação dos dois primeiros picos (primeiros cinco minutos) não foi satisfatória, foi realizada uma nova eluição em fase móvel mais polar (metanol: água 95:5), bem como a coeluição com luteína (Figura 32, 33 e 34)

FIGURA 32 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL (METANOL: ÁGUA, 95:5)

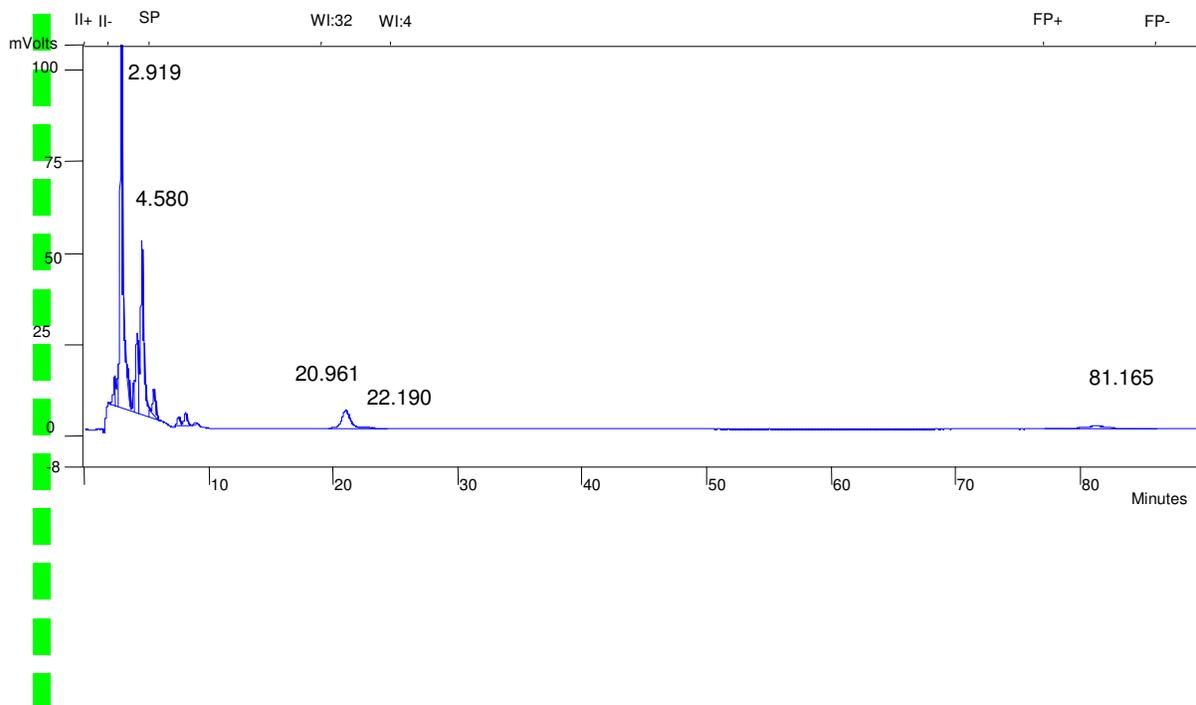


FIGURA 33 – DETALHE DO CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL, COM A SEPARAÇÃO DO PICO EM 4,5917 MIN. (METANOL: ÁGUA, 95:5)

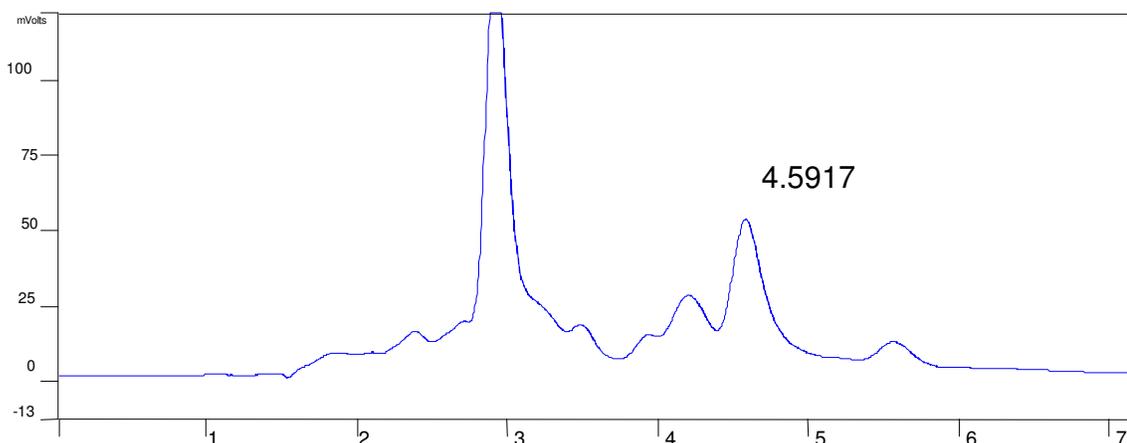
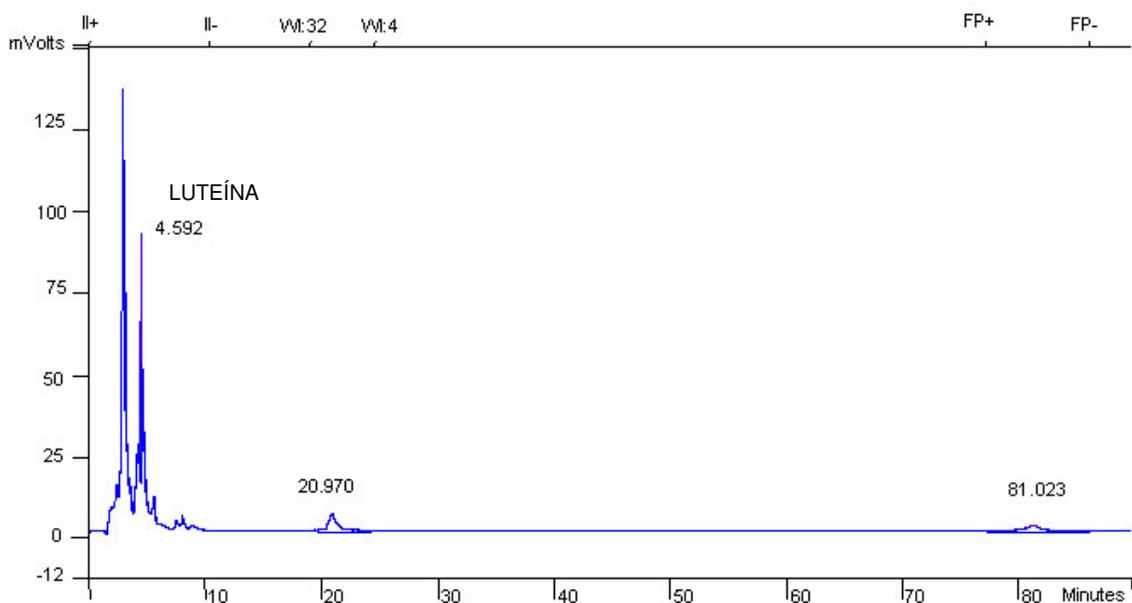


FIGURA 34 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO TOTAL COELUÍDA COM LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)



As frações da cromatografia em coluna foram eluídas e coeluídas com alguns padrões, para a verificação de sua localização e comparação com o resultados em CCD.

A eluição da frAsobr apresentou picos que coeluíram com os padrões de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e luteína (Figura 35 e 36).

FIGURA 35 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAsobr (METANOL: ÁGUA, 98:2)

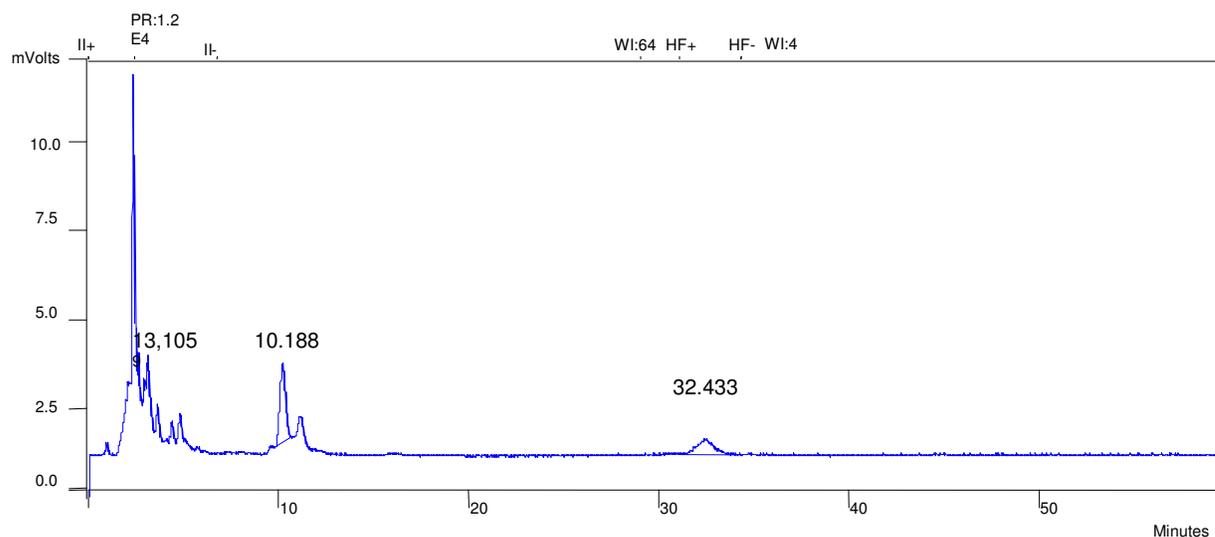
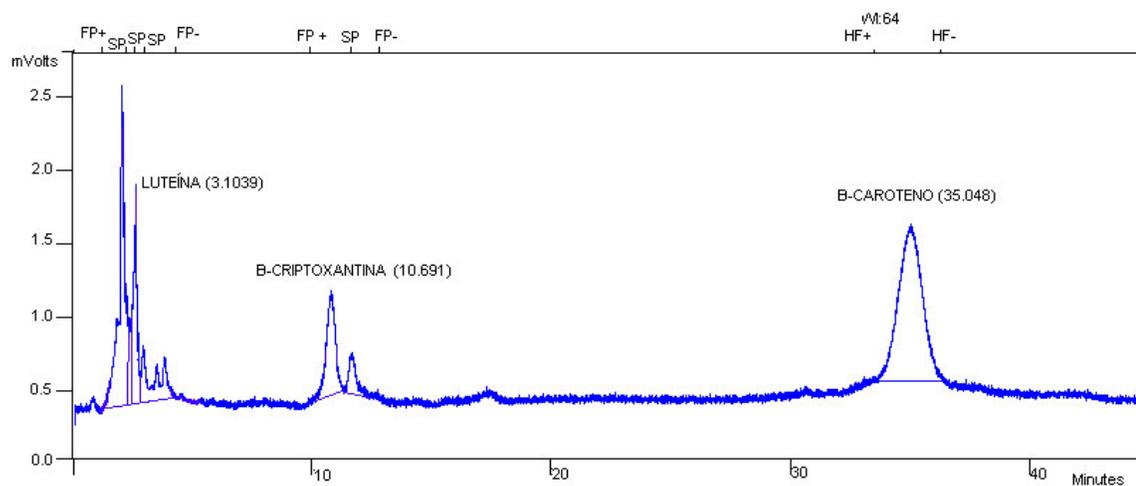


FIGURA 36 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAsobr COM PADRÕES DE  $\beta$ -CAROTENO,  $\beta$ -CRIPTOXANTINA E LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 98:2)



A frAppt foi eluída durante 40 minutos na fase móvel metanol: água (98:2), sem apresentar picos por volta de 10 minutos e 31 minutos, o que exclui a presença de  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, como pode ser visualizado no cromatograma. Foram visualizados picos em até 5 minutos, e o pico em 2,9735 min coeluiu com a luteína (Figura 37, 38 e 39).

FIGURA 37– CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAppt (METANOL: ÁGUA, 98:2)

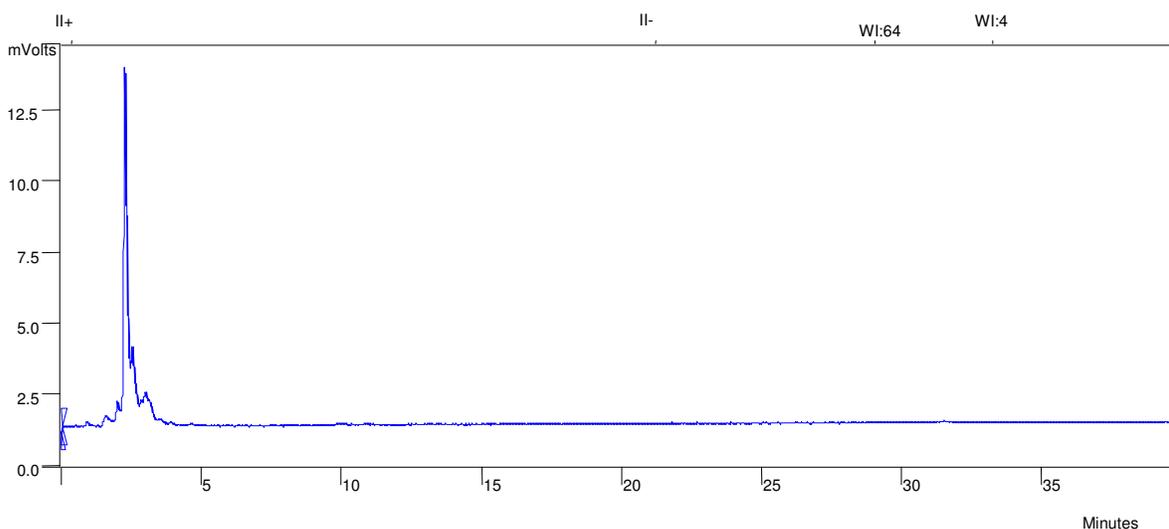


FIGURA 38 – DETALHE DO CROMATOGRAMA EM CLAE DA frAppt, COM SUBSTÂNCIAS EM TORNO DE 3 MIN (METANOL: ÁGUA, 98:2)

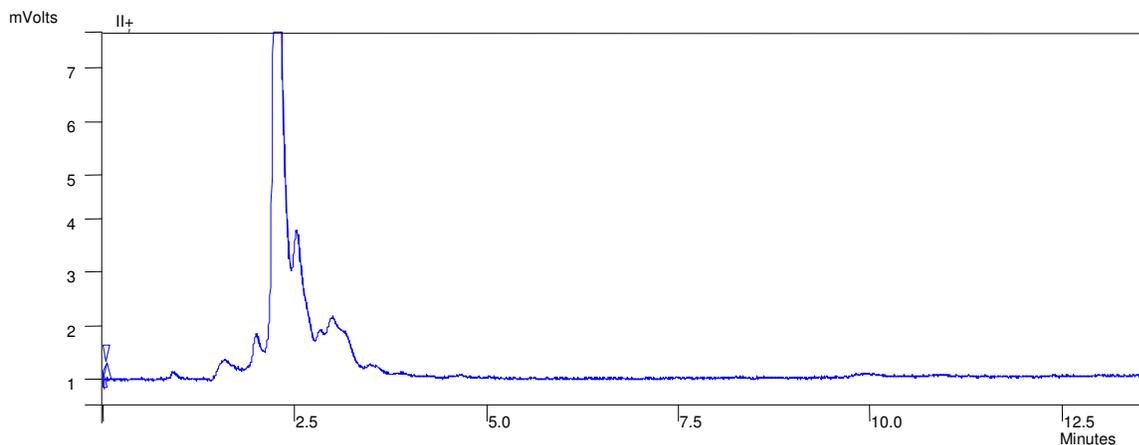
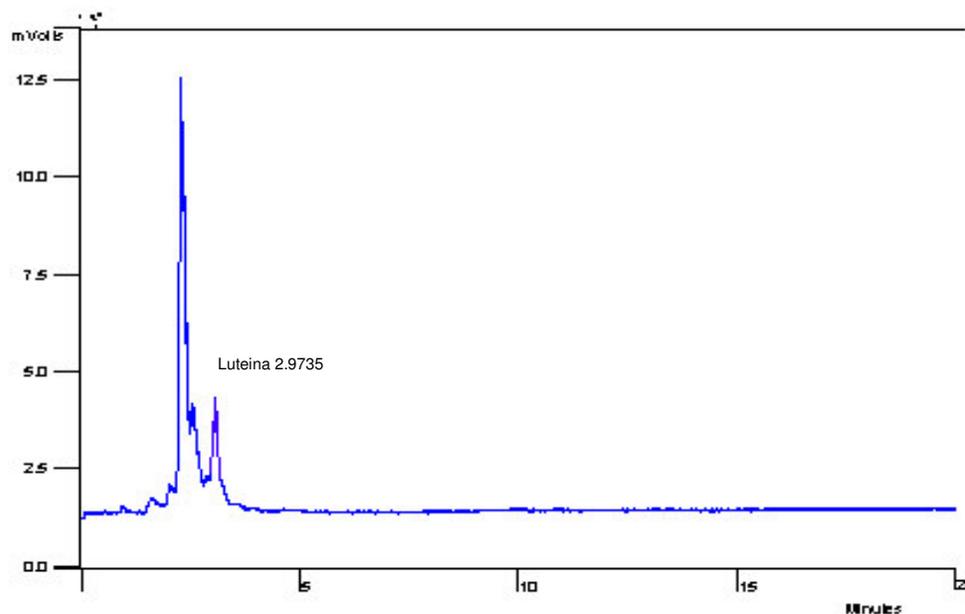


FIGURA 39 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frAppt COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 98:2)



A frB foi cromatografada em clae na fase móvel metanol: água (95:5), e coeluída com  $\beta$ -criptoxantina e luteína (Figura 40, 41 e 42). Não demonstrou a presença de  $\beta$ -caroteno.

FIGURA 40 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frB (METANOL: ÁGUA, 95:5)

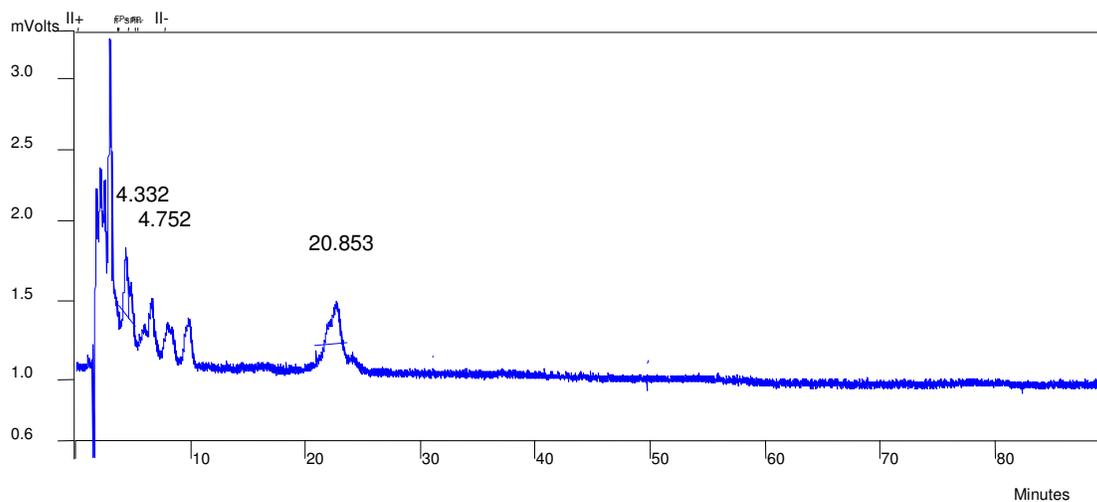


FIGURA 41 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frB COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)

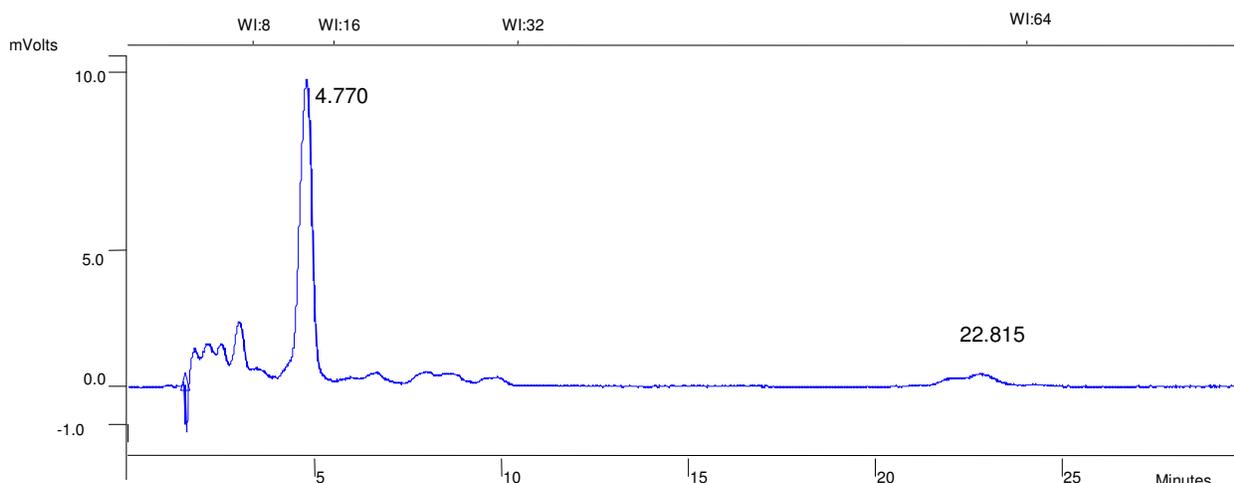
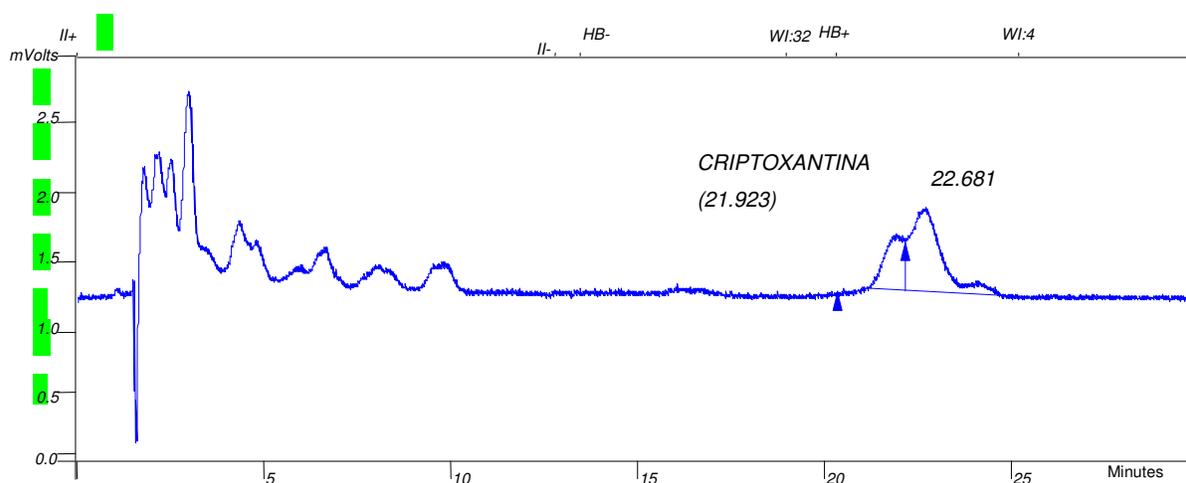


FIGURA 42- CROMATOGRAMA EM CLAE DA frB COM O PADRÃO DE  $\beta$ -CRIPTOXANTINA (METANOL: ÁGUA, 95:5)



Na coeluição com a  $\beta$ -criptoxantina, a frA e frB tiveram um segundo pico em torno de 20 min, fato que não foi visualizado na fração total. O mesmo foi percebido após quatro dias da diluição do padrão de  $\beta$ -criptoxantina em etanol. Provavelmente ocorreu oxidação da substância, fato extremamente comum nos carotenóides.

A frCsobr foi cromatografada com a fase móvel metanol: água (95:5) e apresentou um pico correspondente à luteína, fato que foi comprovado pela coeluição com esse padrão (Figura 43 e 44).

FIGURA 43 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frCsobr (METANOL: ÁGUA, 95:5)

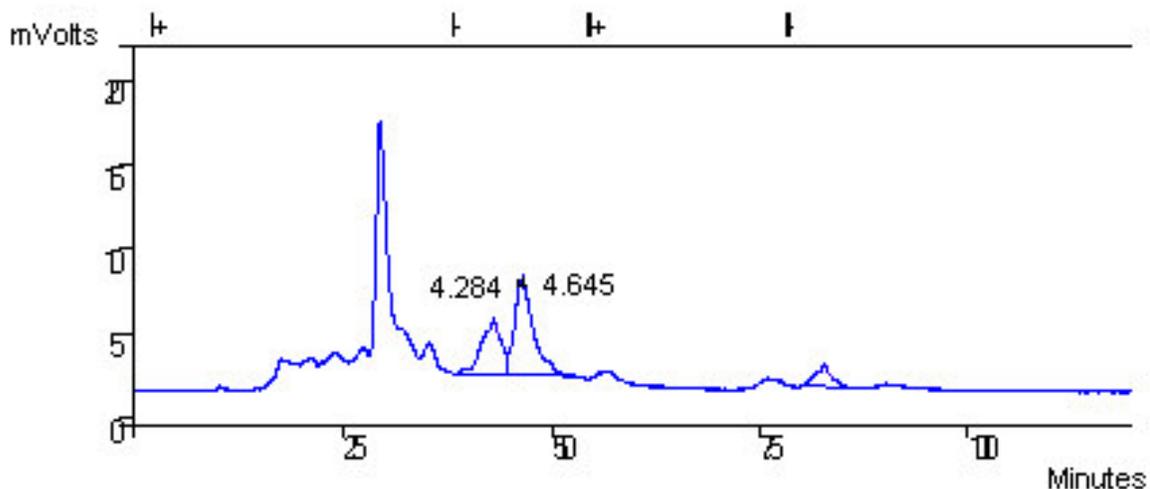
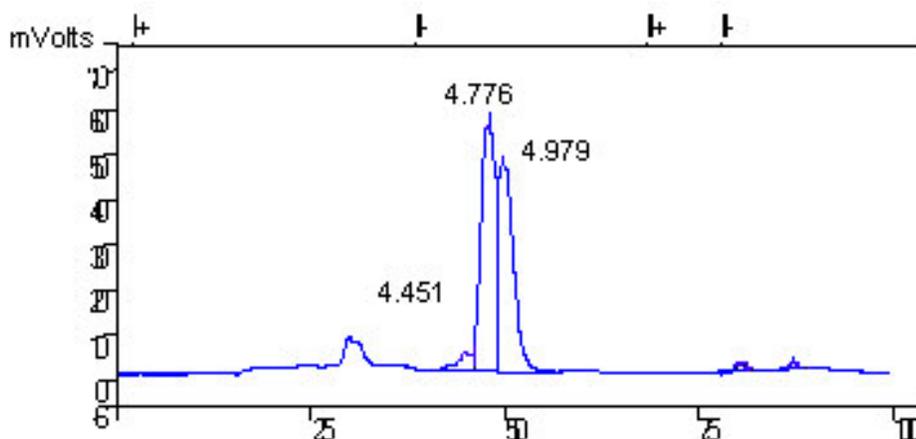


FIGURA 44 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frCsobr COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)



A frCppt1 e frCppt2 foram reunidas numa só fração, chamada frCppt, pois tiveram o mesmo comportamento cromatográfico em CCD. Essa foi cromatografada com a fase móvel metanol: água (95:5) e apresentou um pico de mesmo tempo de retenção da luteína (Figura 45), fato que foi comprovado pela coeluição com esse padrão (Figura 46).



FIGURA 45 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frCppt (METANOL: ÁGUA, 95:5)

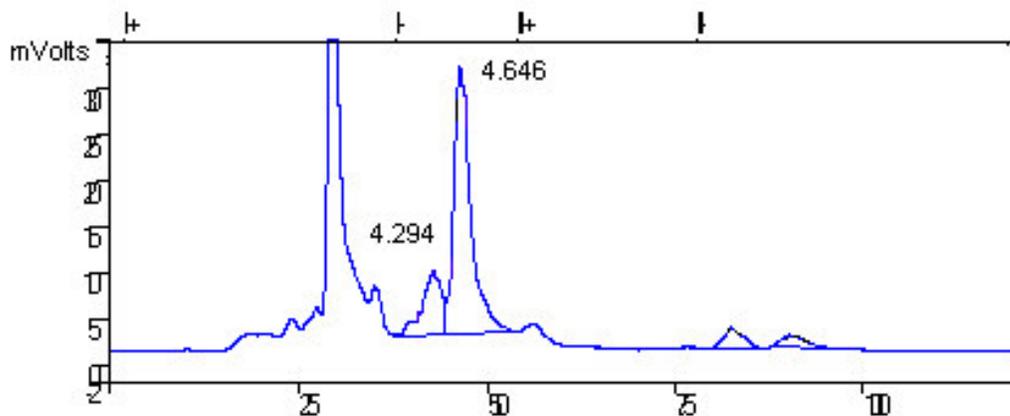
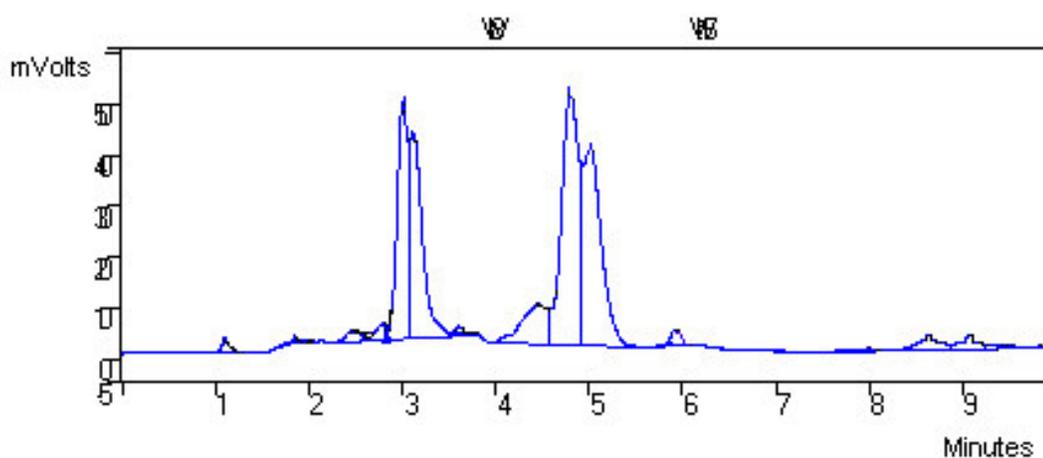


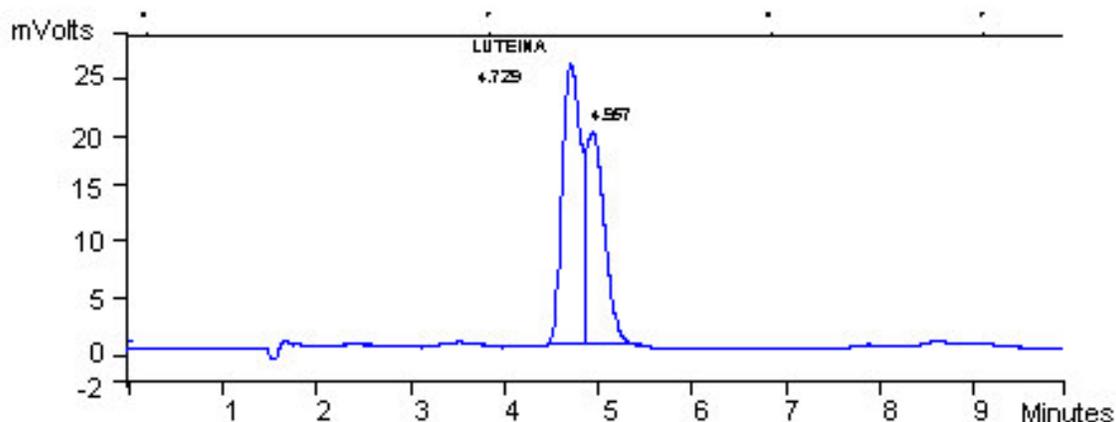
FIGURA 46 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frCppt COM O PADRÃO DE LUTEÍNA, DEMONSTRANDO A DEGRADAÇÃO DO MAIOR PICO E DA LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)



No decorrer dos experimentos percebeu-se que o maior pico dessa amostra sofreu degradação, demonstrada pela presença de um segundo pico depois de algumas horas dissolvida em etanol. Esse fato se repetiu com o pico relativo à luteína em todas as amostras, bem como o padrão de luteína em etanol (Figura 47).



FIGURA 47 - CROMATOGRAMA EM CLAE DO PADRÃO DE LUTEÍNA, DEMONSTRANDO A DEGRADAÇÃO DO MESMO DEPOIS DE ALGUMAS HORAS NO ETANOL (METANOL: ÁGUA, 95:5)



A frD foi cromatografada com a fase móvel metanol: água 95:5 e apresentou um pico correspondente à luteína, fato que foi comprovado pela coeluição com esse padrão (Figura 48 e 49).

FIGURA 48 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frD (METANOL: ÁGUA, 95:5)

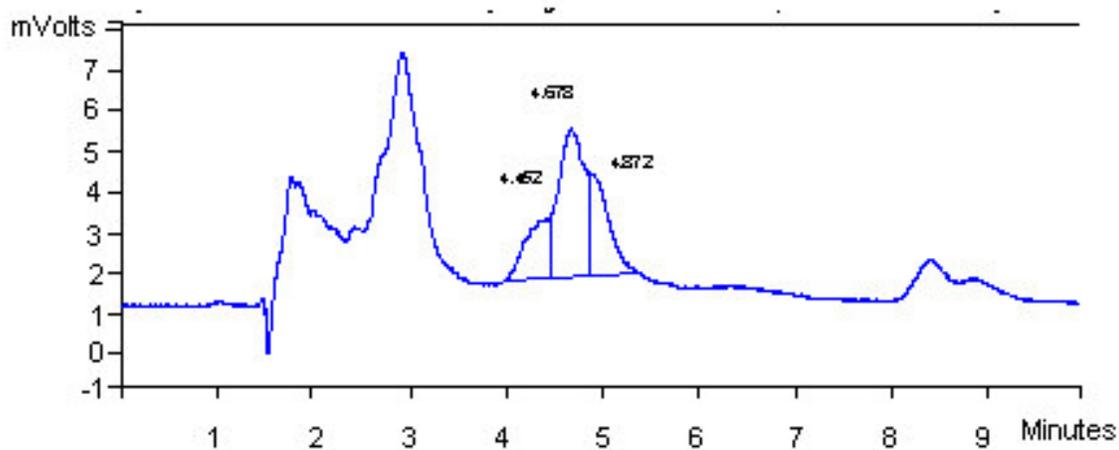
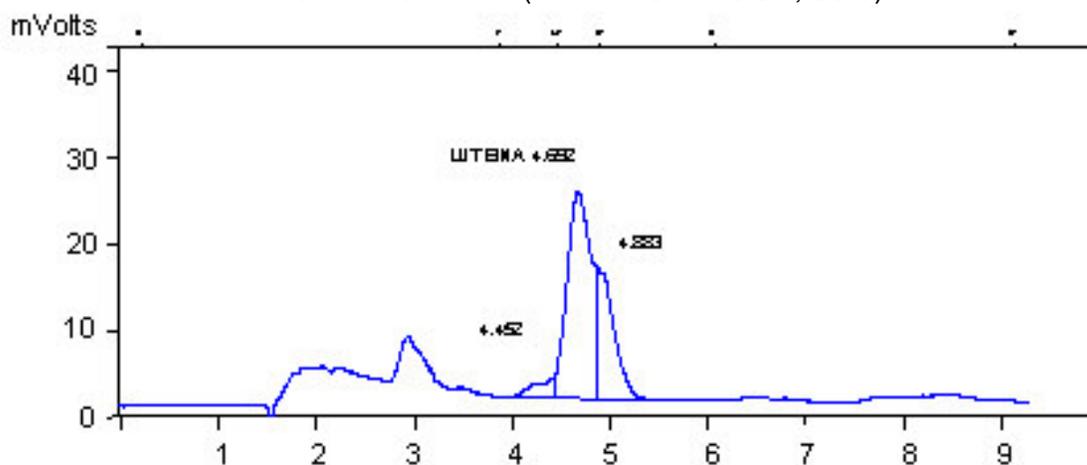


FIGURA 49 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frD COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)



A frEsobr e a frEppt tiveram o mesmo perfil em CCD, portanto, foram reunidas para a injeção em clae, denominada frE. Essa foi cromatografada com a fase móvel metanol: água (95:5) e apresentou um pico correspondente à luteína, fato que foi comprovado pela coeluição com esse padrão (Figura 50 e 51).

FIGURA 50 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frE (METANOL: ÁGUA, 95:5)

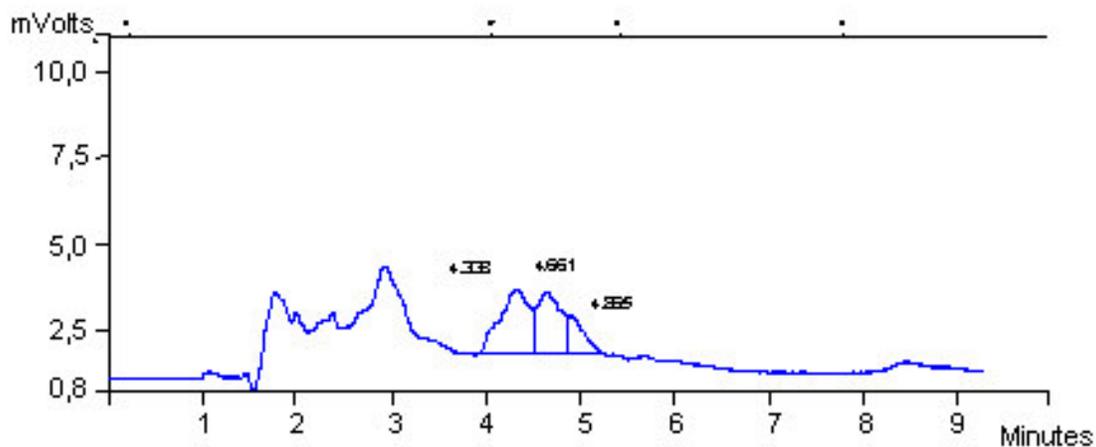
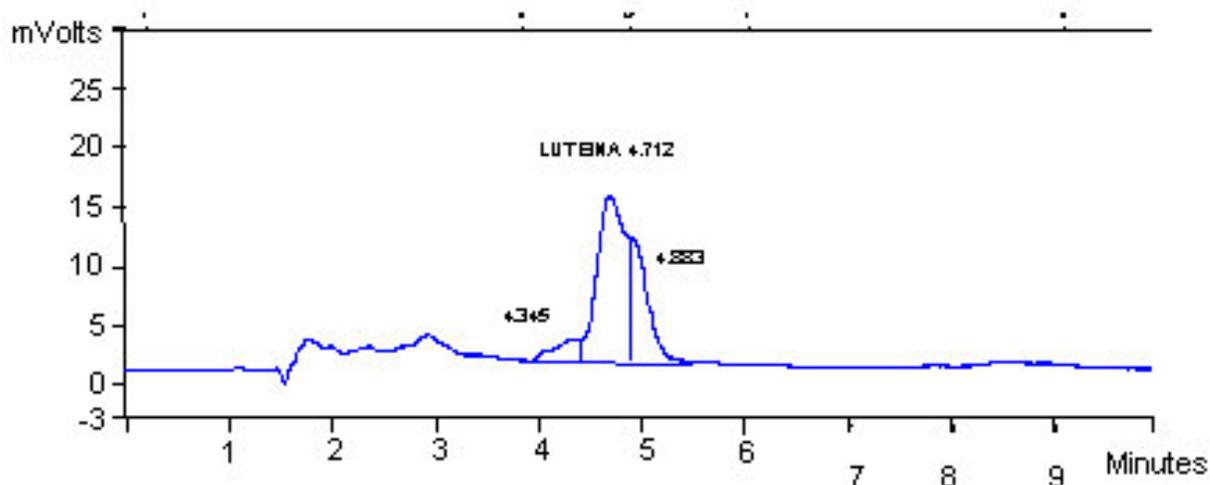


FIGURA 51 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frE COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)



A frF foi cromatografada com a fase móvel metanol: água (95:5) e apresentou um pico correspondente a luteína, fato que foi comprovado pela coeluição com esse padrão (Figuras 52 e 53)

FIGURA 52 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frF (METANOL: ÁGUA, 95:5)

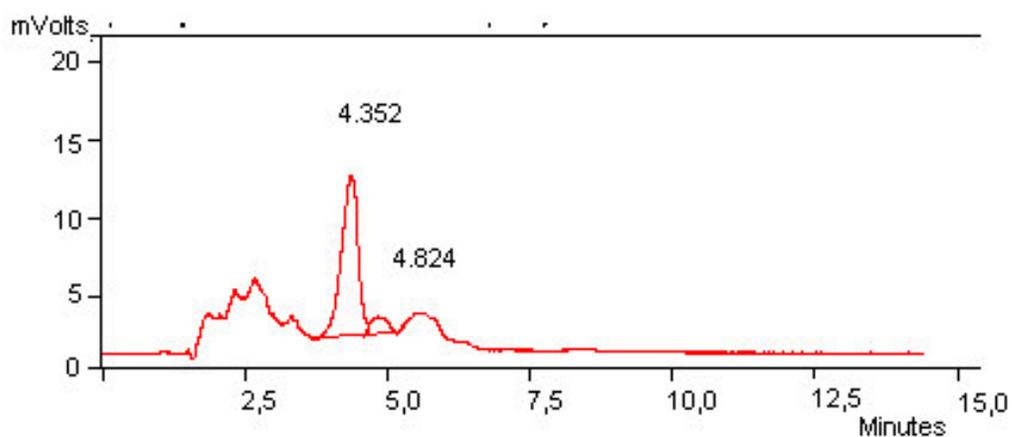
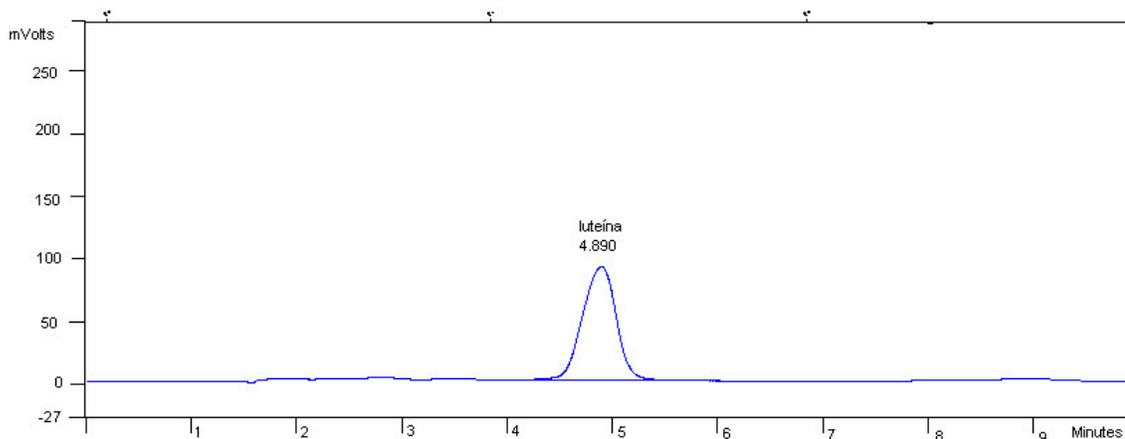


FIGURA 53 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frF COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)



A frG foi cromatografada com a fase móvel metanol: água (95:5) e apresentou um pico correspondente a luteína, fato que foi comprovado pela coeluição com esse padrão (Figura 54 e 55). Além disso, seu comportamento cromatográfico foi muito parecido com o da frF (Figura 56). A sugestão de que a frF e frG estivessem puras (pela CCD) foi descartada pelo cromatograma em clae.

FIGURA 54 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frG (METANOL: ÁGUA, 95:5)

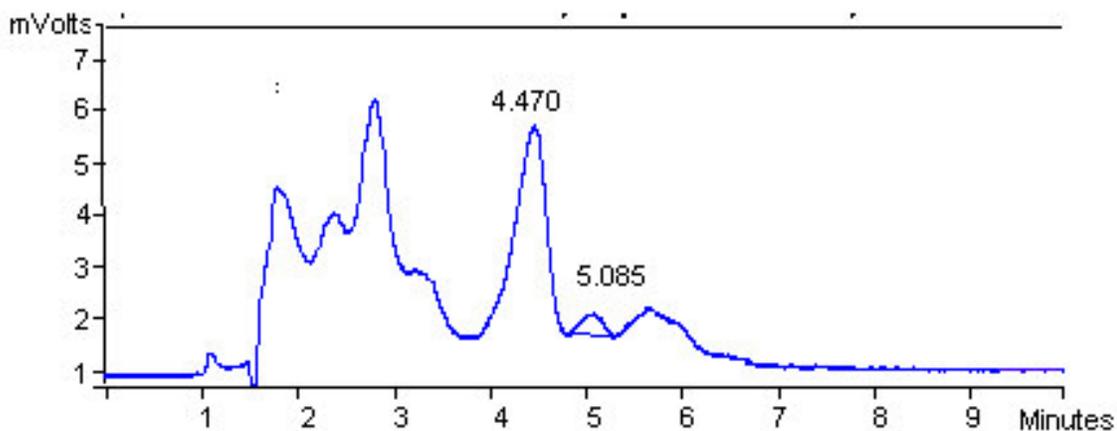


FIGURA 55 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frG COM O PADRÃO DE LUTEÍNA (METANOL: ÁGUA, 95:5)

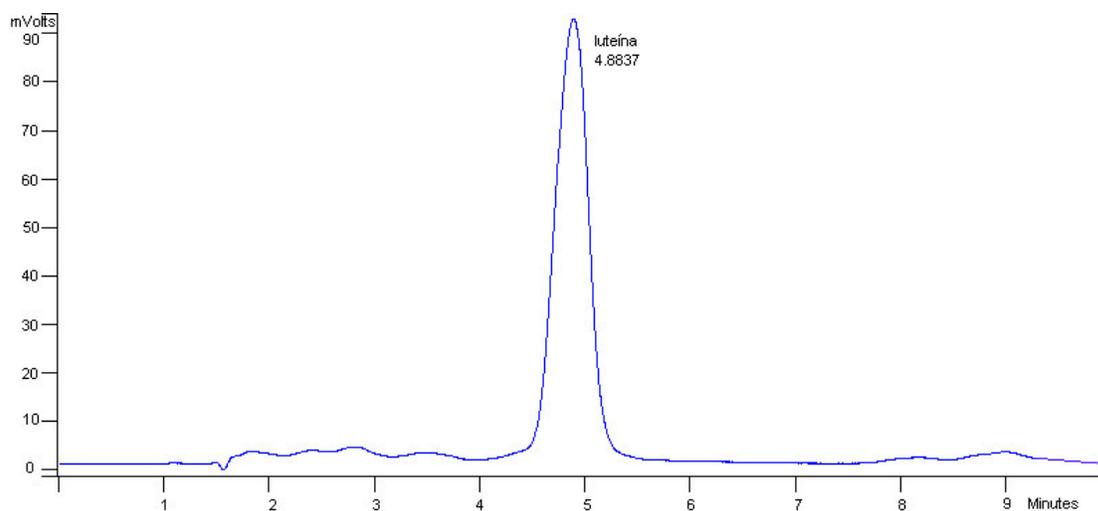
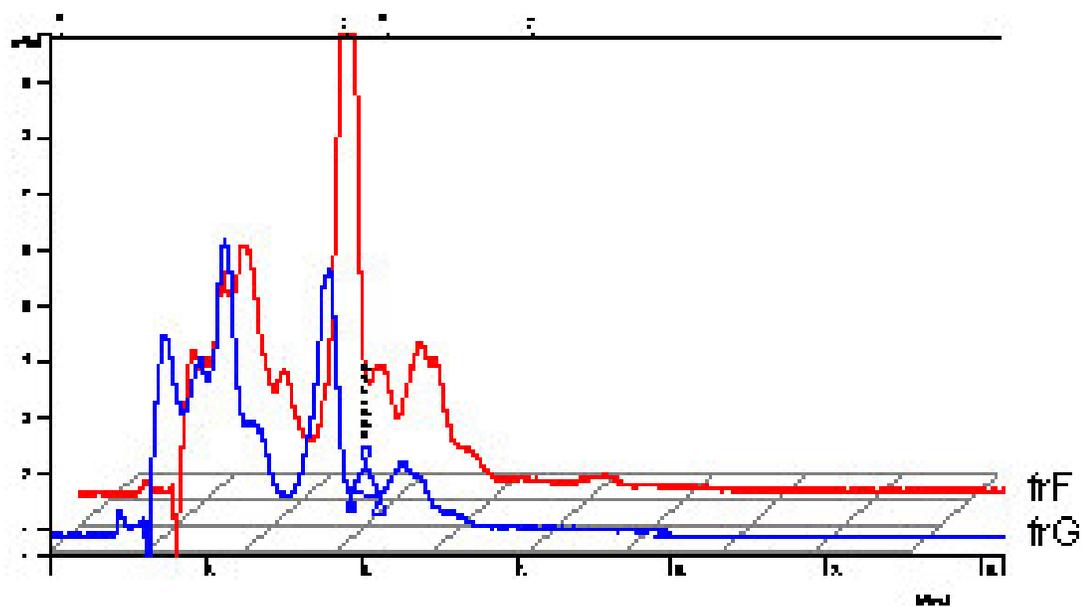
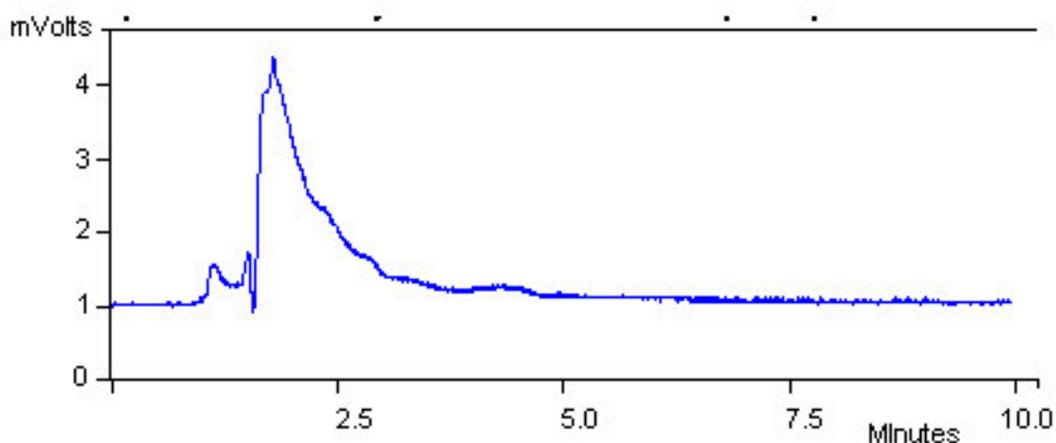


FIGURA 56 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA frF E frG, MOSTRANDO A SEMELHANÇA ENTRE AS DUAS (METANOL: ÁGUA 95:5)



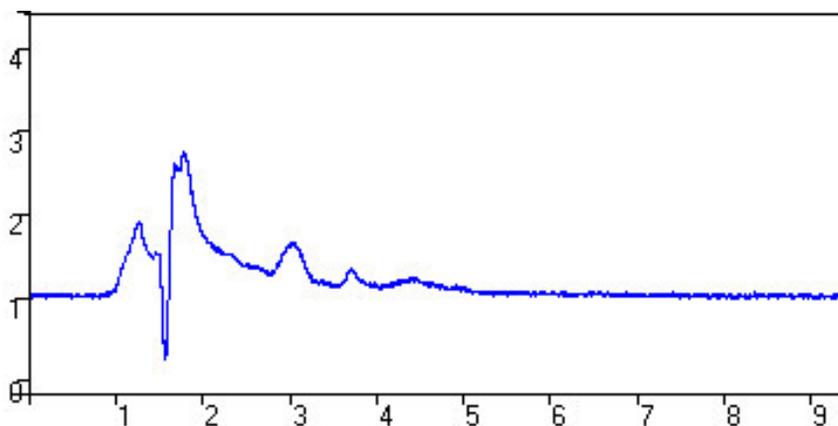
A frH foi cromatografada com a fase móvel metanol: água (95:5) e não apresentou um pico correspondente a luteína (Figura 57), portanto, não foi realizada coeluição. Como o cromatograma mostrou os picos muito agrupados, provavelmente a substância principal deve estar em concentração alta, sobrepondo os outros picos. O ideal, nesse caso, seria uma eluição em gradiente de polaridade.

FIGURA 57 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frH (METANOL: ÁGUA, 95:5)



A frI foi cromatografada com a fase móvel metanol: água (95:5) e não apresentou pico correspondente à luteína. O cromatograma em clae apresenta mais de um pico; conclui-se, portanto, que a substância não está pura, refutando o obtido pela CCD (Figura 58).

FIGURA 58 - CROMATOGRAMA EM CLAE DA AMOSTRA DA frI (METANOL: ÁGUA, 95:5)



Levando em consideração as diluições envolvidas para as cromatografias, pode-se afirmar que a luteína, dentre as substâncias analisadas, está em maior concentração que o  $\beta$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina (Tabela 24):

TABELA 24 - QUANTIDADES DE  $\beta$ -CAROTENO,  $\beta$ -CRIPTOXANTINA E LUTEÍNA NAS FRAÇÕES E AMOSTRA TOTAL DA PARTIÇÃO ETÉREA

Frações	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ fração)	$\beta$ -criptoxantina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ fração)	Luteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ fração)
frAsobr	0,11	0,36	Não mens.
frAppt	-	-	0,23
frB	-	0,004	Não mens.
frCsobr	-	-	0,35
frCppt	-	-	4,73
frD	-	-	0,07
frE	-	-	0,07
frF	-	-	0,006
frG	-	-	0,06
frH	-	-	-
frI	-	-	-
Fração total (extr cetônico)	0,6	1,94	3,90

As quantidades obtidas pelas frações referentes às substâncias  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e luteína foram muito inferiores às quantidades obtidas pela fração total. Isso provavelmente se deve a perdas no decorrer da cromatografia em coluna e a manipulação das frações, visto que os carotenóides são extremamente sensíveis.

Transformando as quantidades obtidas (na fração concentrada etérea – fração total) para as quantidades em fruto, apresentam-se os seguintes dados (Tabela 25):

TABELA 25 - QUANTIDADES OBTIDAS DE LUTEÍNA,  $\beta$ -CRIPTOXANTINA E  $\beta$ -CAROTENO

Carotenóide	Dados obtidos $\mu\text{g/g}$ fruto total	Dados obtidos $\mu\text{g/g}$ mesocarpo interno + endocarpo	Dados obtidos $\mu\text{g/g}$ parte edível (1)*	Dados obtidos $\mu\text{g/g}$ mesocarpo interno (2)
Luteína	4,57	6,99	-	-
$\beta$ -criptoxantina	2,26	3,46	4,4	93,67
$\beta$ -caroteno	0,702	1,07	1,2	9,35

\* dados relativos a outra espécie, *C. villosum*

(1)GODOY; RODRIGUEZ-AMAYA, 1994, p. 1309

(2)RAMOS et al., 2001, p. 27

As quantidades de carotenóides obtidas no mesocarpo interno mais endocarpo, quando comparadas aos dados de GODOY; RODRIGUEZ-AMAYA (1994), podem ser consideradas próximas, visto que esses autores consideraram parte edível o mesocarpo interno e o externo, abstraindo o endocarpo. Todavia, com os dados de RAMOS et al. (2001), não pode ser traçado um parâmetro de comparação, pois esses autores utilizaram somente o mesocarpo interno sem o endocarpo. Além disso, os frutos pertencem a regiões diferentes (Piauí, Mato Grosso do Sul) e situações como exposição ao sol, tipo de manuseio, processamento e conservação, estágio de maturação, bem como a época de colheita promovem variações significativas no teor de carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, p. 10). Outro diferencial seria o método de análise: ambos os autores escolheram o método de separação por coluna aberta e quantificação por espectrometria em UV-vis por meio de absorvidade molar. Não foi possível quantificar e identificar nenhum outro carotenóide com a metodologia utilizada, visto que nenhuma fração ficou totalmente purificada. A luteína não pode ser considerada o carotenóide majoritário do fruto de *C. brasiliense*; entretanto pode ser considerada uma das substâncias de maior concentração. O fruto pode pertencer ao grupo de frutos que contém a  $\beta$ -criptoxantina como principal pró-vitamina A, como o outro de seu gênero, o *Caryocar villosum* (GODOY, RODRIGUEZ-AMAYA, 1994, p. 1308)

De acordo com os dados obtidos, percebeu-se que a cromatografia em coluna não foi efetiva na separação de carotenóides “puros” para a identificação. Isso já foi observado por outros autores, que reconhecem a dificuldade de

separação de carotenóides, principalmente de poli-hidroxilados (KIMURA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002, p. 390). Os carotenóides apresentam regiões de absorção muito próximas e isso pode influenciar quando são mensurados pelo método da absorvidade molar ou extinção molar. Se ocorrer uma contaminação de outro carotenóide na fração separada, pode ocorrer um falso doseamento do carotenóide desejado, pela proximidade dos valores de absorvidade. Muitos dos dados sobre carotenóides foram obtidos por meio de mensurações quantitativas contra curvas de  $\beta$ -caroteno; isso implica que extratos ricos em  $\beta$ -caroteno apresentem quantidades razoáveis de “carotenóides”, enquanto que extratos ricos em xantofilas não obtenham valores reais da sua quantidade carotenóidica (SCOTT, 1992, p. 358). Além disso, o critério de pureza por meio de cromatografia em camada delgada muitas vezes não revela exatamente o perfil carotenóidico da fração. O ideal é trabalhar com a amostra total em clae para a obtenção de uma composição carotenóidica fidedigna. Para uma melhor separação dos poli-hidroxilados, um método que pode se mostrar de grande valia seria o de eluição em gradiente, pois os poli-hidroxilados apresentam uma tendência muito grande de demonstrarem tempos de retenção muito próximos; um aumento somente da polaridade da fase móvel pode propiciar a cristalização de outros carotenóides da amostra, mais apolares, na coluna. Entretanto, há autores que consideram sistemas isocráticos mais “convenientemente” (SCOTT, 1992, p. 358).

Alguns autores afirmam que colunas do tipo  $C_{18}$  monoméricas com eluentes a base de metanol não apresentam boa resolução na separação de luteína com zeaxantina (o último é um possível carotenóide no fruto de *C. brasiliense*); o ideal seria trabalhar com colunas poliméricas para essa separação.

Geralmente, para a quantificação dos carotenóides, trabalha-se com curva de calibração ou com fator resposta relativo, utilizando o  $\beta$ -caroteno ou, em alguns trabalhos, a  $\beta$ -criptoxantina (HART; SCOTT, 1995, p.104; KIMURA, RODRIGUEZ-AMAYA, 2002, p. 394). Entretanto, percebeu-se que as respostas de área da luteína,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina (num determinado comprimento de onda) são bem diferentes para concentrações semelhantes. Isso implica que há erro se for utilizada uma curva de calibração de um carotenóide para quantificar outro.



## 5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

A concentração inibitória em percentual (IC %) dos extratos foi determinada perante a média da triplicata dos valores obtidos da absorbância (Tabela 26):

TABELA 26 – CONCENTRAÇÕES ([ ]), MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS E IC % DO EXTRATO CETÔNICO E DO ACETATO DE TOCOFEROL\*

Extrato cetônico			Acetato de tocoferol		
[ ] (mg/mL)	Média abs	IC %	[ ] (mg/mL)	Média abs	IC %
2	0,064	85,75	100	0,082	81,74
1,5	0,0607	86,49	50	0,0823	81,66
1	0,0885	80,29	25	0,056	87,52
0,7	0,1665	62,91	12,5	0,218	51,45
0,35	0,2943	34,45	6,25	0,335	25,39

\*valor de absorbância do controle em 518 nm: 0,449

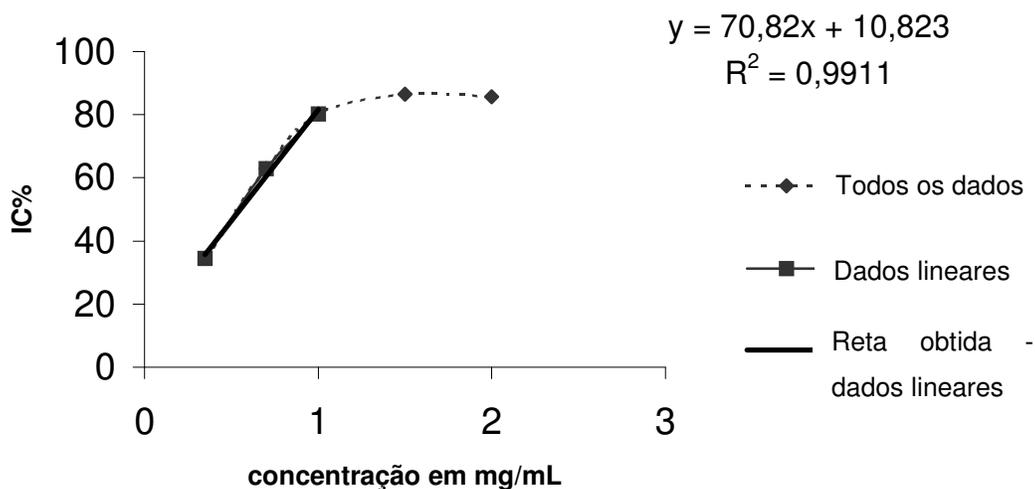
De posse dos dados de IC %, foi traçado um gráfico relacionando a concentração do extrato ou do acetato de tocoferol *versus* a IC % (Figura 59 e 60). A absorbância (A) é um valor derivado de uma função logarítmica da transmitância (T):

$$A = -\log T$$

Nesse caso, a medida de transmitância origina um gráfico polinomial; como o objetivo é determinar uma faixa linear de resposta, usa-se a medida de absorbância, para que ao se plotar dados de absorbância contra outros dados lineares (como concentração) num gráfico, a curva obtida seja exemplificada numa equação de 1º grau. Com base nessa conclusão, pode ocorrer que alguns dados de absorbância não pertençam a linearidade proposta, não sendo considerados para o cálculo proposto de IC 50 %.

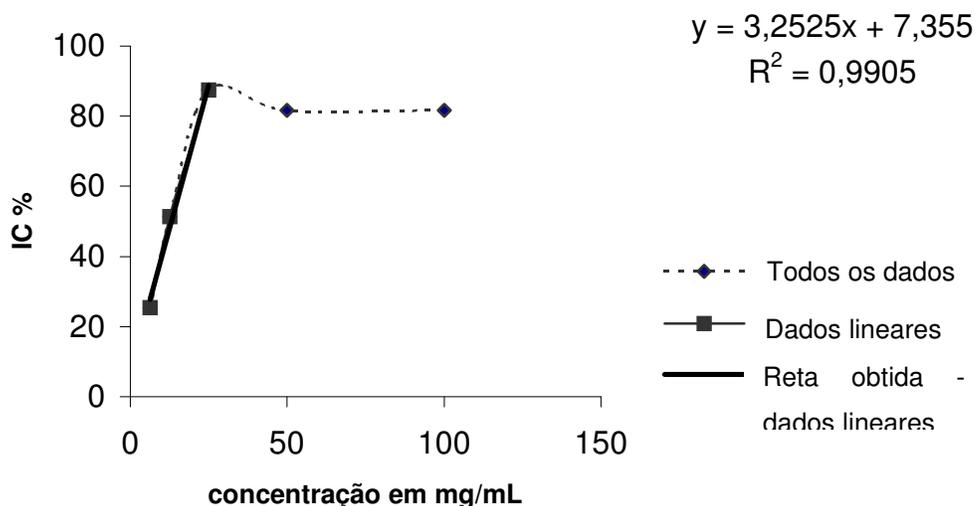
Nesse intervalo linear foi determinada a equação de reta de primeiro grau e, com isso, qual a concentração de extrato capaz de inibir metade da quantidade de DPPH no teste (IC 50 %).

FIGURA 59 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO EM mg/mL DE EXTRATO CETÔNICO DO MESOCARPO INTERNO MAIS ENDOCARPO *VERSUS* IC %



Como a equação de reta obtida com esses dados foi de  $y = 70,82x + 10,823$ , verificou-se que a concentração necessária de extrato cetônico para inibir 50 % da solução de DPPH a 0,3 mM é de 0,553 mg/mL.

FIGURA 60 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO EM mg/mL DE ACETATO DE TOCOFEROL *VERSUS* IC %



Como a equação de reta obtida com esses dados foi de  $y = 3,2525x + 7,355$ , verificou-se que a concentração necessária de acetato de tocoferol (grau cosmético de 96 a 102 %) para inibir 50 % da solução de DPPH a 0,3 mM é de 13,112 mg/mL.

Portanto, o extrato cetônico do mesocarpo interno mais endocarpo de frutos de *C. brasiliense*, na concentração de 0,553 mg/mL apresenta um potencial de inibição de 50 % de uma solução a 0,3 mM de DPPH nas condições utilizadas, contra uma IC 50 % de 13,112 mg/mL de acetato de tocoferol grau cosmético. Isso sugere que o extrato cetônico de frutos de *C. brasiliense* possa deter atividade antioxidante, provavelmente devido a presença de carotenóides, visto que alguns já apresentaram ação antioxidante (FOOTE; CHANG; DENNY, 1970, p. 5217; MATSUFUJI et al., 1998, p. 3468; MOURE et al., 2001, p. 147). Esse extrato pode vir a ser um possível antioxidante a ser usado como insumo em indústrias de alimentos, farmacêuticas e cosméticas. Para tal afirmação, levando-se em consideração o perfil de resposta antioxidante dos carotenóides, o ideal seria trabalhar com métodos *in vivo* ou que apresentassem os critérios para que não ocorresse a ação pró-oxidante.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

O extrato hidroalcolico do mesocarpo interno mais endocarpo do fruto mostrou a presença de heterosídeos flavônicos; já seu extrato aquoso indicou a presença de heterosídeos saponínicos, ácidos fixos, aminogrupos, taninos condensados e açúcares. O extrato hidroalcolico do exocarpo do fruto sugeriu a presença de esteróides e triterpenos, heterosídeos antraquinônicos, heterosídeos flavônicos; seu extrato aquoso indicou a presença de heterosídeos saponínicos, aminogrupos, taninos condensados e hidrolisáveis e açúcares do fruto. No teste de hemólise em placas de ágar sangue, a fração diclorometano, precipitado da partição diclorometano e o resíduo polar em metanol da casca, bem como o resíduo polar da amêndoa apresentaram uma acentuada hemólise no ágar sangue, sugerindo substâncias hemolíticas.

Não foi obtido óleo volátil do fruto por aparelho de Clevenger; não significando que não existam substâncias voláteis no mesmo.

A composição monossacarídica da amêndoa do fruto revelou ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose. Provavelmente essas unidades estão na forma de arabinoxilanas, arabinoglucanas e xiloglucanas.

Foram determinados do mesocarpo interno mais endocarpo por meio de clae os seguintes carotenóides: luteína (4,57  $\mu\text{g/g}$  fruto total),  $\beta$ -criptoxantina (2,26  $\mu\text{g/g}$  fruto total) e  $\beta$ -caroteno (0,702  $\mu\text{g/g}$  fruto total). Existe um potencial antioxidante no extrato cetônico do fruto de *C. brasiliense*, provavelmente devido a presença dos carotenóides.

## REFERÊNCIAS

ADIS, J.; KERR, W. E. Um trips como praga do piquiá. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 9, n. 4, p. 790, 1979.

ALENCAR, J. C.; MAGALHÃES, L. M. S. Poder germinativo de sementes de doze espécies florestais da região de Manaus. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 9, n. 3, p. 411-418, 1979.

ANGELY, J. **Dicionário de botânica**. Curitiba: Phytton, 1959. 2. ed. 408 p.

ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; AKIMOTO, A. K. Ocorrência de antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequizeiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 96-98, janeiro-fevereiro, 2002. Obtido via base de dados SCIELO BR. Data de acesso: 28/10/02. Online. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/fb/v27n1/8476.pdf>

ASPINALL, G. O. Structure chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York/London, v. 14, p. 429-469, 1959

BENDICH, A.; SHAPIRO, S. S. Effects of beta-carotene and canthoxanthin on the immune responses of the rat. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 116, p. 2254-2262, 1986.

BERTRAM, J. S.; BORTKIEWICZ, H. Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 62 (supl), p. 1327S-1336S, 1995. Abstract. Data de acesso: 29/10/02. Online. Disponível em [http://www.ajcn.org/cgi/content/abstract/62/6/1327S?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&searchid=1058989530141\\_5970&stored\\_search=&FIRSTIND EX=0&volume=62&firstpage=1327s&journalcode=ajcn](http://www.ajcn.org/cgi/content/abstract/62/6/1327S?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&searchid=1058989530141_5970&stored_search=&FIRSTIND EX=0&volume=62&firstpage=1327s&journalcode=ajcn)

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of the Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002. Obtido via base de dados Science Direct. Online. Data de acesso: 17/12/02. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6VSC-46FVDPG-H-1&\\_cdi=6259&\\_orig=browse&\\_coverDate=08%2F31%2F2002&\\_sk=999269994&view=c&wchp=dGLbVtz-ISzBS&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=cafb0519398b24e20 eaa848ce23be7fd&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6VSC-46FVDPG-H-1&_cdi=6259&_orig=browse&_coverDate=08%2F31%2F2002&_sk=999269994&view=c&wchp=dGLbVtz-ISzBS&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=cafb0519398b24e20 eaa848ce23be7fd&ie=f.pdf)

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpinaceae**. Dissertação de mestrado. Curitiba, UFPR, 2003. 104 p.

BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Are hemicelluloses from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms? **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 2, p. 127-136, 2003.

BORGES, R. Oleaginosas alimentícias da Amazônia. **Boletim do Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 89-94, 1944

BREITHAUPT, D. E.; BAMEDI, A. Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on  $\beta$ -cryptoxanthin esters. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 4, p. 2064-2070, 2001. Obtido via base de dados Pubs.ACS. Data de acesso: 17/04/03. Online. Disponível em <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/jafcau/2001/49/i04/pdf/jf001276t.pdf>

BRILLOUET, J. M.; CARRÉ, B. Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Glycine max*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 841-847, 1983.

BRITTON, G. Biosynthesis of carotenoids. In: GOODWIN, T. W. (ed.) **Plant pigments**. London: Academic Press, 1988, p. 133-182.

BROOKS, D. W. **Expt 050 – Precipitation Stoichiometry**. Revisado em 09/04/2003. Obtido via base de dados Yahoo.com. Online. Data de acesso: 08/08/03. Disponível em <http://chemmovies.unl.edu/chemistry/smallscale/SS050.html>

BUCHALA, A. J.; MEIER, H. An arabinogalactan from the fibres of cotton (*Gossypium arboreum* L.). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 137-143.

BUCKERIDGE, M. S.; VERGARA, C. E.; CARPITA, N. C. Insight into multi-side mechanisms of glycosyl transfer in (1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-glycans provided by the cereal mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-glucan synthase. **Phytochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1045-1053, 2001.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, Washington, v. 224, p. 569-573, 1984.

CAMPOS, F. A. M. Valor nutritivo de alguns óleos do Brasil. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 1-14, 1944.

CARNEIRO, E. B. B. **Polissacarídeos ácidos de *Chorisia speciosa* St- Hil. (Bombacaceae)**. Tese de doutorado. Curitiba, UFPR, 2000, 159 p.

CERQUEIRA, P. O. Óleo de pequiá. **Revista Alimentar**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 40, p. 16-17, 1943. **Chemical Abstracts**.

CHIMI, H.; CILLARD, J.; CILLARD, P.; RAHMANI, M. Peroxyl and hidroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 68, n. 5, p. 307-312, 1991.

CORRÊA, J. B. C. **Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos**. Curitiba, 1971, 62 p.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New Botanical Garden, 1988. p. 503-517.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995. 5. ed. p. 499.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. (ed.) **Chemistry and biochemistry of plants pigments**. London/New York/San Francisco: Academic Press, 1976, 2. ed. v. 2, p. 38–165.

DICKINSON, W. C. A study of the floral morphology and anatomy of the Caryocaraceae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 117, n. 2, p. 123-137, 1990.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350 –356, 1956.

ENGLER, A. **Syllabus der pflanzenfamilien** [S.l. s.n], 1964.

FERREIRA, P. C., MOTIDOME, M. Estudo químico do óleo de piquí. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo**. São Paulo: v. 19, n. 1, p. 25-30, 1962.

FONTANA, J. D., MENDES, S. V., PERSIKE, D. S., PERACETTA, L. F., PASSOS, M. Carotenóides. **Biociência**. Brasília: ano II, n. 13, p. 40-45, 2000.

FOOTE, C. S.; CHANG, Y. C.; DENNY, R. W.; Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 92, n. 17, p. 5216-5218, 1970.

FREISE, F. W. Some little known oil plants of Brazil. **Seitensieder-Zeitung**, v. 56, p. 319-321, 339-340, 1929. **Chemical Abstracts**

FREY-WYSSLING, BLANK, F. Knee-shaped crystals of oxalate from *Caryocar nuciferum* L. **Protoplasma**, New York, v. 31, p.194-198, 1938. **Chemical Abstracts**.

GANTER, J. L. M. S. **Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga)**. Dissertação de mestrado. Curitiba, UFPR, 1988, 135 p.

GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of *cis*-isomers of Provitamin A in Brazilian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 6, p. 1306-1313, 1994.

GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Buriti (*Mauritia vinifera* Mart.), uma fonte riquíssima de pró-vitamina A. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, n. 1, p. 109-120, 1995.

GOODWIN, T. W.; BRITTON, G. Distribution and analysis of carotenoids. In: GOODWIN, T. W. (ed.) **Plant pigments**. London: Academic Press, 1988, p. 61-132.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 128, p. 119-132, 1984

GUEDES, Z. B. L., ORIÁ, H. F. Valor nutritivo de frutos comestíveis do Ceará. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 7-12, p. 91-97, 1978.

HART, D. J.; SCOTT, K. J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 101-111, 1995. Obtido via base de dados Science Direct. Online. Data de acesso: 23/09/03. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=Mimg&\\_imagekey=B6T6R-3YYT6GC-28-1&\\_cdi=5037&\\_orig=browse&\\_coverDate=12%2F31%2F1995&\\_sk=999459998&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWz&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=3735e776ac62ad69d4b5d595774fb23c&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Mimg&_imagekey=B6T6R-3YYT6GC-28-1&_cdi=5037&_orig=browse&_coverDate=12%2F31%2F1995&_sk=999459998&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWz&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=3735e776ac62ad69d4b5d595774fb23c&ie=f.pdf)

HIANE, P. A.; RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; BARROCAS, G. E. G. Teores de minerais de alguns frutos do estado de Mato Grosso do Sul. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 208-214, 1992.

IOSET, J.R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. A methylflavan with free radical scavenging properties from *Pancratium littorale*. **Fitoterapia**, Milan, v. 72, n. 1, p. 35-39, 2001. Obtido via base de dados Science Direct. Online. Data de acesso: 17/12/02. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=Mimg&\\_imagekey=B6VSC-423Y6B1-6-5&\\_cdi=6259&\\_orig=browse&\\_coverDate=01%2F31%2F2001&\\_sk=999279998&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWb&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=13e4272f078302de98e26bc9f159a1cb&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Mimg&_imagekey=B6VSC-423Y6B1-6-5&_cdi=6259&_orig=browse&_coverDate=01%2F31%2F2001&_sk=999279998&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWb&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=13e4272f078302de98e26bc9f159a1cb&ie=f.pdf)

JIMÉNEZ, G.; HASEGAWA, M.; RODRIGUEZ, M.; ESTRADA, O.; MÉNDEZ, J.; CASTILLO, A.; GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; VÁSQUEZ, J. ROMERO-VECCHIONE, E. Biological Screening of plants of the Venezuelan Amazons. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 77, n. 1, p. 77-83, 2001. Obtido via base de dados Science Direct. Data de acesso: 14/08/02. Online. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=Mimg&\\_imagekey=B6T8D-43KGST4-D-4&\\_cdi=5084&\\_orig=browse&\\_coverDate=09%2F30%2F2001&\\_sk=999229998&view=c&wchp=dGLbVzz-ISztz&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=e9da8d01bb17bb1d430125ad28bf2051&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Mimg&_imagekey=B6T8D-43KGST4-D-4&_cdi=5084&_orig=browse&_coverDate=09%2F30%2F2001&_sk=999229998&view=c&wchp=dGLbVzz-ISztz&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=e9da8d01bb17bb1d430125ad28bf2051&ie=f.pdf)

JOLY, A. B. **Botânica – introdução à taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1985. p. 324-329.

KAWANISHI, K., RAFFAUF, R. F. *Caryocar microcarpum*: an ant repellent and fish poison of the northwestern Amazon. **Journal of Natural Products**, Columbus/Glendale, v. 49, n. 6, p. 1167-1168, 1986.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 389-398, 2002. Obtido via base de dados Science Direct. Data de acesso: 27/11/02. Online. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=Mimg&\\_imagekey=B6T6R-464XYCR-2-F&\\_cdi=5037&\\_orig=browse&\\_coverDate=08%2F31%2F2002&\\_sk=999219996&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzS&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=f3b4dcca875b2962fb5296cb8b94db56&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Mimg&_imagekey=B6T6R-464XYCR-2-F&_cdi=5037&_orig=browse&_coverDate=08%2F31%2F2002&_sk=999219996&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzS&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=f3b4dcca875b2962fb5296cb8b94db56&ie=f.pdf)

KNEKT P.; HELIOVAARA, M.; RISSANEN, A.; AROMAA, A.; AARAN, R. K. Serum antioxidant vitamins and risk of cataract. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 305, n. 5, p. 1392-1394, 1992. Abstract. Obtido via base de dados PubMed. Data de acesso: 16/05/03. Online. Disponível em [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=1486302&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1486302&dopt=Abstract)

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 5, p. 1948-1955, 1999. Obtido via base de dados Pubs.ACS. Data de acesso: 18/02/03. Online. Disponível em <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/jafcau/1999/47/i05/pdf/jf981029d.pdf>

LABOURIAU, L. G.; VÁLIO, I. F. M.; HERINGER, E. P. Sobre o sistema reprodutivo de plantas dos cerrados – I. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 449-463, 1964.

LABOURIAU, L. G.; VÁLIO, I. F. M.; LABOURIAU, M. L. S.; HANDRO, W. Nota sobre a germinação de sementes de plantas de cerrados em condições naturais. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 227-237, 1963.

LIAAEN-JENSEN, S.; JENSEN, A. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. **Methods in Enzimology**, New York/London, v. 23, part A, p. 586- 602, 1971.

LIMA, M. T.; MAIA, G. A.; GUEDES, Z. B. L.; ORIÁ, H. F. Composição de ácidos graxos da fração lipídica do piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm). **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 12, n. 1/2, p. 93-96, 1981.

LU, Y.; FOO, L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 197-202, 2001. Obtido via base de dados Science Direct. Data de acesso: 12/11/02. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=Mimg&\\_imagekey=B6T6R-443JW42-9-5&\\_cdi=5037&\\_orig=browse&\\_coverDate=11%2F30%2F2001&\\_sk=999249997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzk&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=1d698690eb36e888a68f572759e4d542&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Mimg&_imagekey=B6T6R-443JW42-9-5&_cdi=5037&_orig=browse&_coverDate=11%2F30%2F2001&_sk=999249997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzk&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=1d698690eb36e888a68f572759e4d542&ie=f.pdf)

MAGALHÃES, H. G.; MONTEIRO NETO, H.; LAGROTA, M. H.; WIGG, M. D.; GUIMARÃES, L. A. S.; LOJA, M. A. S. O.; ARAÚJO, R. R. Estudo estrutural do pequizeiro *Caryocar brasiliense* Camb. Caryocaraceae, sob o aspecto farmacológico e botânico. **Revista Brasileira de Farmácia**. Rio de Janeiro, v. 69, n. 1-3, p. 31-41, 1988.

MANKARIOS, A. T.; JONES, C. F. G.; JARVIS, M. C.; THRELFALL, D. R.; FRIEND, J. Hydrolysis of plant polysaccharides and GLC analysis of their constituent neutral sugars. **Phytochemistry**, v. 18, n. 3, p. 419-422, 1971.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1995. 374 p.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARQUES, M. C. S. **Estudo fitoquímico e biológico dos extratos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Lavras, 2001. 91 p. Dissertação.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIRO, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 686-689, 2000.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J.G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A.**, Berlin, v. 204, n. 6, p. 442-444, 1997.

MATSUFUJI, H.; NAKAMURA, H.; CHINO, M.; TAKEDA, M. Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 9, p. 3468, 1998. Obtido via base de dados Pubs.ACS. Data de acesso: 18/02/03. Online. Disponível em <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/jafcau/1998/46/i09/pdf/jf980200i.pdf>

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988. p. 31-65.

MEARA, M. L. Configuration of naturally occurring mixed glycerides III. The configuration of the major component glycerides of piqui-a fruit-coat fat. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 39, p.773-775, 1947. **Chemical Abstracts**.

MEDEIROS, R. A.; HARIDASAN, M. Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminium accumulating and non-accumulating species of the cerrado region of central Brasil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 88, p. 433-436, 1985.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid Composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 39, n. 6, p.1094-1097, 1991. Obtido via base de dados Pubs.ACS. Data de acesso: 10/02/03. Online. Disponível em <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/jafcau/1991/39/i06/pdf/jf6a018.pdf>

MORRALL, P.; BRIGGS, D. E. Changes in cell wall polysaccharides of germinating barley grains. **Phytochemistry**, v. 17, n. 9, p. 1495-1502, 1978.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001. obtido via base de dados Science Direct. Data de acesso 12/11/02. Online. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6T6R-41Y2840-2-7&\\_cdi=5037&\\_orig=browse&\\_coverDate=02%2F28%2F2001&\\_sk=999279997&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=97a340437ebab0dfa31babbc0e5311d6&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T6R-41Y2840-2-7&_cdi=5037&_orig=browse&_coverDate=02%2F28%2F2001&_sk=999279997&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=97a340437ebab0dfa31babbc0e5311d6&ie=f.pdf)

NAKASHIMA, T.; PEREZ, E. Fotos. Curitiba, março de 2002.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000, 2. ed., p. 11-24.

NOMURA, A. M. Y.; STERMMERMANN, G. N.; HEILBRUN, L. K.; SALKELD, R. M. VUILLEUNIER, J. P. Serum vitamin levels and the risk of cancer of specific sites in men of Japanese ancestry in Hawaii. **Cancer Research**, Baltimore, v. 45, n. 5, p. 2369-2372, 1985. Abstract. Obtido via base de dados AACR Journals. Data de acesso: 02/06/03. Online. Disponível em [http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/45/5/2369?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&searchid=1058983861448\\_4034&stored\\_search=&FIRSTINDEX=0&volume=45&firstpage=2369&journalcode=canres](http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/45/5/2369?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&searchid=1058983861448_4034&stored_search=&FIRSTINDEX=0&volume=45&firstpage=2369&journalcode=canres)

OFFICIAL Methods of Analysis of AOAC International. HORWITZ, W. (ed.) v. 2. Cap. 45. Gaithersburg: AOAC International, 2000, p. 5-6.

OKAZAKI, A. **Análise dos carboidratos e compostos fenólicos em sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (maracujá)**. Dissertação de mestrado. Curitiba, UFPR, 1999. 95 p.

OLCOVICH, H. S.; MATTILL, H. A. The unsaponifiable lipids of lettuce. I. Carotene. **The Journal of the Biological Chemistry**, n. 91, p. 105-117, 1931.

OLIVEIRA, M. M.; GILBERT, B.; MORS, W. B. Triterpenes in *Caryocar brasiliense*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 451, 1968. **Chemical Abstracts**.

OLIVEIRA, M. M.; SAMPAIO, R. P.; GIORGI, W.; GILBERT, B.; MORS, W. *Caryocar brasiliense* – isolamento e identificação de algumas substâncias: atividade biológica sobre o sarcoma 180. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 37, supl. 1, p. 25-27, 1970.

OLIVEIRA, P. S.; PIE, M. R. Interaction between ants and plants bearing extrafloral nectaries in cerrado vegetation. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p.161-176, 1998.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. **Methods in enzymology**. New York, v. 213, Lester: Academic Press, 1992.

PAULA JR, W. Fotos. Montes Claros, MG, abril de 2002.

PECHNIK, E., GUIMARÃES, L. R. Alguns representantes do reino vegetal portadores do elevado potencial provitamínico A. **Arquivos Brasileiros de Nutrição**, Rio de Janeiro, v. 13, n.1, p. 9-19, 1957.

PETO, R.; DOLL, R.; BUCKLEY, J. D; SPORN, M. B. Can dietary beta carotene materially reduce human cancer rates? **Nature**, London, v. 290, n. 5803 p. 201-208, 1981.

PHILIP, T. The nature of carotenoid esterification in citrus fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 21, n. 6, p. 964-966, 1973. Obtido via base de dados Pubs.ACS. Data de acesso: 11/04/03. Online. Disponível em <http://pubs.acs.org/cgi-bin/archive.cgi/jafcau/1973/21/i06/pdf/jf60190a035.pdf>

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas** (com a colaboração de Leonan de Azeredo Penna). Ministério da Agricultura: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 5, p. 500.

PRANCE, G. T. The genus *Caryocar* L. (Caryocaraceae): an underexploited tropical resource. **Advances in Economic Botany**, Bronx, v. 8, p. 177-188, 1990.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985, v.1 ; p 21- 25; 59.

RAMOS, M. I. L.; UMAKI, M. C. S.; HIANE, P. A.; RAMOS FILHO, M. M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 23-32, 2001.

RECHIA, C. G. V. **Estudo de polissacarídeos de sementes de *Senna multijuga***. Dissertação de mestrado. Curitiba, 1992, 137 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Latin american food sources of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas. V. 49, n. 1-S, p. 74-S – 84-S, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI, 2001, 62 p. Online. Data de acesso: 25/11/03. Disponível em <http://hni.ilsa.org/file/carotenoid.pdf>

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Brazil: a bounty of carotenoid sources. **Sight and Life Newsletter**, v. 2, p. 3-9, 2002. Online. Data de acesso: 26/07/03. Disponível em <http://sightandlife.org/sightandlife/Nlall/NLpdf/nl2002-4col.pdf>

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. Carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 9, n. 2, p. 148 –162, 1989.

RODRIGUEZ, D. B.; RAYMUNDO, L. C.; LEE, T.C.; SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, London, v. 40, n. 167, p. 615-624, 1976.

SALES, F. J. M. O óleo do fruto do piquizeiro, *Caryocar coriaceum* Wittm. **Turrialba**, Costa Rica, v.23, n. 1, p. 108-109, 1973.

SANTIAGO, F. M. **Estudo das propriedades lectínicas, tóxicas e hemolíticas do fruto de *Caryocar brasiliensis***. Uberlândia, MG, 1998. Monografia em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia.

SCOTT, K. J.; Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. **Food Chemistry**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 357-364, 1992. Obtido via base de dados Science Direct. Online. Data de acesso: 10/08/03. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6T6R-49NR1JT-26T-1&\\_cdi=5037&\\_orig=browse&\\_coverDate=12%2F31%2F1992&\\_sk=999549994&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzk&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=d3a2ac398c8582f47ee8d05fa77936fa&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T6R-49NR1JT-26T-1&_cdi=5037&_orig=browse&_coverDate=12%2F31%2F1992&_sk=999549994&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzk&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=d3a2ac398c8582f47ee8d05fa77936fa&ie=f.pdf)

SEDDON, J. M.; AJANI, U. A.; SPERDUTO, R. D.; HILLER, R.; BLAIR, N.; BURTON, T. C.; FARBER, M. D.; GRAGOUDAS, E. S.; HALLER, J.; MILLER, D. T.; Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 272, n. 18, novembro de 1994. Abstract. Obtido via base de dados PubMed. Data de acesso: 16/05/03. Online. Disponível em <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/272/18/1413>

SEGALL, S. D.; ARTZ, W. E, TAKAHASHI, J. A.; RASLAN, D. S.; FERRAZ, V. The fatty acid and triacylglycerol composition of pequi (*Caryocar brasiliensis*) oil. **2002 Annual Meeting Abstracts**, p. S18-S19, 2002 may 5 – 8; Montreal: 93 rd AOCS Annual Meeting & Expo. Abstract. Obtido via base de dados SCIRUS.COM. Data de acesso:12/07/03. Online. Disponível em <http://www.aocs.org/archives/am02abstracts.pdf>

SHANLEY, P.; GAIA, G. R. Equitable ecology: collaborative learning for local benefit in Amazonia. **Agricultural Systems**, Essex, v. 73, n. 1, p. 83-97, julho de 2002. Obtido via base de dados Science Direct. Data de acesso: 29/10/02. Online. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6T3W-45SR3SD-5-7&\\_cdi=4957&\\_orig=browse&\\_coverDate=07%2F31%2F2002&\\_sk=999269998&view=c&wchp=dGLbVlz-lSztz&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_userid=10&md5=3a9183dba3ac448e5f9b2dedc2acd5fb&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T3W-45SR3SD-5-7&_cdi=4957&_orig=browse&_coverDate=07%2F31%2F2002&_sk=999269998&view=c&wchp=dGLbVlz-lSztz&_acct=C000050221&_version=1&_userid=10&md5=3a9183dba3ac448e5f9b2dedc2acd5fb&ie=f.pdf)

SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SILVA, J. A.; PEREIRA, A. V.; SALVIANO, A.; JUNQUEIRA, G. D. Avaliação do potencial de produção do “pequizeiro-anão” sob condições naturais na região sul do estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 726-729, dezembro, 2001. Obtido via base de dados Scielo BR. Data de acesso: 28/10/02. Online. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v23n3/8060.pdf>

SMITH, N. J. H.; FALES, I. C.; ALVIM, P. T.; SERRÃO, E. A. S. Agroforestry trajectories among smallholders in the Brazilian Amazon: innovation and resiliency in pioneer and older settled areas. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 15-27, 1996. Obtido via base de dados Science Direct. Data de acesso: 23/09/02. Online. Disponível em [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=Mimg&\\_imagekey=B6VDY-3VW7XN5-31&\\_cdi=5995&\\_orig=search&\\_coverDate=07%2F31%2F1996&\\_qd=1&\\_sk=999819998&wchp=dGLbVlbISztA&\\_acct=C000037779&\\_version=1&\\_userid=687303&md5=d78795a04ee2ae53235f0481edeb2697&ie=f.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Mimg&_imagekey=B6VDY-3VW7XN5-31&_cdi=5995&_orig=search&_coverDate=07%2F31%2F1996&_qd=1&_sk=999819998&wchp=dGLbVlbISztA&_acct=C000037779&_version=1&_userid=687303&md5=d78795a04ee2ae53235f0481edeb2697&ie=f.pdf)

SOARES, M. C.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F. Estratégias para a síntese de desoxinucleosídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 206-219, 2001.

SOAVE, R. C. F.; SILVA, O. A. Aspectos fenológicos e variação dos conteúdos das clorofilas *a* e *b* em *Caryocar brasiliense* Camb. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 57-69, 1993.

TERAO, J. Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. **Lipids**, Champaign, v. 24, n. 7, p. 659-661, 1989.

TOLEDO, A. C.; GRAÇA, C.; ANDRADE, C. A.; PEREZ, E. **Mapa metabólico vegetal**. Trabalho apresentado em disciplina. UFPR: Curitiba, 2002. 8 banners.

VASKOVSKY, V. E.; KOSTETSKY, E. Y. Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 9, p. 396, 1968.

VASTANO JR, B.; BARBOSA, A. P. Propagação vegetativa do piquiá (*Caryocar villosum* Pers.) por estaquia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 13, n. 1, p. 143-148, 1983.

VIEIRA, R. F., MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 3, n.1, p.13-36, 2000.

VON POSER, G. L. Polissacarídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000, 2. ed., p. 11-24.

WHISTLER, R. L.; FEATHER, M. S. Hemicellulose - extraction from annual plants with alkaline solutions. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York/London, v. 5, p. 144-145, 1965.

WOLFRON, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Research**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WOLFRON, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York/London, v. 2, p. 211-215, 1963b.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001 p. 51, 53, 55.