

INTRODUÇÃO

O estudo de plantas medicinais é uma área de pesquisa que apresenta um grande volume de trabalhos, apesar de ainda existir um vasto número de plantas cuja composição química que permanece sem investigação. O Brasil inclui-se entre os países de maior biodiversidade mundial abrigoando cerca de 50 mil espécies de plantas superiores, distribuídas em grandes biomas, aparecendo a Amazônia com 25-30 mil espécies (IUCN, 1986), a Mata Atlântica com 16 mil (MENDONÇA *et al.*, 1998) (SKORUPA & VIEIRA, 2002) e as demais espécies distribuídas na Caatinga, Pampa, Pantanal e Cerrado. Entretanto, apesar do grande número estimado de espécies vegetais existentes, apenas uma pequena parcela tem sido pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial de produção de fármacos.

Anacardiaceae é uma família botânica que pertence ao reino Plantae, divisão das Angiospermae, classe Dicotyledoneae, subclasse Rosidae, ordem Sapindales. É constituída por cerca de 70 gêneros e 600 espécies sendo que 13 gêneros e 68 espécies ocorrem no Brasil. A família é subdividida em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).

A distribuição das espécies da família Anacardiaceae ocorre em uma extensa área global, sendo principalmente encontrada em regiões tropicais e subtropicais com algumas espécies podendo também ser encontradas em regiões temperadas (SILVA, CHINALIA & PAIVA, 2008).

No Brasil, várias espécies de Anacardiaceae são conhecidas por serem plantas frutíferas com valor econômico tais como: *Schinus terebinthifolius* Raddi, pimenta rosa (3) brasileira usada como condimento; *Mangifera indica* L. (manga) (1), *Anacardium occidentale* L. (caju) (2), *Pistacia vera* L. (pistache), *Spondias cytherea* Sonn. (cajarana) *S. mombim* L. (cajã) *S. purpurea* L. (ciriguela) e *S. tuberosa* Arr. Cam. (umbu), cujos frutos são usados no país como frutas comestíveis ou na fabricação de outros alimentos; *Astronium fraxinifolium* Schott (Gonçalo Alves), *A. lecointei* Ducke, (muiraquatiara); *A. urundeuva* Engl., aroeira; *Schinopsis brasiliensis* Engl., baraúna por produzirem boa madeira (NADIA *et al.*, 2007).

Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos por possuírem espécies reconhecidas como tóxicas e causadoras de dermatite de contato severa.

De modo geral, as espécies tóxicas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeeae e Semecarpeae (CORREIA *et al.*, 2008). A dermatite de contato provocada por algumas espécies dessa família é atribuída principalmente a compostos alquilfenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominados lipídios fenólicos. Estas substâncias podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal, ocorrendo principalmente em espécies do gênero *Rhus*. Nos últimos anos, a origem dos lipídios fenólicos e derivados também foi objeto de investigação; além disso, espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras nas buscas de substâncias bioativas (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).



Figura 1 Espécies da família Anacardiaceae.

Fonte: revistagloborural.globo.com; aryansantosaryel.blogspot.com; wildlifeofhawaii.com

1 GÊNERO *SPONDIAS*

Um gênero da família Anacardiaceae que merece destaque é o gênero *Spondias* por constituir de árvores frutíferas tropicais e exploradas pelo seu valor comercial. Esse gênero é composto por 18 espécies, sendo que algumas dessas espécies ocorrem no Nordeste (MITCHELL & DALY, 1995).

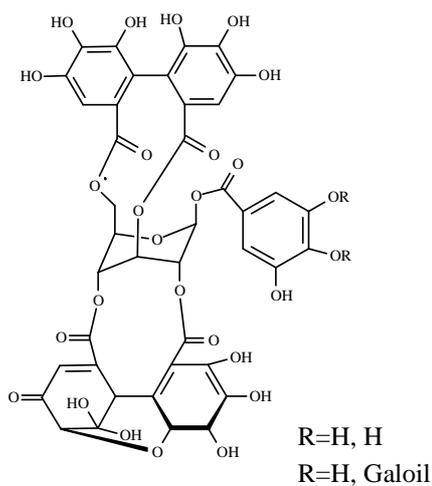
No Nordeste brasileiro, destacam-se as espécies: *Spondias mombin* L. (cajazeira), *Spondias purpurea* L. (cirigueleira), *Spondias cytherea* Sonn. (cajaraneira), *Spondias tuberosa* Arr. Cam. (umbuzeiro) e *Spondias spp.* (umbucajazeira). Todas são árvores frutíferas tropicais largamente exploradas através do extrativismo, como a cajazeira e o umbuzeiro, ou em pomares domésticos como a cajaraneira, a cirigueleira e a umbucajazeira. Estas espécies são plantadas em domesticação que produzem frutos de boa aparência, qualidade nutritiva, aroma e sabor agradáveis, os quais são muito apreciados para o consumo como fruta fresca

ou na forma processada como polpa, sucos, doces, néctares, picolés e sorvetes (MARTINS, S.T. & MELO, B).

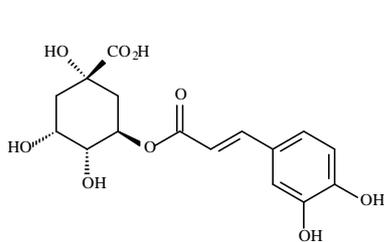
A espécie *Spondias mombin* L. tem se destacado bastante na medicina tradicional de alguns países. A decocção de frutos é usada como um diurético e febrífugo, a decocção das cascas e das folhas podem ser usadas como um emético e contra disenteria, hemorroidas, bem como utilizado para a gonorréia e leucorreia. Extrato das folhas e caules tem fornecido propriedades antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica e antiviral. Chás das flores e das folhas são utilizados pela população para aliviar a dor de estômago, várias condições inflamatórias e curas da ferida. Além disso, tem sido demonstrado que o extrato etanólico e metanólico das folhas e caules possuem derivados fenólicos com propriedades antioxidantes e anti-herpes, os quais tem sido formulados para uso no Brasil (AYOKA, 2006).

Estudos anteriores realizado com a espécie *Spondias mombin* L. revelaram que foram isoladas novas substâncias com diferentes atividades biológicas. Por exemplo, foram obtidos das folhas e caules de *S. mombin* L., por meio de um ensaio biomonitorado, dois taninos elágicos (Geranina, galoi-geranina) e dois ésteres derivados do ácido caféicos (ácido 2-O-cafeoil-(+)-allohidroxicítrico e o éster butílico do ácido clorogênico), além do ácido clorogênico, que mostraram acentuada atividade antiviral contra os vírus *Coxsackie* e *Herpes simplex* (CORTHOUT, 1991; CORTHOUT, 1992). Além destes foi isolado das folhas, utilizada na medicina tradicional devido às suas atividades antimicrobianas, uma série de ácidos 6-alquenil-salicílico do extrato etanólico das folhas e caules de *S. mombin* L. (Anacardiaceae). Estes ácidos fenólicos apresentaram pronunciado efeito antibacteriano e moluscicida (CORTHOUT, 1994). Em outro estudo relatou o ácido 6-(8'Z,11'Z,14'Z-heptadecatrienil)-salicílico, um derivado do ácido anacárdico, que foi isolado do extrato hexânico das folhas e ramos da planta e apresentou propriedades inibidoras de beta-lactamases (COATES, 1994) (Figura 2) .

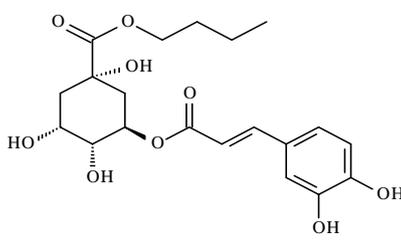
O fruto do cajá-umbu (*Spondias spp.*) apresenta teores elevados de vitamina C e glicídios. Investigações fitoquímicas realizadas na polpa do fruto indicaram o cajá-umbuzeiro como fonte natural de antioxidantes, sendo isolados a partir do extrato acetato, os constituintes furfural e alfa/beta-D-glicose. O furfural apresentou atividade antioxidante moderada (ALMEIDA, 2000).



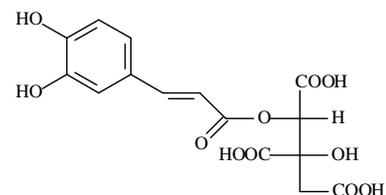
Geranina e galoil-geranina



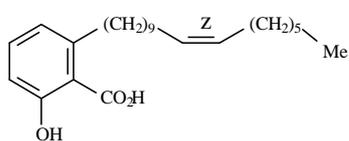
Ácido clorogênico



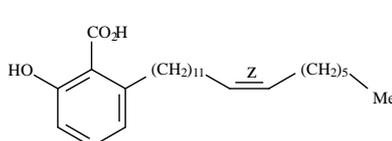
Éster butílico do ácido clorogênico



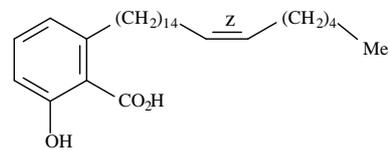
Ácido 2-O-caffeoil-(+)-allohidroxicitrico



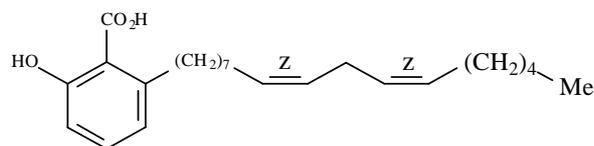
Ácido 6-(10'Z-heptadecenil)-salicílico



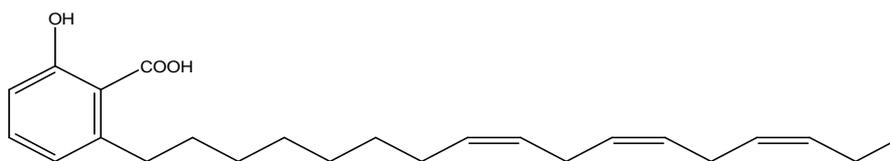
Ácido 6-(12'Z-nonadecenil)-salicílico



Ácido 6-(15' Z-heneicosenil)salicílico



Ácido 6-(8' Z, 11' Z-heptadecadienil)-salicílico



Ácido 6-(8' Z, 11' Z, 14' Z, -heptadecadienil)-salicílico

Figura 2 Constituintes químicos de *Spondias mombin* L..

1.1 ESPÉCIE *SPONDIAS TUBEROSA*

Spondias tuberosa é endêmica do semi-árido brasileiro, ocorrendo desde o Piauí até o Norte de Minas Gerais. Conhecida popularmente como umbuzeiro, ambuzeiro ou imbuzeiro, apresenta muitas utilidades econômicas, sendo seu fruto comercializado *in natura* ou em forma de polpa. Pode ser cultivada em larga escala, tanto para a alimentação humana, quanto para suplementação alimentar de animais. Suas raízes e folhas também podem ser utilizadas como alimento, e a água armazenada nas raízes é utilizada na medicina popular (NADIA *et al*, 2007).

O consumo de frutos e produtos que apresentam em sua composição substâncias com atividade antioxidante, a exemplo dos carotenóides, vitamina C e flavonóides, que os caracterizam como alimentos funcionais (LIMA, 2000). Há relatos que o fruto do umbuzeiro possuem de 9,61mg.100g⁻¹ a 31,26mg.100g⁻¹ de vitamina C, além de carotenoides e compostos fenólicos. Estes fitoquímicos, com reconhecida propriedade antioxidante, atuam retardando a velocidade da reação de oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais, e estão relacionadas à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, o umbu ainda não está devidamente caracterizado no que se refere aos parâmetros químicos e, em especial, ao seu potencial antioxidante (MELO & ANDRADE, 2010).

O umbuzeiro é utilizado pelo sertanejo como uma das principais fontes econômica e alimentar durante seu período de frutificação. Além disso, seus frutos apresentam boas características para industrialização na forma de sucos, néctares e geléias. Alguns autores ainda a atribuem certas propriedades medicinais, como a utilização da casca e xilopódios para o controle de diarréias, verminoses e escorbuto. Além disso, algumas pessoas utilizam o líquido extraído do xilopódios no tratamento do mal de Chagas (SILVA *et al.*, 2008).

As características físicas e químicas dos frutos são de grande importância para sua comercialização e manuseio. A aparência externa dos frutos, tais como, tamanho, consistência, espessura, forma e coloração da casca são fatores importantes para a aceitabilidade pelos consumidores. O fruto do umbuzeiro apresenta casca amarelo esverdeada e polpa branco-esverdeada, pesando cerca de 15g, distribuído em epicarpo (12,80%), mesocarpo (76,80%) e endocarpo (10,40%),

e o tamanho do fruto pode variar de 2,85 a 4,96 cm de comprimento e 2,64 a 4,91 cm de largura. Para a caracterização química, a acidez e os sólidos solúveis são as variáveis que mais interessam à indústria de processamento de frutos. O teor de sólidos solúveis totais, expresso em °Brix, é uma medida indireta do teor de açúcares do fruto. O umbu possui pH ácido (2,45) e razoável teor de sólidos solúveis totais (10,0 °Brix) (COSTA *et al.*, 2004).

Castro *et al.* (1947), analisando a potencialidade dos produtos provenientes da flora nativa dos sertões do Nordeste, afirmaram que tanto o fruto como a raiz do imbuzeiro são ricos em vitamina C (ácido ascórbico) e sais minerais (CAVALCANTI *et al.*, 2000).

No entanto, pouco se sabe sobre a composição da semente que contém óleo, proteína e alguns minerais e deve ser melhor investigada com o objetivo de fazer uso desta matéria-prima, que normalmente é descartada, para enriquecer alimentos ou como uma fonte de óleo comestível, proporcionando, assim, uma alternativa de renda para os pequenos agricultores e contribuindo para o desenvolvimento agroindustrial da região Nordeste, bem como a redução poluição ambiental (VILELA *et al.*, 2007).

Na literatura foi encontrado apenas um relato sobre a composição química das sementes do umbu. Desta forma, foram realizadas análises físicas e químicas das sementes de duas cultivares em dois estádios de maturação e seus perfis de ácidos graxos e minerais determinado. Os resultados não mostraram diferenças entre as sementes analisadas. O rendimento foi de cerca de 10% e as dimensões da seguinte forma: comprimento 1,48-2,11 cm e largura 0,76-1,16 cm. O teor médio de lipídios foi de 55%, dos quais 69% foram insaturados e o teor médio de proteína foi de 24%. As sementes foram uma boa fonte dos seguintes minerais: P, K, Mg, Fe e Cu. Os resultados totais indicaram que o óleo das sementes pode ser utilizado para produtos alimentícios visto que não foram encontrados agentes tóxicos (BORGES *et al.*, 2007).

1.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *SPONDIAS TUBEROSA*

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta

- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Sapindales
- Família: Anacardiaceae
- Gênero: Spondias
- Espécie: *Spondias tuberosa* Arr. Cam.

1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *S. TUBEROSA*

O umbuzeiro pode alcançar mais de 7 m de altura com copa medindo até 22 m de diâmetro. O tronco é atrofiado e retorcido com diâmetro de 0,3 a 1,4 m. As flores são brancas, agrupadas, perfumadas, com néctar, que é retirado pelas abelhas para se alimentarem. Os frutos são arredondados, de casca lisa ou com pêlos, com peso variando de 5,5 a 13 g, sendo que deste peso 22% é constituído por casca, 68% de polpa e 10% pelo caroço. As raízes são compostas de órgãos de reservas denominados xilopódios, túberas ou "batata" (BARRETO L. S & CASTRO M. S., 2010).

Considerando que uma planta adulta produz em média 15 mil frutos por ano, a produção de um umbuzeiro alcança, em média, 300 kg de frutos/safra (BARRETO L. S & CASTRO M. S., 2010).

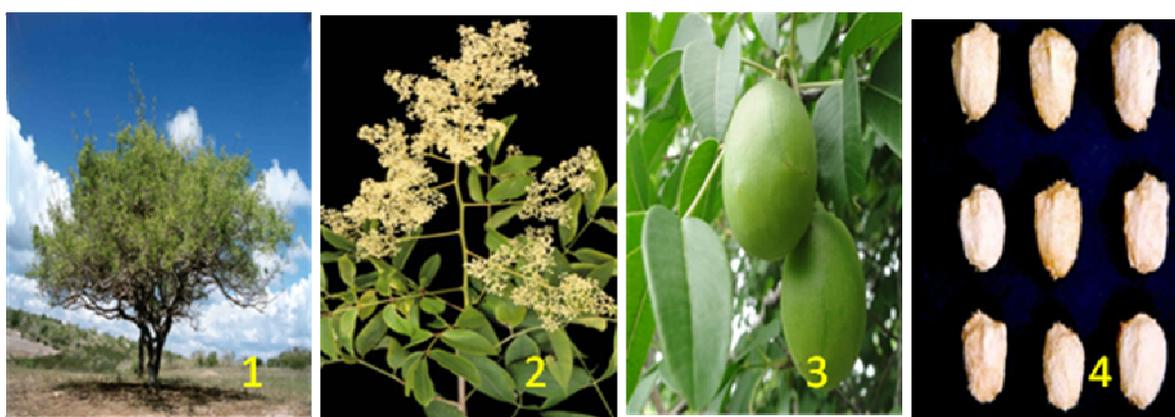


Figura 3 Espécie *Spondias tuberosa* (1- Árvore, 2- Flores, 3- Fruto e 4- Sementes).

Fonte: www.colecionandofrutas.org; www.cnip.org.br

Vale ressaltar que não existem relatos na literatura sobre estudo fitoquímico das sementes do umbu sendo estas muitas vezes, descartadas visto que poderiam ser utilizadas como aproveitamento de resíduos industriais afim de minimizar o desperdício de alimentos tornando-se benéfica ao homem e ao meio ambiente. Assim torna-se necessário realizar estudos químicos mais aprofundados da espécie *Spondias tuberosas*.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho consistiu em realizar o estudo químico e avaliar as atividades biológicas dos extratos, fases e substâncias puras das sementes da espécie *S. tuberoso*, da família Anacardiaceae.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um estudo químico das sementes da espécie *S. tuberosa*, coletada no Estado da Bahia;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos das sementes de *S. tuberosa*, através do teste com o radical estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e teste de inibição da auto-oxidação do β -caroteno;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos das sementes de *S. tuberosa*, através do bioensaio de letalidade em *Artemia salina*;
- Determinar as estruturas das substâncias através de métodos espectroscópicos;
- Identificar substâncias responsáveis pelas atividades demonstradas nos testes biológicos realizados nos extratos.

3 EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Para moagem das sementes de *Spondias tuberosa* foi utilizado moinho de facas Thomas Wiley Laboratory Mill-Model4.

As colunas cromatográficas (CC) empregadas para isolamento dos constituintes químicos foram escolhidas com base na massa das amostras a ser submetida ao processo de separação. Para as CC em adsorção em sílica gel foram utilizadas sílica gel 60 (63-200 μm) e sílica gel Flash (40-63 μm) ambas de procedência da Acros Organics. Para CC em permeação em gel utilizou-se Sephadex LH-20 da marca Pharmacia. Todas as frações obtidas das CC realizadas, tanto da fase clorofórmica quanto da fase acetato de etila das sementes de *Spondias tuberosa* Arr. Cam., foram coletadas em balões de 250 mL, com exceção das frações coletadas das colunas em Sephadex, que foram utilizados frascos de vidro com aproximadamente 10 mL. Todas as frações foram monitoradas por CCDC, agrupadas quando necessário (ex. semelhança de Rf) e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo, transferidas para recipientes previamente tarados.

Nas CCDC foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F254 da Merck. As placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254/365 nm).

Nas CCDP foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F254 de 1 mm de espessura da Merck, e placas cromatográficas de alta resolução de gel de sílica fluorescente a 254 nm de 200 μm de espessura da Whatman.

As placas foram reveladas com luz UV λ 254 e 365 nm (Spectroline – Model CM-10, Fluorescence Analysis Cabinet) ou/e vapores de iodo.

As amostras obtidas de cada coluna foram evaporadas sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Buchi 461 (50 °C, \pm 120 rpm).

Os solventes utilizados na CC foram de grau analítico da marca Quemis® para clorofórmio, metanol, acetato de etila e hexano.

Para as medidas de absorvância para mensurar atividade antioxidante foi utilizado o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ácido linolênico da marca Sigma Aldrich, enquanto o BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) da Acros Organics. As medidas de absorção foram feitas usando-se espectrofotômetro UV-Vis VARIAN, modelo Cary 50.

O reagente de Liebermann-Burchard foi preparado misturando 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético, posteriormente essa mistura foi cuidadosamente adicionada a 50 mL de etanol resfriado em banho de gelo. Este reagente foi utilizado borrifando-se as placas e posteriormente aquecido-as em placa de aquecimento até 100 °C.

3.1.1 Transesterificação da mistura dos triacilglicerídeos obtidos

A reação de hidrólise dos triacilglicerídeos foi realizada utilizando refluxo em solução EtOH/KOH (100 ml/300 mg) por 2 horas. A mistura reacional foi concentrada em cerca de 80% utilizando evaporador rotativo. Foram adicionados 20 mL de H₂O e realizada três extrações com CHCl₃ (50 mL, cada), para remoção de insaponificáveis. A fase aquosa alcalina foi tratada com HCl_{con} e feito três extrações com CHCl₃ (100 mL, cada) obtendo-se os ácidos graxos livres. Logo, a formação dos ésteres derivados do ácido graxo livre foi realizada utilizando os ácidos graxos em MeOH na proporção de 40 mg:35 mL. Seguida de adição de H₂SO₄ (0,75 mL) e levada ao refluxo por 2 horas. No término da reação, ao resfriar a temperatura ambiente, foram adicionadas 20 mL de solução saturada de NaCl seguida de três extrações com CHCl₃ (50 mL, cada). O produto extraído com CHCl₃ foi filtrado em Na₂SO₄ anidro e concentrado em evaporador rotativo sob baixa pressão. Todas as etapas foram analisadas por CCDC. Após estes procedimentos, os ésteres metílicos (20 mg) foram obtidos com rendimento de 50%.

3.1.2 Reação de esterificação dos ácidos graxos livres isolados

A obtenção dos ésteres derivados de ácidos graxos foi realizada utilizando os ácidos graxos em MeOH na proporção de 7,5 mg:30 mL. Seguida de adição de H₂SO₄ (0,5 mL) e levada ao refluxo por 2 horas. No término da reação, ao resfriar a temperatura ambiente, foram adicionadas 20 mL de solução saturada de NaCl seguida de três extrações com CHCl₃ (50 mL, cada). O produto extraído com CHCl₃ foi filtrado em Na₂SO₄ anidro e concentrado em evaporador rotativo sob baixa pressão. Todas as etapas foram analisadas por CCDC. Após estes procedimentos, os ésteres metílicos (4,2 mg) foram obtidos com rendimento de 56%.

3.2 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

3.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas em equipamento de RMN da Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) da

marca Bruker operando em 300 MHz para ^1H e os espectros de correlação ^1H e ^{13}C (2-D) HMQC e HMBC foram gerados em espectrômetro Bruker DPX300 e DPX500 operando a 300 e 500 MHz para ^1H e 75 e 125 MHz para ^{13}C , respectivamente. Utilizou-se CDCl_3 e DMSO-d^6 como solventes deuterados com grau de pureza superior a 99,8% das marcas Aldrich®. Os sinais dos espectros foram registrados com base nos sinais do solvente empregado em relação ao TMS.

3.2.2 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros no IV foram registrados em equipamento Shimadzu, modelo IR Affinity – 1, Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, instalado no Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras foram submetidas a análise em pastilha de KBr. Antes das medidas, uma pastilha contendo só o KBr foi preparada e utilizada para calibrar (zerar) o equipamento, garantindo qualidade, em alguns casos, na obtenção dos espectros.

3.2.3 Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis)

Os espectros no UV/Vis foram obtidos em Espectrofotômetro Varian – Cary 50 Conc UV – Visible Spectrophotometer instalado no Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras foram analisadas em cubetas de quartzo da Varian no modo scan com varredura de 900 a 200 nm. Para as leituras das absorvâncias das amostras durante os testes de atividades antioxidantes DPPH e inibição da auto-oxidação β -caroteno/ácido linolênico foram utilizados comprimentos de onda máximo em 517 e 470 nm, respectivamente. As análises foram feitas em cubetas de poliestireno da Kartell S. P. A.

3.3 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises por CG-EM foram realizadas na Universidade Federal da Bahia (Campos Anísio Teixeira, Vitória da conquista), em aparelho QP2010SE (GC2010 Plus) da marca Shimadzu, usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (difenil dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, espessura do filme de 0,25 μm e hélio como gás de arraste.

A temperatura do injetor foi de 290 °C com temperatura inicial de 50 °C por 1 min, aumentando de 50 °C a 180 °C na razão de 15 °C /min e de 180 °C a 230°C na razão de 7°C/min e de 230 °C a 250°C na razão de 15°C/min, permanecendo nessa temperatura por 10 min. Em seguida, a temperatura passou de 250 °C para 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos. A temperatura do detector foi de 290 °C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 35 a 1000 Da.

A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8).

3.4 MATERIAL PARA EXTRAÇÃO

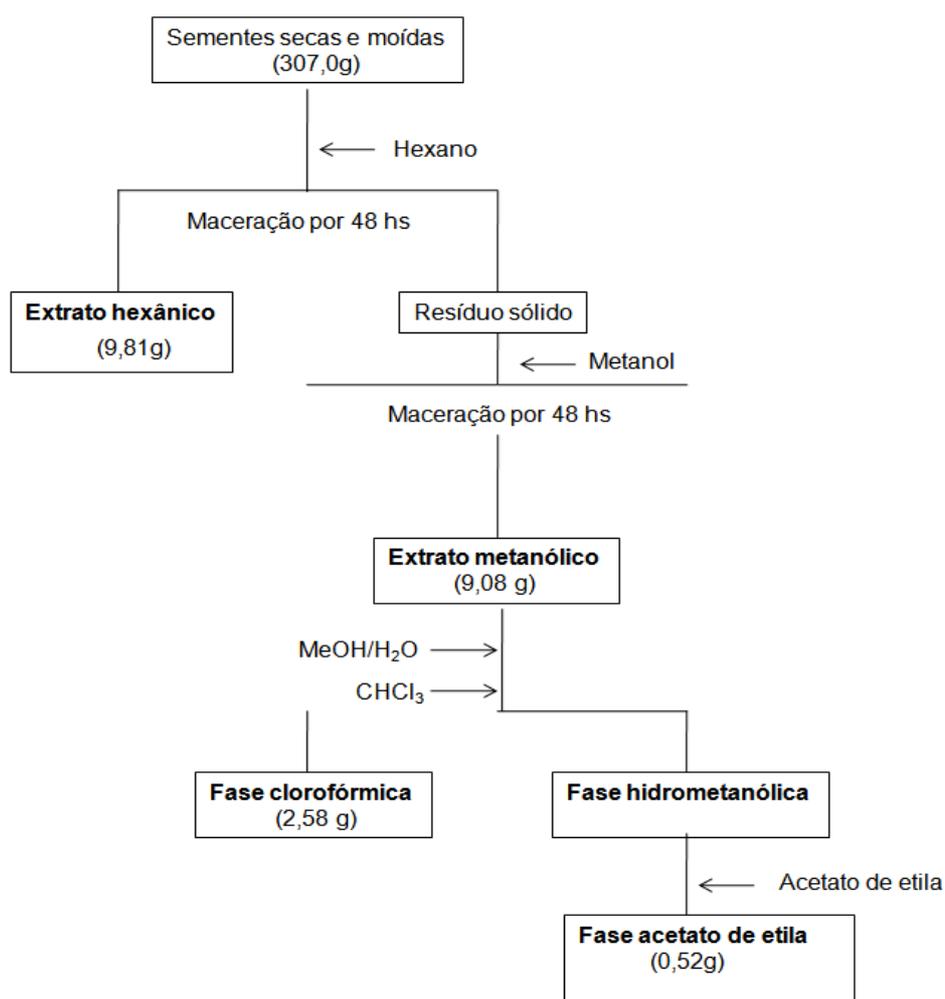
Os frutos de *Spondias tuberosa* (umbu) foram adquiridos em feira livre de Salvador em abril de 2012. O fruto foi despulpado manualmente e as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno em temperatura ambiente.

Após o despulpamento, o material vegetal (sementes de *Spondias tuberosa*) foi submetido à secagem em estufa a 40°C com ventilação por 48 horas, moído e submetido à maceração, por 48 horas, duas vezes consecutivas em hexano e posteriormente em metanol. O extrato metanólico bruto (massa = 9,0845 g) obtido após concentração em evaporador rotatório foi particionado com solventes de diferentes polaridades (clorofórmio e acetato de etila). O extrato hexânico bruto (9,811g), obtido após concentração em evaporador rotatório, foi armazenado em um freezer (-5°C) sem aditivo químico e posteriormente submetido à reação de hidrólise alcalina seguido de esterificação para obtenções de ésteres metílicos.

3.4.1 Partição do extrato metanólico de *S. tuberosa*

O extrato metanólico bruto da semente de *S. tuberosa* foi submetido à extração líquido-líquido, sendo solubilizado em MeOH/H₂O 6:4 e extraído com CHCl₃ (10x de 30ml) que foi pesado após a completa evaporação do CHCl₃ obtendo uma massa de 2,5797g da fração clorofórmica. A fase hidroalcoólica da partição com

CHCl_3 foi submetida à evaporação sob pressão reduzida para eliminação de excesso de MeOH e em seguida extraída com acetato de etila (10x de 30mL) que foi pesado após a completa evaporação do acetato de etila obtendo uma massa = 0,5181 g da fração AcOEt. A fase aquosa foi evaporada para retirar excesso de acetato de etila. No final do processo de partição, obtiveram-se duas fases de polaridades diferentes (fase clorofórmica e fase acetato de etila), as quais foram fracionadas em CC (Esquema 1).



Esquema 1 Obtenção dos extratos e fases das sementes de *S. tuberosa*.

3.5 TESTES BIOLÓGICOS

3.5.1 Teste de letalidade contra *Artemia salina*

A partir de 1982, iniciou-se o emprego de *Artemia salina* no monitoramento de extratos de plantas ou substâncias puras, com vistas à detecção da presença de compostos citotóxicos (MEYER, 1982).

Quando colocadas em solução salina, em 24-48 horas, os ovos eclodem dando origem a um grande número de larvas (náuplios). Atualmente este organismo pode ser considerado como um indicador confiável quanto à toxicidade de substâncias que se encontram nos extratos orgânicos testados ou substâncias puras. Esta consideração encontra-se fundamentada em estudos de bioensaios comparativos, com diversas substâncias reconhecidamente citotóxicas, entre o teste de letalidade do camarão e testes *in vitro* efetuados com linhagens de células cancerígenas (ANDERSON, 1991).

Para a realização do bioensaio contra *A. salina*, foi utilizada a metodologia proposta por Meyer (MEYER *et al*, 1982), com modificações.

Em um aquário de vidro com uma divisória escura, contendo pequenas aberturas (para migração das larvas), os cistos de *A. salina* (500 mg) do fabricante Miramar, adquiridos no AQUARIUS FISHES (Shopping Itaipara), foram incubados em solução marinha artificial (13,39 g de sal marinho: 3,5 L de água mineral), sob iluminação artificial (lâmpada de 60w), temperatura ambiente de 28°C e estado de saturação de oxigênio conseguido através de uma bomba de ar conectada ao fundo do aquário. O aquário foi recoberto com papel alumínio deixando-se um pequeno espaço para penetração da iluminação. Como as larvas (náuplios) têm afinidade pela luz, ou seja, apresentam fototropismo positivo, foi possível separá-las dos cistos de forma manual através do uso de becker.

Os extratos obtidos e as fases adquiridas das partições foram testados contra *A. salina*, preparando-se uma solução estoque de 30 mL na concentração de 1 mg/mL de cada fase e extrato, separadamente, em solução marinha artificial. A solução estoque foi diluída para obter sete concentrações finais (25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 µg/mL). Para facilitar a diluição das fases e extratos em solução salina, fez-se necessário a utilização de DMSO:EtOH (2:3; gota/gota). As concentrações foram testadas em triplicata em frascos de penicilina, sendo adicionado 10 náuplios a cada frasco, contendo 5 mL de solução análise. A contagem dos náuplios vivos e mortos foi realizada após o período de 24 horas

incubadas na ausência de luz. Os valores da CL_{50} foram obtidos através do método Probit de análise, com limite de confiança de 95% (FINNEY, 1971).

Os critérios de classificação da toxicidade com base nos níveis de CL_{50} em *A. salina* foram os mesmos estabelecidos por Dolabela (DOLABELA, 1997), a saber: altamente tóxico ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), moderadamente tóxico (entre $100 \mu\text{g/mL}$ e $1000 \mu\text{g/mL}$) e com baixa toxicidade ou não tóxico ($CL_{50} > 900 \mu\text{g/mL}$).

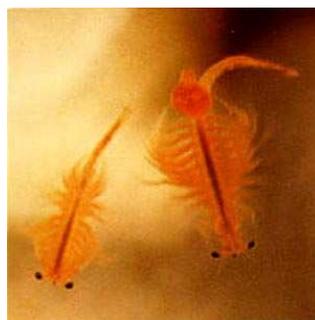


Figura 4 Náuplios de *Artemia salina*.

Fonte: <http://biologiaacontecendo.blogspot.com.br/artemia-salina.html>

3.5.2 Teste do sequestro do radical livre DPPH

Este teste avalia a habilidade da substância testada de sequestrar o radical DPPH e está baseado no descolorimento de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A capacidade de sequestro do radical DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. Este método pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em um curto período de tempo. Portanto, este método tem sido uma ferramenta útil para avaliar a capacidade antioxidante de frutos (BORGUINI, 2006).

Segundo Leon e Shui (PRADO, 2009) os modelos como DPPH são práticos e recomendados para a avaliação da capacidade antioxidante total de frutas, visto que o sequestro de radicais é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. Assim, na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre à mudança de cor. Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade

antioxidante de um composto em capturar radicais livres, o método DPPH é um dos mais utilizados por ser considerado rápido, prático e estável.

A mistura de reação foi constituída da adição de 0,1 mL da substância teste e 3,0 mL da solução do radical DPPH em metanol (40 µg/mL). As leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata, em espectrofotômetro a 517 nm, imediatamente e após 30 min de incubação a temperatura ambiente e protegida da luz. O ácido gálico, utilizado como padrão, e a substância teste foram avaliados em concentrações diferentes.

O percentual de decréscimo na absorbância foi medido para cada concentração e a capacidade de seqüestrar radicais foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de seqüestro de radical (% SRL) e calculado conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ SRL} = (\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra}) / \text{Abs. (Controle)} \times 100$$

Onde Abs. Controle é a absorbância da solução de DPPH e Abs. Amostra é a absorbância da amostra em solução. O % SRL foi calculado com base na diferença da absorbância da solução de amostra em teste com seu branco (controle).

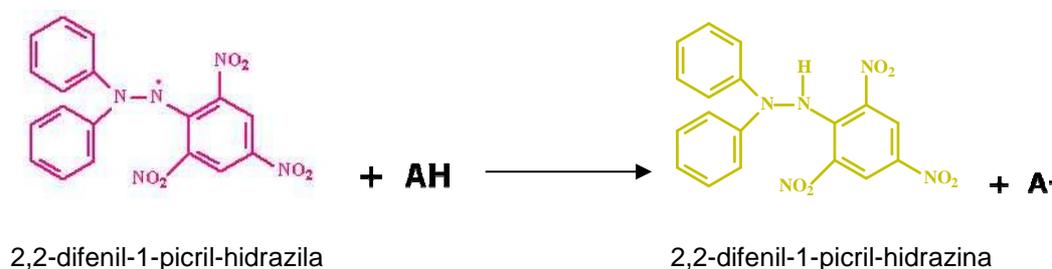


Figura 5 Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.

Fonte: Reynertson, K. A. Dissertação, New York, 2007

3.5.3 Teste da inibição da auto-oxidação do β-caroteno

O sistema β-caroteno/ácido linolênico, que consiste da descoloração (oxidação) do β-caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linolênico, estima à habilidade relativa de compostos antioxidantes presentes em extratos de plantas de sequestrar o radical peróxido do ácido linolênico (LOO●), que oxida o β-caroteno presente na emulsão. O método é amplamente utilizado para a

avaliação da atividade antioxidante de matrizes alimentares. Como não ocorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termolábeis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (BORGUINI, 2006).

O método de auto-oxidação do β -caroteno/ácido linolênico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linolênico. Por o sistema ser constituído por uma emulsão (sistema aquoso-lipídico), a atividade antioxidante testa a capacidade do extrato ou antioxidante isolado inibir o processo de oxidação do sistema avaliado pelo tempo em que os antioxidantes deverão apresentar estabilidade para garantir maior atividade antioxidante. A habilidade em inibir a oxidação de substratos lipídicos em testes *in vitro* é resultado da combinação de vários fatores como temperatura, presença de oxigênio em condições que acelerem a reação de oxidação (PRADO, 2009).

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo o método espectrofotométrico (470 nm) originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Foi preparada uma mistura, com 1,0 mL de solução de β -caroteno (2 mg/mL em CHCl_3), 20 mg de ácido linoléico, 200 mg de Tween 80® que é utilizado como emulsificante e ajuda a dissolver completamente a mistura β -caroteno/ácido linolênico em clorofórmio. Posteriormente a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio e então adicionados 100 mL de água destilada mantida sob atmosfera de oxigênio (30 minutos), e a absorbância inicial foi ajustada numa faixa de 0,6 a 0,7 (DURTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Em cubetas contendo 100 μL da substância teste (100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), foram adicionados 2,7 mL da emulsão preparada, sendo a reação acompanhada por espectrofotometria no visível em $\lambda = 470 \text{ nm}$, com leitura imediata e em intervalos de 20 minutos durante 1 h e após 2 h. As cubetas foram mantidas em banho a 50°C e as leituras realizadas em triplicata, utilizando-se o BHT como antioxidante padrão, acompanhadas por controle sem adição de substância teste. A atividade antioxidante foi expressa em percentual de inibição da oxidação através do decaimento da absorbância, medido em relação ao controle.

$$\% I = 100 [1 - (A_o - A_t) / (A_o^0 - A_t^0)]$$

Onde:

A_o = Absorbância inicial da amostra

At = Absorbância final da amostra

Ao⁰ = Absorbância inicial do controle

At⁰ = Absorbância final do controle

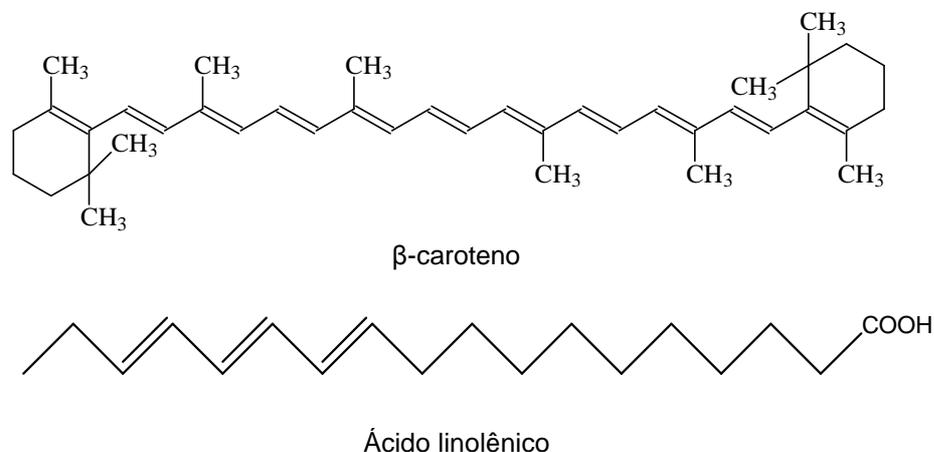


Figura 6 Estruturas químicas do β-caroteno e do Ácido linolênico.

3.6 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

Apenas as fases em AcOEt e CHCl₃ foram submetidas à CC e analisadas por CCDC, sendo reveladas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e submetidas à exposição a vapores de iodo e/ou reagente de Liebermann-Burchard de modo a estabelecer o melhor sistema de eluição das CC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos extratos e fases

O rendimento dos extratos obtidos foi calculado a partir da massa do material inicialmente utilizado (307 g). Na tabela 1 encontram-se os rendimentos para os extratos hexânico e metanólico obtidos.

Tabela 1- Rendimento dos extratos obtidos das sementes de *S. tuberosa*

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Extrato hexano	9,81	3,20
Extrato metanólico	9,08	2,96

Os rendimentos das fases obtidos foram calculados a partir da massa do extrato metanólico bruto (9,084 g). Na tabela 2 encontram-se os rendimentos para as fases clorofórmica, acetato de etila obtidos no final do processo de partição.

Tabela 2- Rendimento das fases obtidas das sementes de *S. tuberosa*

Fase	Massa (g)	Rendimento (%)
Fase clorofórmica	2,40	26,32
Fase acetato de etila	0,52	5,64

4.2 ISOLAMENTOS DAS FASES E EXTRATO

4.2.1 Isolamento dos triglicerídeos do extrato hexânico

A partir do extrato hexânico foi obtido um óleo o qual foi submetido à análise de CCDC. Análise por RMN de ^1H e ^{13}C do EHSU (extrato hexânico da semente do umbu) foi suficiente para determinar com clareza que se tratava de uma mistura de triglicerídeos.

4.2.2 Isolamento dos constituintes da fase clorofórmica

A fase clorofórmica (FCSU) da extração hidroalcoólica das sementes de *S. tuberosa* (2,3897 g), obtida da extração líquido-líquido do extrato metanólico bruto, foi submetido à análise em CCDC, ao qual foi revelada sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) de modo a escolher os melhores sistemas de solventes. Em seguida a fase clorofórmica foi submetida à CC sob sílica gel 60. A coluna foi empacotada com clorofórmio e eluída em clorofórmio e misturas binárias clorofórmio:acetato de etila em gradiente de polaridade crescente. A CC da fase clorofórmica das sementes de *S. tuberosa* resultou em trinta e cinco frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes (R_f), restando no final, seis frações majoritárias (**Tabela 3**).

Tabela 3- Frações obtidas CC da FCSU

Fração	Sistema de solvente (CHCl ₃ :AcOEt)	Massa (mg)
FCSU 1.0 (1)	100	903,3
FCSU 2.0 (2-9)	100	49,1
FCSU 3.0 (10-22)	100	107,4
FCSU 4.0 (23-24)	(95:05)	123,7
FCSU 5.0 (25-28)	(90:10)	145,2
FCSU 6.0 (29-35)	AcOEt: CHCl ₃ (80:20)(1:1)	590,0

A fração FCSU 3.0 (10-21) (104,7 mg) (Tabela 9) foi submetida à CC sob gel Flash, empacotada com hexano, eluída com hexano e misturas binárias de solventes constituído de hexano:acetato de etila. A CC da fração FCSU 3.0 (10-21) resultou em outras 32 frações. Análise das destas frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final, doze frações majoritárias (**Tabela 4**).

Tabela 4- Frações obtidas da CC da subfração FCSU 3.0 (10-21).

Fração	Sistema (Hex:AcOEt)	Massa (mg)
FCSU 3.1 (1)	100	9,7
FCSU 3.2 (2-4)	(90:10)	24,9
FCSU 3.3 (5-7)	(90:10)	17,4
FCSU 3.4 (8-11)	(90:10)	8,4
FCSU 3.5 (12-14)	(90:10)	4,9
FCSU 3.6 (15-17)	(90:10)	3,0
FCSU 3.7 (18-26)	(90:10)	5,7
FCSU 3.8 (27-28)	(70:30)	10,0
FCSU 3.9 (29)	AcOEt	16,0
FCSU 3.10 (30)	AcOEt	14,5
FCSU 3.11 (31)	AcOEt	2,7
FCSU 3.12 (32)	MeOH	12,3

A partir do fracionamento da subfração **FCSU 3.0 (10-21)**, foi possível isolar a substância designada como **FCSU 3.2 (2-4)** na forma de cristais brancos sendo positivo ao teste de Lieberman-Burchard.



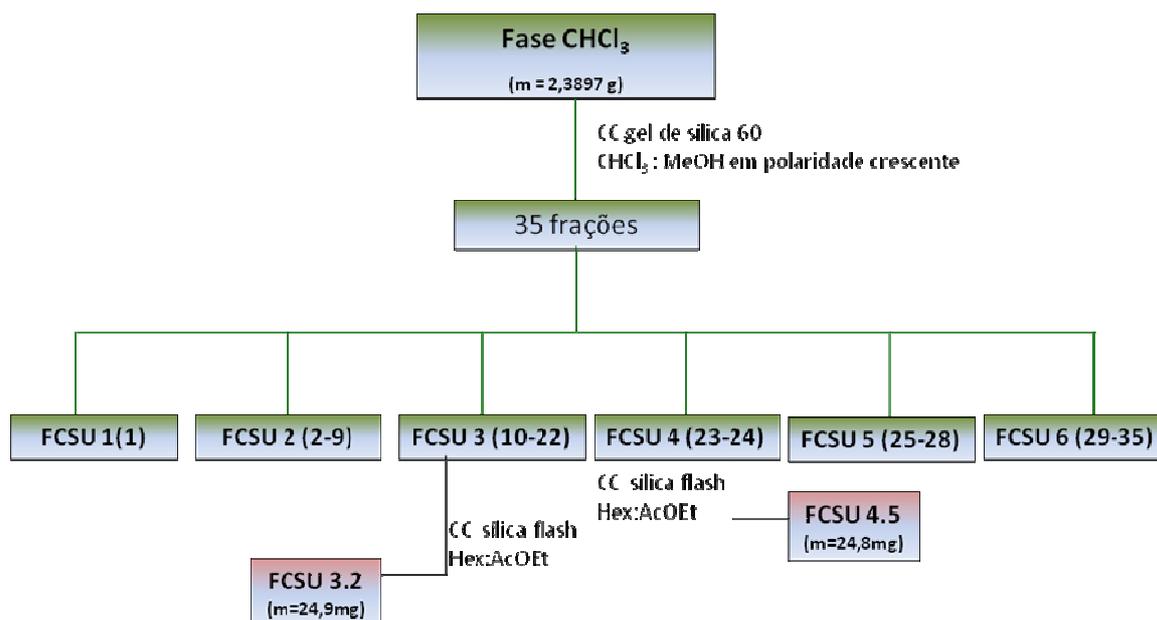
Figura 7 CCDC das subfrações agrupadas de FCSU 3.0 (10-21).

A fração FCSU 4.0 (23-24) (123,7 mg) (**Tabela 3**) foi submetida à CC sob gel Flash, empacotada com hexano, eluída com hexano e misturas binárias de solventes constituído de hexano:acetato de etila. A CC da fração FCSU 4.0 (22-24) resultou em outras 25 frações. Análise das destas frações por CCDC permitiu agrupar as semelhantes restando no final, nove frações majoritárias (**Tabela 5**)

Tabela 5- Frações obtidas da CC da subfração FCSU 4.0 (22-24).

Fração	Sistema (Hex: AcOEt)	Massa (mg)
FCSU 4.1 (1-4)	(98:02)	1,1
FCSU 4.2 (5-6)	(95:05)	3,0
FCSU 4.3 (7)	(90:10)	1,2
FCSU 4.4 (8)	(90:10)	4,8
FCSU 4.5 (9-13)	(9:1)(8:2)	24,8
FCSU 4.6 (14-15)	(7:3)	11,9
FCSU 4.7 (16-17)	(7:3)(1:1)	13,8
FCSU 4.8 (18-20)	(1:1)	17,5
FCSU 4.9 (21-25)	(AcOEt)	17,5

A partir do fracionamento da subfração **FCSU 4.0 (22-24)**, foi possível isolar a substância designada como **FCSU 4.5 (9-13)** na forma de pasta branca.



Esquema 2 Fracionamento da fase CHCl_3 das sementes de *S. tuberosa*.

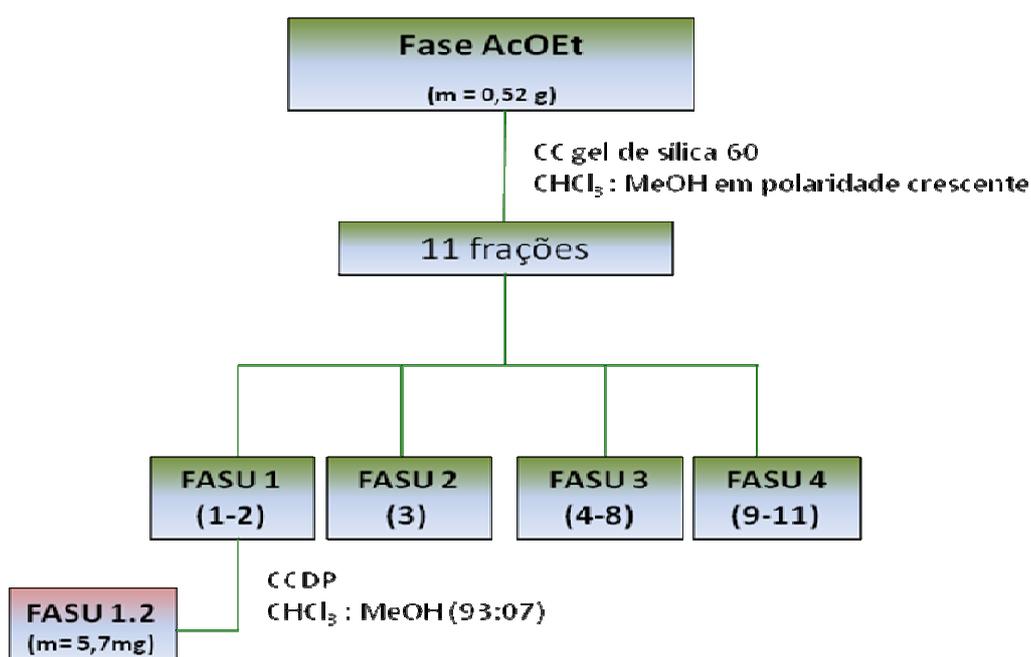
4.2.3 Isolamento dos constituintes da fase acetato de etila

A fase AcOEt (FASU) da extração hidroalcoólica das sementes de *S. tuberosa* (0,52 g), obtida da extração líquido-líquido do extrato metanólico bruto, foi submetida à análise em CCDC e revelada sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) de modo a escolher os melhores sistemas de solventes. Em seguida a fase acetato de etila foi submetida à CC sob sílica gel 60. A coluna foi empacotada com o sistema clorofórmio:metanol (8:2) e eluída com um sistema isocrático clorofórmio:metanol (80:20). A CC da fase acetato de etila das sementes de *S. tuberosa* resultou em 11 frações. Análise das frações por CCDC permitiu agrupar as frações semelhantes (Rf), restando no final 4 frações majoritárias (**Tabela 6**).

Tabela 6- Frações obtidas da CC do FASU.

Fração	Sistema (CHCl_3 :MeOH)	Massa (mg)
FASU 1 (1-2)	(8:2)	23,9
FASU 2 (3)	(8:2)	21,8
FCSU 3 (4-8)	(8:2)	182,1
FCSU 4 (9-11)	(8:2)	75,5

A fração FASU 1 (1-2) foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando o sistema clorofórmio:metanol 93:07. Na placa preparativa foi aplicada 23,9 mg de amostra. As frações obtidas da CCDP foram raspadas com auxílio de espátula de inox e filtradas em funil sinterizado utilizando solventes puros ou em misturas apropriadas para recuperação das amostras eluídas na placa, seguida de evaporação sob pressão do solvente em evaporador rotativo. As amostras obtidas foram pesadas e codificadas. A partir da CCDP foi possível isolar a substância designada como **FASU 1.2** (massa = 5,7 mg).



Esquema 3 Fracionamento da fase AcOEt das sementes de *S. tuberosa*.

4.3 LETALIDADE CONTRA *ARTEMIA SALINA*

A atividade contra *A. salina* foi baseada na mortalidade dos náuplios em presença dos constituintes químicos de cada fase diluída em meio salino. Após a incubação por 24 horas observou-se que um dos extratos de *S. tuberosa* possuía atividade citotóxica frente *A. salina*. O extrato metanólico apresentou toxicidade com uma CL_{50} 168,3 $\mu\text{g/mL}$. O extrato hexânico apresentou uma CL_{50} de 6259,8 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerado atóxico nas concentrações testadas. A fase clorofórmica obtida

da partição do extrato metanólico também foi submetida ao teste apresentando toxicidade com uma CL_{50} 152,26 $\mu\text{g/mL}$.

Com exceção da fase hexânica, o extrato metanólico e fase clorofórmica se mostraram moderadamente tóxicos segundo Dolabela (DOLABELA, 1997).

4.4 TESTE DO SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH

Soluções metanólicas do ácido gálico, do extrato metanólico e das fases CHCl_3 e AcOEt foram diluídas em diferentes concentrações, e as medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$) foram realizadas a 517 nm, no 1° e 30° minutos. Para o teste em branco, foi utilizada 2,7 mL de solução de DPPH e 0,3 mL MeOH.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 encontram-se a capacidade de sequestrar radical livre expressa como percentual de sequestro de radical livre (% SRL) do extrato metanólico, fase clorofórmica, fase acetato de etila e ácido gálico (padrão).

Tabela 7- % SRL do extrato metanólico das sementes de *S. tuberosa*.

Concentração	% SRL	
	Ácido Gálico	Extrato metanólico
0,10	94,95	3,18
0,15	95,05	9,70
0,20	95,11	9,74
0,25	95,17	15,23
0,5	95,20	39,01
1,0	95,37	65,18
1,5	95,49	80,19
2,0	95,49	87,32

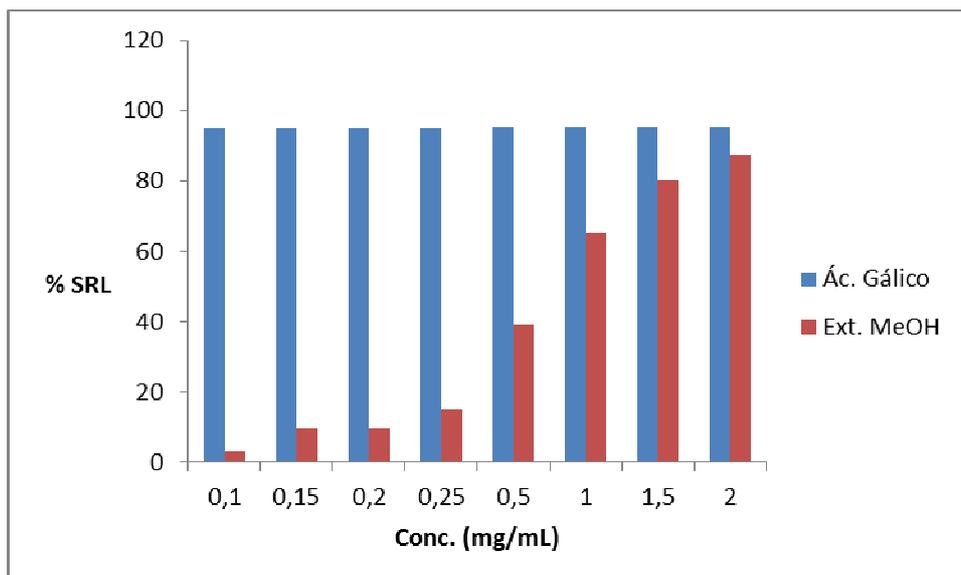


Figura 8 % SRL do extrato metanólico e ácido gálico.

Em estudo realizado por Melo *et al.* (2006) com hortaliças, os extratos que apresentaram atividade de sequestro do radical DPPH superior a 70% foram considerados eficazes, os extratos que exibiram atividade entre 60-70% apresentaram ação moderada, e aqueles que apresentaram atividade inferior a 60% foram considerados com fraca ação antioxidante. Analisando os resultados da tabela acima, verifica-se que o extrato metanólico apresentou uma atividade de sequestro de radical DPPH eficaz somente a partir de 1,5 mg/mL.

Entretanto, a fase clorofórmica apresentou atividade inferior a 60% mesmo em concentração superior a 1,5 mg/ml (**Tabela 8**), tendo então uma fraca ação antioxidante em relação aos resultados mostrados pelo extrato metanólico.

Tabela 8- % SRL da fase clorofórmica das sementes de *S. tuberosa*.

Concentração mg/mL	% SRL	
	Ácido Gálico	Fase clorofórmica
0,5	93,49	5,49
1,0	93,58	15,76
1,5	93,67	24,75
2,0	93,75	31,09

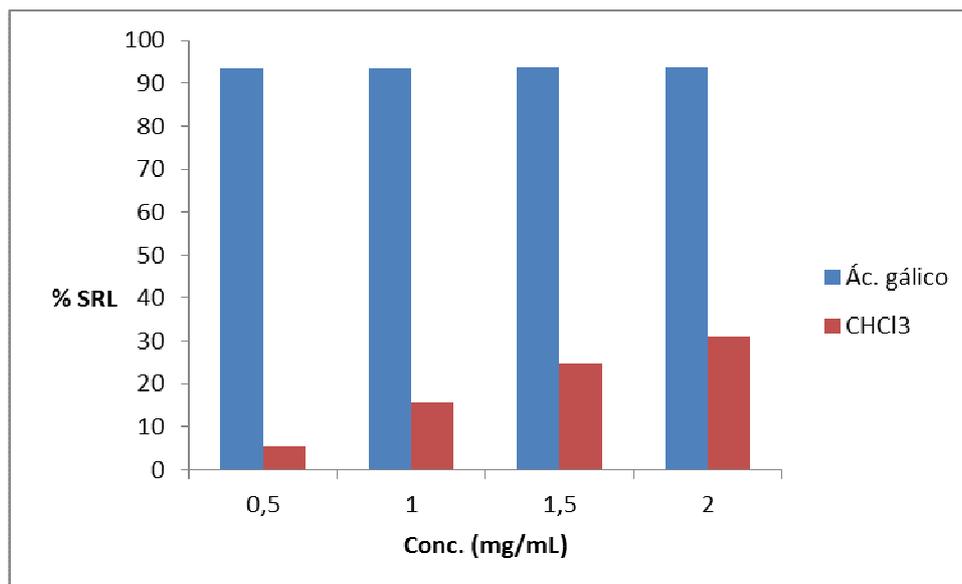


Figura 9 % SRL da fase clorofórmica e ácido gálico.

Mediante aos resultados apresentados na tabela 9, a fase acetato de etila apresentou atividade de sequestro de radical DPPH eficaz a partir 200 $\mu\text{g/ml}$, ou seja, em concentrações menores do que as concentrações testadas pela fase clorofórmica. Portanto, infere-se que a forte ação antioxidante apresentada no extrato metanólico deve-se a presença de substâncias antioxidantes presentes na fase acetato de etila.

Tabela 9- % SRL da fase acetato de etila das sementes de *S. tuberosa*.

Concentração $\mu\text{g/mL}$	% SRL	
	Ácido Gálico	Fase acetato de etila
100	94,66	36,08
150	94,70	51,03
200	94,81	66,05
250	94,88	72,03
500	94,90	74,87

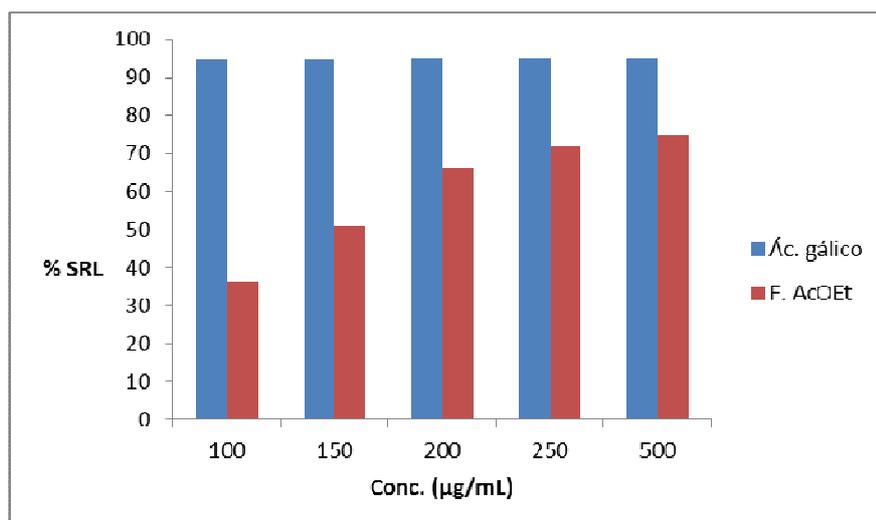


Figura 10 % SRL da fase acetato de etila e ácido gálico.

4.5 TESTE DA INIBIÇÃO DA AUTO-OXIDAÇÃO DO β -CAROTENO

Soluções metanólicas do BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) e do extrato metanólico, das fases clorofórmica e acetato de etila, na concentração de 500 µg/mL, foram diluídas em quatro concentrações diferentes (100, 150, 200 e 250 µg/mL). As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do BHT e 2,7 mL da solução estoque do meio oxidante) foram realizadas a 470 nm no 1°, 20°, 40°, 60° minutos. Para o teste em branco, foi utilizada 2,7 mL de solução do meio oxidante e 0,3 mL MeOH.

Nas Tabelas 10 e 11, encontram-se as atividades antioxidantes expressas em percentual de inibição da oxidação através do decaimento da absorvância, medidas em relação ao controle do extrato metanólico, das fases CHCl₃, AcOEt, e BHT (padrão) no tempo 60'.

Tabela 10- %I do extrato metanólico das sementes de *S. tuberosa*.

Concentração µg/mL	% I (60min)	
	BHT	Extrato metanólico
100	98,18	45,75
150	98,45	51,40
200	99,12	73,34
250	99,28	73,55
500	99,35	74,34

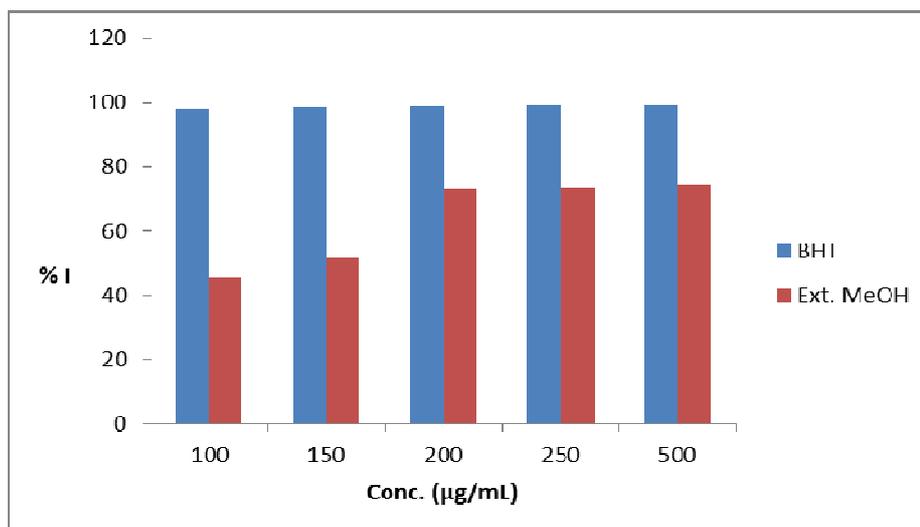


Figura 11 % I do extrato metanólico e BHT.

Analisando os resultados do extrato metanólico, observa-se que as amostras apresentaram elevado percentual de inibição a partir da concentração 200 µg/mL, ou seja, atividade superior a 70% (MELO, 2006). De modo geral todas as amostras reduziram em graus diferentes o descoramento do β-caroteno, protegendo assim o sistema.

Avaliando os resultados da tabela 11, na fase acetato de etila as amostras apresentaram elevada atividade em todas as concentrações, enquanto a fase clorofórmica demonstrou elevado percentual de inibição somente na concentração 500 µg/mL.

Tabela 11- %I das fases acetato de etila e clorofórmica das sementes de *S. tuberosa*.

Concentração	% I (60min)		
	Padrão	Fase	
µg/mL	BHT	CHCl ₃	AcOEt
100	92,84	29,16	71,88
150	97,54	41,17	77,14
200	99,27	50,93	80,02
250	99,64	53,47	85,80
500	99,70	71,08	88,17

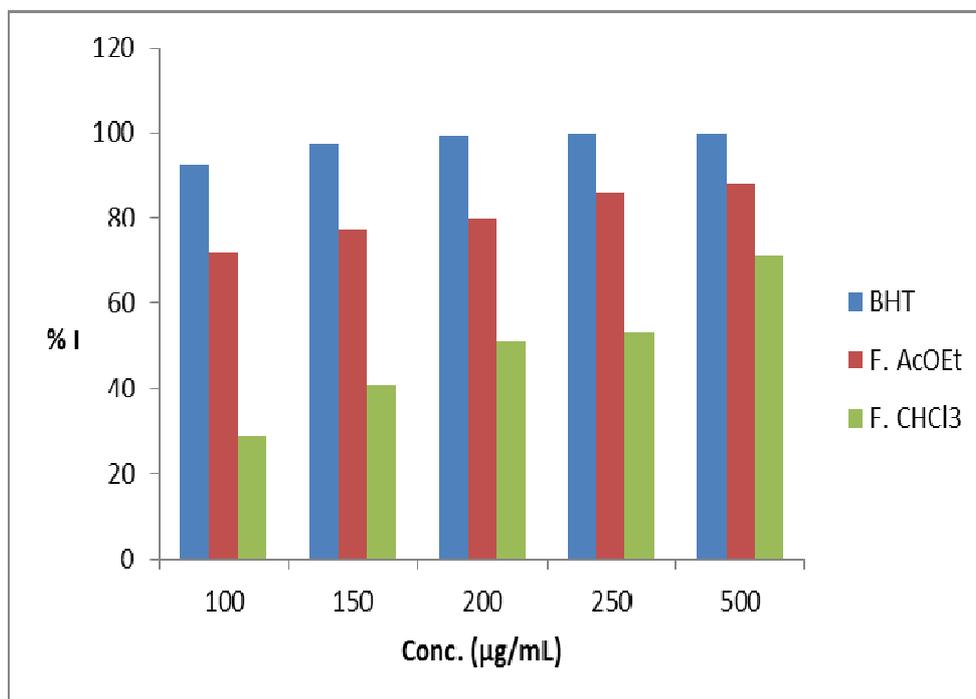


Figura 12 % I das fases clorofórmica, acetato de etila e BHT.

4.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

As análises espectroscópicas foram realizadas com as substâncias isoladas do extrato hexânico, da fase clorofórmica e fase acetato de etila das sementes *S. tuberosa* cujos dados referentes a cada uma encontra-se descritos a seguir.

4.6.1 Identificação dos triglicerídeos presentes em *S. tuberosa*

Nas plantas, os triacilgliceróis constituem uma importante reserva de energia em frutas e sementes, visto que contem consideráveis quantidades de ácidos graxos insaturados, como oléico e linoléico. Os triacilgliceróis (TG) estão presentes em diversos óleos vegetais e seus métodos de análise têm atraído bastante atenção nas últimas décadas.

Óleos vegetais são componentes importantes de nossa dieta. Assim, suas propriedades organolépticas, estabilidade oxidativa e influência no consumo humano

são totalmente dependentes da composição do óleo, e por esta razão sua caracterização é muito importante (GUILLEN, 2003).

Óleos comestíveis são constituídos basicamente por triglicerídeos com diferentes padrões de substituição, comprimentos e graus de saturação das cadeias, e por outros componentes minoritários. Existem aqueles em que o grupo acil principal é o grupo oléico, linoléico ou o linolênico em proporção significativa.

Análise do espectro de RMN de ^{13}C de um óleo vegetal encontrado na literatura (**Figura 13**) revela quatro regiões bem distintas no espectro: δ 173,3-172,8 ppm (A) região dos carbonos carboxílicos; δ 132,0-127,1 ppm (B), região dos carbonos olefínicos; δ 69,1-61,6 ppm, região dos carbonos do glicerol (C) [C₁ e C₂]; e δ 34 ppm (D), onde estão presentes os carbonos alifáticos saturados. Quando se analisa a região dos grupos carboxílicos, os substituintes nas posições 1 e 2 do glicerol podem ser distinguidos, porque mostram intensidades diferentes (REDA, 2007).

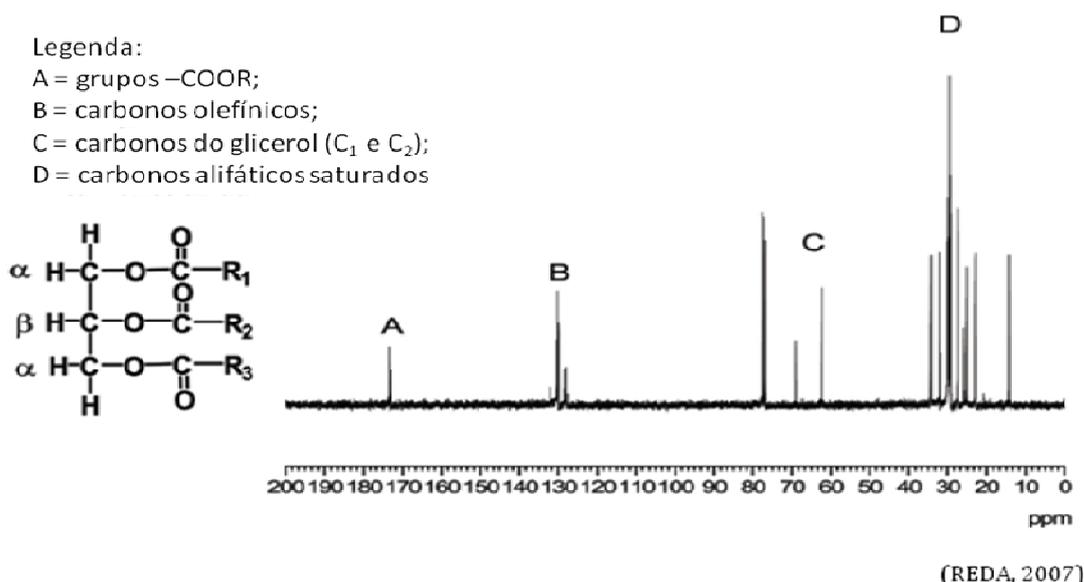


Figura 13 Espectro genérico de RMN ^{13}C de óleos vegetais (REDA, 2007).

Dentre os deslocamentos químicos mais característicos dos triglicerídeos, destacam-se aqueles em δ 34(C₂) correspondentes aos grupos α -metilênicos em relação à carboxila; os grupos CH₂ saturados encontram-se em δ 24(C₃), δ 31(ω 3) e δ 22(ω 2); os CH₂ alílicos adjacente a dupla ligação podem ser encontrados em δ 27; os CH₂ bis-alílicos, são observados em δ 26,0-25,0; os carbonos β -carbonílicos são observados em δ 25 e as metilas podem ser observadas em δ 14 (ω 1) (REDA, 2007).

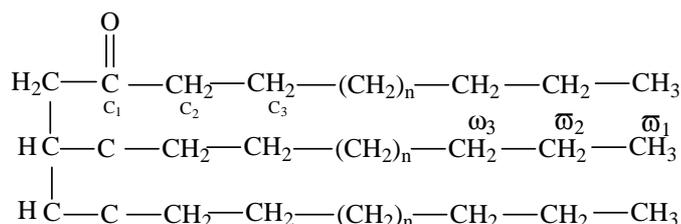


Figura 14 Representação genérica de um triglicerídeo.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta região característica dos sinais olefínicos, isto é, em δ 128 a δ 131. Amostras contendo predominantemente ácido monoenoico apresentam dois picos largos em δ 129,7 e δ 129,9. A presença de sinais adicionais nas regiões de campo alto (aproximadamente δ 127,9 e δ 128,1) indica a presença de ácido graxo poliinsaturado (SHIAO, 1989).

Além disso, os deslocamentos químicos associados ao carbono do glicerol são úteis para análises quantitativas e qualitativas, especialmente os sinais do glicerol-2 (glic-2). Sinais de carbono 2 do glicerol são registrados entre 68 e 75 ppm, e os sinais dos carbonos 1 e 3 do glicerol, entre 61 e 66 ppm. Em moléculas simétricas, os sinais do glic-1 e glic-3 são os mesmos, diferindo assim das moléculas não simétricas (GUNSTONE, 2007).

O espectro de RMN de ^1H de óleos vegetais comuns apresenta no mínimo nove sinais de intensidade significativa, e em alguns casos 10; estes sinais são devido aos hidrogênios dos principais componentes, os triglicerídeos (**Tabela 12**) (GUILLEN^b, 2003).

Tabela 12- Sinais de RNM de ^1H de amostras de óleos vegetais.

Sinal	Deslocamento químico (ppm)	Grupo funcional
1	0,83-0,93	-(CH ₃) (grupo acil saturado, oléico e linoéico)
2	0,93-1,03	-(CH ₃) (grupo acil linolênico)
3	1,22-1,42	-(CH ₂) _n (grupo acil)
4	1,52-1,70	-OCO-CH ₂ -CH ₂ - (grupo acil)
5	1,94-2,14	-CH ₂ -CH=CH- (grupo acil)
6	2,23-2,36	-OCO-CH ₂ - (grupo acil)
7	2,70-2,84	=HC-CH ₂ -CH- (grupo acil)
8	4,10-4,32	-CH ₂ OCOR (grupo gliceril)
9	5,20-5,26	>CHOCOR (grupo gliceril)
10	5,26-5,40	-CH=CH- (grupo acil)

Assim, como pode ser observado na Tabela 12 e Figura 15 (páginas 31 e 33), os sinais referentes aos hidrogênios metílicos ($-\text{CH}_3$) de grupos acil saturados, oléico e linoléico fornecem o sinal 1 entre 0,83 e 0,93 ppm. O sinal 3 é causado por hidrogênios metilênicos na posição β às ligações duplas ou γ ao grupo carbonil ($-(\text{CH}_2)_n-$). Os deslocamentos químicos desses sinais dos hidrogênios metilênicos estão entre 1,22 e 1,42 ppm. Em estudos anteriores usando grupos acil palmítico, oléico, linoléico e linolênico como padrões, os sinais e deslocamentos químicos obtidos dos hidrogênios metilênicos foram os seguintes: ácido palmítico, um único sinal em 1,19 ppm; ácido oléico, um único sinal em 1,23 ppm; e ácidos linoléico e linolênico, um sinal de mesmo deslocamento químico (1,28 ppm) em ambos os casos.

Os sinais dos hidrogênios metilênicos β -carbonílicos ($-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) aparecem entre 1,52 e 1,70 ppm (sinal 4). O sinal 5 (entre 1,94 e 2,14 ppm) no espectro de RMN de ^1H é devido aos hidrogênios α -metilênicos em relação a dupla ligação ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$), também chamados de hidrogênios alílicos. Sinal 6 é devido aos hidrogênios metilênicos na posição α em relação ao grupo carbonílico ($-\text{OCO}-\text{CH}_2-$) e aparece entre 2,23 e 2,36 ppm. O sinal 7 é devido aos hidrogênios metilênicos na posição α em relação à duas ligações duplas ($=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), também chamados de hidrogênios bis-alílicos, e aparece entre 2,70 e 2,84 ppm; este sinal é devido aos grupos acil linoléico e linolênico. Tendo em vista que o ácido oléico é monoinsaturado não há presença desses sinais.

Sinal 8, em 4,10-4,32 ppm, é devido aos hidrogênios dos carbonos 1 e 3 do grupo glicerol ($-\text{CH}_2\text{OCOR}$), enquanto sinal 9, em 5,20-5,26 ppm, é devido ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do mesmo grupo glicerol ($>\text{CHOCOR}$). Este último sinal se sobrepõe ligeiramente com sinal 10, em 5,26-5,40 ppm, referente aos hidrogênios olefínicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) dos diferentes grupos acil (GUILLÉN^a, 2003).

A partir do extrato hexânico bruto (9,811 g) obtido das sementes de *Spondias tuberosa* (EHSU) foi possível isolar uma mistura de triglicerídeos.

A composição química majoritária do EHSU (Extrato hexânico da semente do umbu) foi confirmada comparando os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H de óleos vegetais com os espectros obtidos para o extrato.

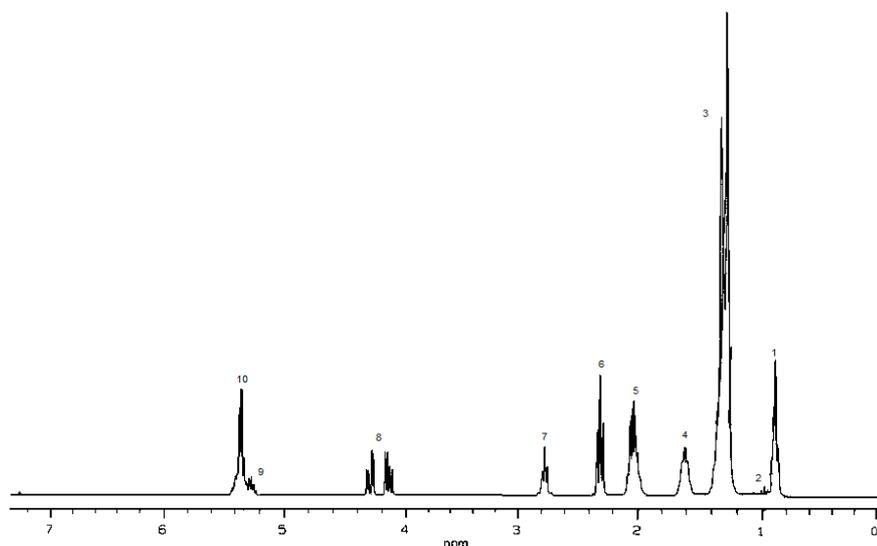


Figura 15 Espectro genérico de RMN ^1H de óleos vegetais (GUILLÉN^a, 2003).

Análise detalhada do espectro de RMN ^1H da amostra EHSU (Figura 16, página 33; Tabela 13, página 36) permitiu concluir que se trata de uma mistura de triacilglicerídeos devido à presença de seus sinais característicos. O tripleto em 0,88 ppm referente aos hidrogênios metílicos; sinal em 1,27 ppm referente aos hidrogênios dos grupos metilênicos (β -olefínicos ou γ -carbonílicos); sinal em 1,60 ppm referente aos hidrogênios metilênicos β -carbonílicos; sinal em 2,03 ppm, referente aos hidrogênios alílicos; sinal em 2,31 ppm referente aos hidrogênios metilênicos α -carbonílicos; sinal em 2,77 ppm correspondente aos hidrogênios bis-alílicos; sinal em 4,22 ppm corespondente aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol (C1 e C3); sinal em 5,26 ppm corespondente ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do glicerol; e o sinal em 5,35 ppm correspondente aos hidrogênios olefínicos.

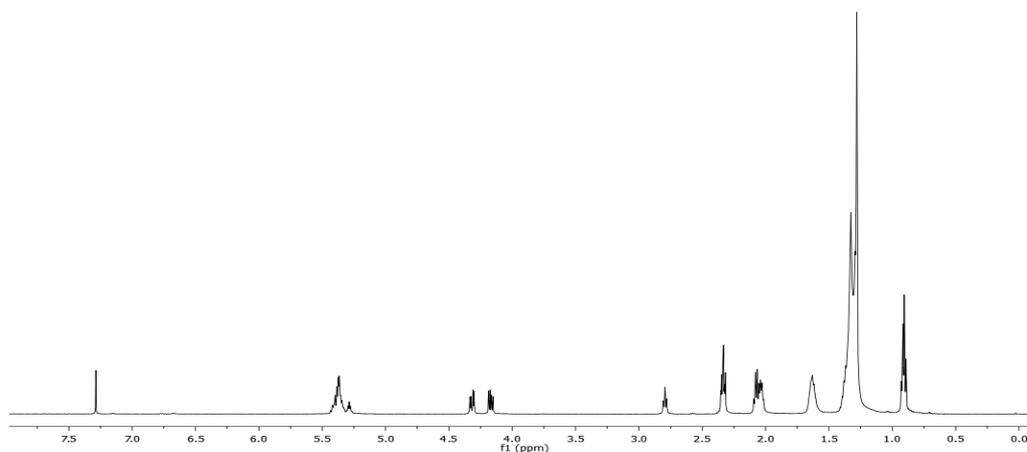


Figura 16 Espectro de RMN de ^1H dos triglicerídeos [(500 MHz), CDCl_3].

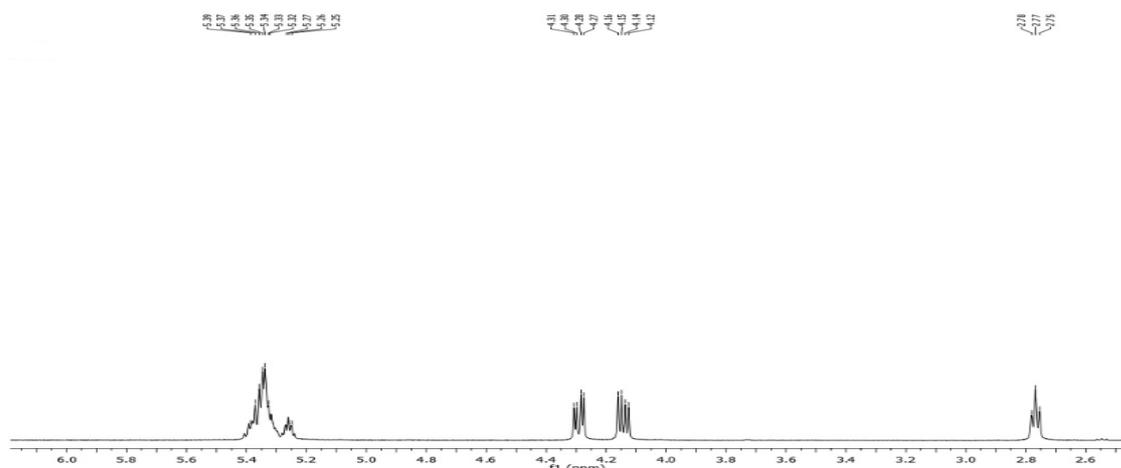


Figura 17 Ampliação do espectro de ¹H [(500 MHz), CDCl₃].

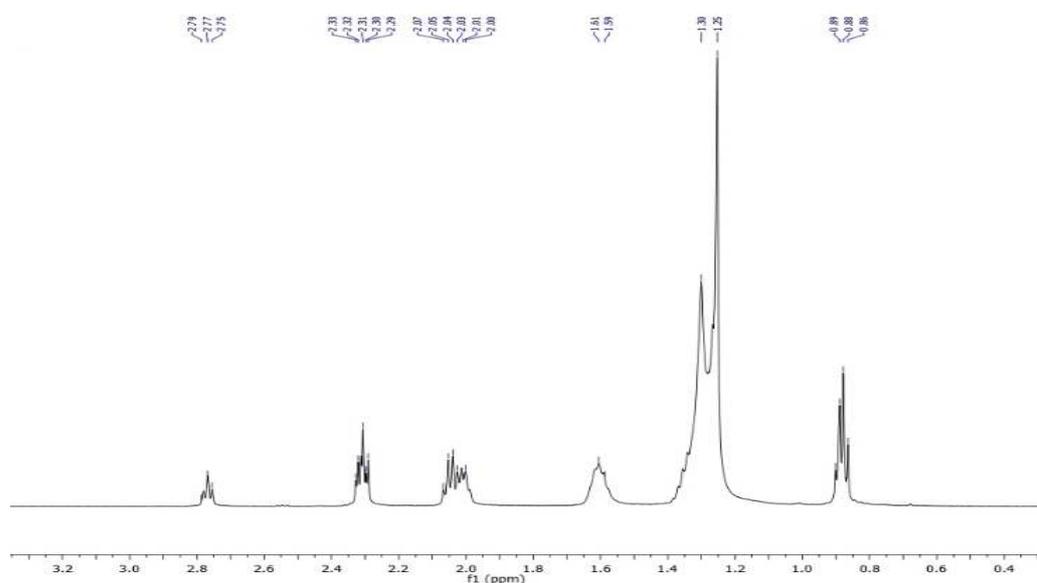


Figura 18 Ampliação do espectro de ¹H [(500 MHz), CDCl₃].

O espectro de RMN ¹³C (Figura 19, página 35; Tabela 13, página 36) mostrou sinais característicos de carbonos carboxílicos em δ 173,3 e δ 172,8; olefínicos em δ 130,2, δ 130,0, δ 129,7 e em δ 128,6, δ 127,9, indicando a presença de ácido graxo poli-insaturado e os carbonos C1 e C2 do glicerol (δ 68,9 e 62,1). Deslocamentos químicos em δ 34,2 e 34,1 correspondem aos grupos α-metilênicos em relação à carboxila; os grupos CH₂ saturados encontram-se em 31,9-22,6 ppm; os CH₂ alílicos externos à C=C, estão em δ 27,2; os CH₂ olefínicos internos, são observados em δ 25,6; os carbonos β-carboxílicos são observados em δ 24,9 e as metilas foram observadas em δ 14,0 e δ 14,1.

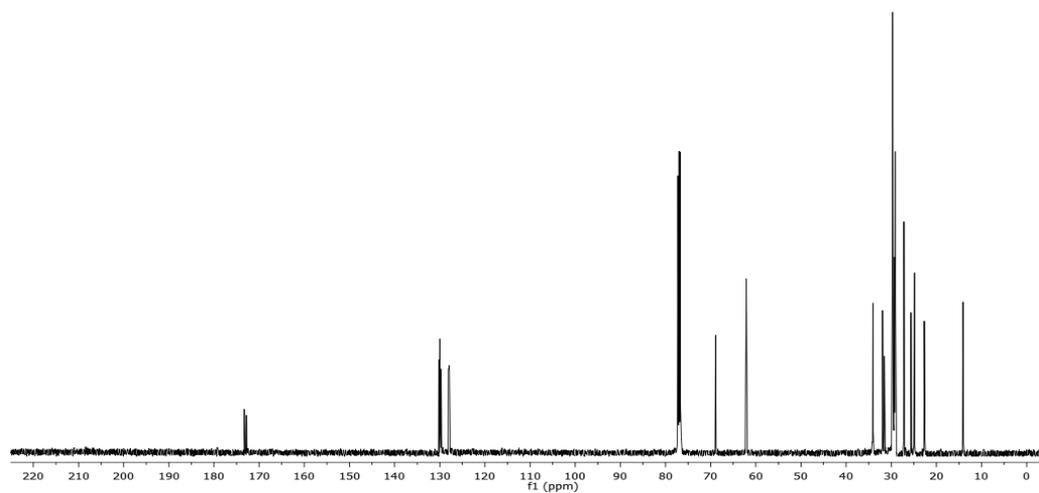


Figura 19 Espectro de RMN de ^{13}C dos triglicérides [(125 MHz), CDCl_3].

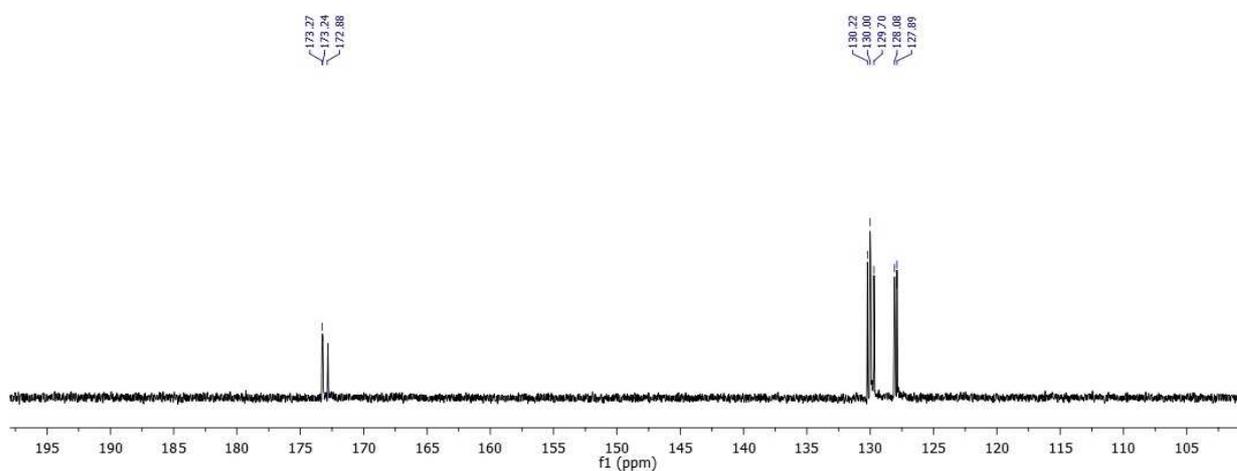


Figura 20 Sinais referentes aos carbonos carboxílicos e olefínicos.

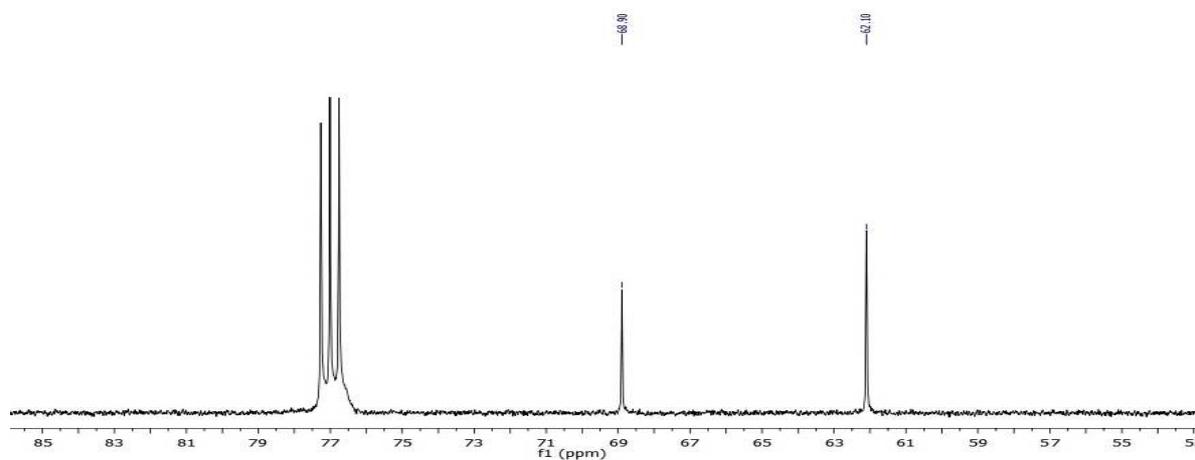


Figura 21 Sinais referentes aos carbonos do C1 e C2 do glicerol.

Tabela 13- Dados de RMN ^{13}C [125 MHz, δ (ppm)], ^1H [500 MHz, δ (ppm)]do EHSU.

Sinal	δ ^1H	δ ^{13}C
1	-	173,3
	-	172,8
2	2,31	34,1
	2,31	34,2
3	1,60	24,9
	1,60	24,9
4	1,27	29,1
	1,27	29,0
5	1,27	29,2
	1,27	29,2
6	1,27	29,1
	1,27	29,1
7	1,27	29,7
	1,27	29,6
8	2,03	27,2
	2,03	27,2
9	5,35	129,7
	5,35	130,0
10	5,35	130,0
	5,35	128,6
11	2,03	27,2
	2,77	25,6
12	1,27	29,8
	5,35	127,9
13	1,27	29,4
	5,35	130,2
14	1,27	29,7
	2,03	27,2
15	1,27	29,2
	1,27	29,2
16	1,27	31,9
	1,27	31,5
17	1,27	22,7
	1,27	22,6
18	0,88	14,1
	0,88	14,0
CHOCOR	5,26	68,9
CH ₂ OCOR	4,22	62,1

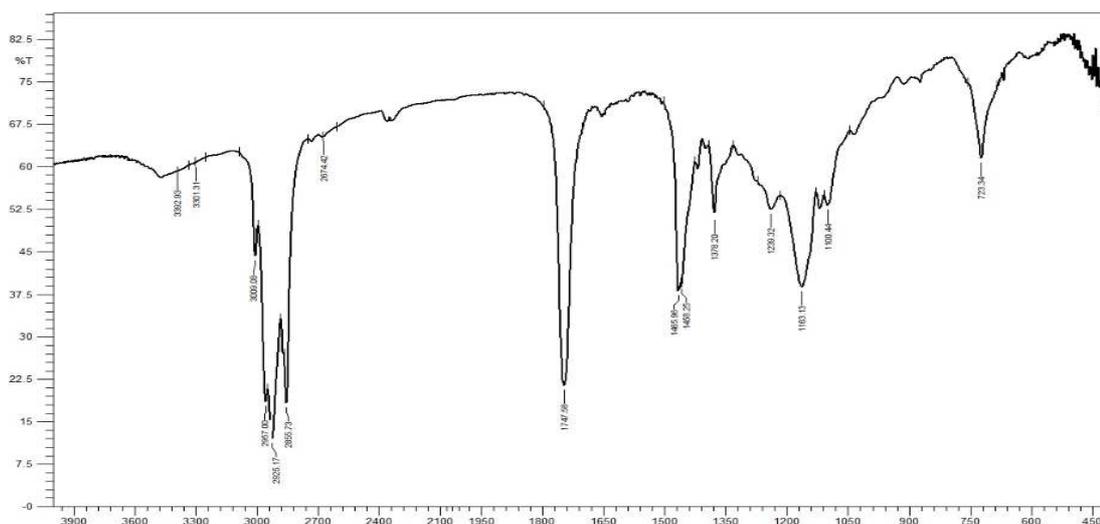


Figura 22 Espectro de IV do EHSU de semente de *S. tuberosa* (em pastilha de KBr).

O espectro no IV exibiu bandas características de vibrações de deformação axial de C_{sp2}-H em 3009 cm⁻¹, vibrações de deformação axial de C-H_{sp3} em 2957, 2925 e 2856 cm⁻¹, vibrações de deformação axial de C=O (éster) em 1748 cm⁻¹, vibrações de deformação axial C=C em 1645 cm⁻¹, vibrações de deformação angular C-H fora do plano (cis) em 723 cm⁻¹ e vibrações de deformação axial de C-O em 1163 cm⁻¹. Esses dados corroboram com os dados observados nos espectros de RMN, indicando claramente que trata-se de um triglicerídeo composto de ácidos graxos insaturados com ligação dupla em cis.

Desta forma, a amostra foi submetida à reação de obtenção de ésteres metílicos para a confirmação da composição de ácidos graxos presentes.

Após a derivatização dos triacilglicerídeos por meio da reação de hidrólise alcalina seguida de esterificação, os ésteres metílicos foram identificados por CG-MS de acordo com as fragmentações propostas a partir dos espectros de massas obtidos, em comparação com espectros existentes no banco de dados do aparelho NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8, apresentando similaridade acima de 90%, com dados descritos na literatura e também com injeção de amostras padrões (misturas de ésteres metílicos e laurato de metila).

No cromatograma foram registrados nove picos majoritários com diferentes tempos de retenção, e cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares foram em *m/z* 158, *m/z* 214, *m/z* 242, *m/z* 256, *m/z* 270, *m/z* 280, *m/z* 282, *m/z* 296 e *m/z* 298 fragmentos correspondentes ao octanoato

de metila (1), laurato de metila (3), tetradecanoato de metila (4), 12-metil-tetradecanoato de metila (2), hexadecanoato de metila (5) (ácido palmítico), 9,12-octadecadienoato de metila (ácido linoléico) (8), 9-octadecenoato de metila (ácido oléico) (9), 7-octadecenoato de metila (6) (oleato de metila), octadecanoato de metila (7) (ácido esteárico).

Tabela 14- Composição de ésteres metílicos da mistura de triglicerídeos.

Ésteres metílicos	t _R	% Total	m/z	Estrutura
Octanoato de metila	6,39	2,01	158	
12-Metil-tetradecanoato de metila	9,42	5,65	214	
Laurato de metila	10,11	0,27	242	
Tetradecanoato de metila	11,99	0,74	256	
Hexadecanoato de metila	14,29	20,48	270	
7- Octadecenoato de metila	16,45	44,82	280	
Octadecanoato de metila	16,64	12,64	282	
9,12-Octadecadienoato de metila	16,89	11,12	296	
9-Octadecenoato de metila	17,05	2,27	298	

t_R: Tempo de retenção

Assim, admite-se que a composição dos triglicerídeos presentes no EHSU seja da mistura desses ésteres, indicando que, a análise somente por RMN pode levar a equívocos quanto a composição química. A identificação deste tipo de substância é complicada, mesmo utilizando-se de técnicas de massas mais avançadas e, ainda hoje, a análise conjunta de RMN e EM do produto submetido à transesterificação é a escolha mais indicada.

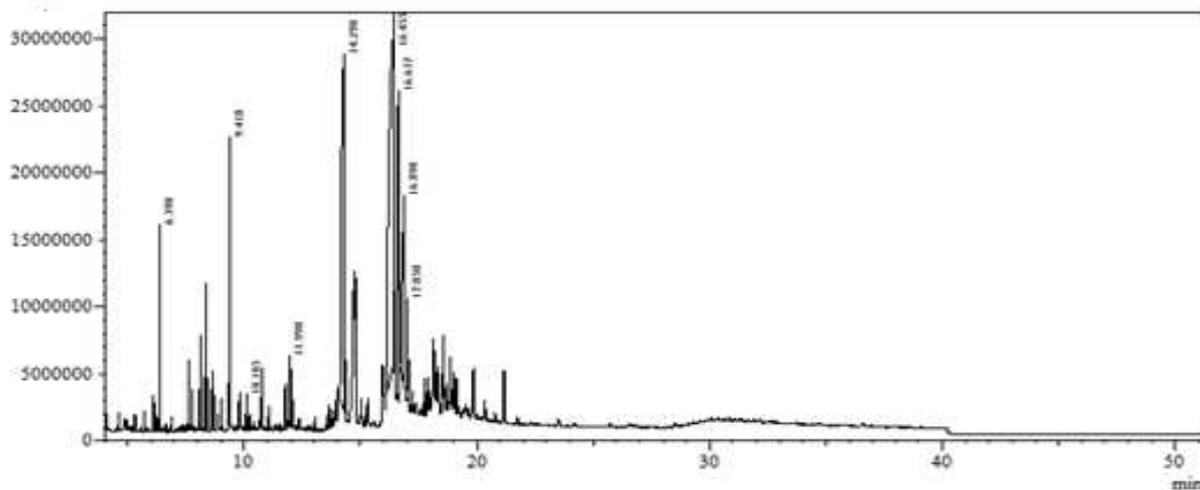


Figura 23 Cromatograma dos ésteres metílicos obtidos (coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (difetil dimetil polisiloxano) e hélio como gás de arraste).

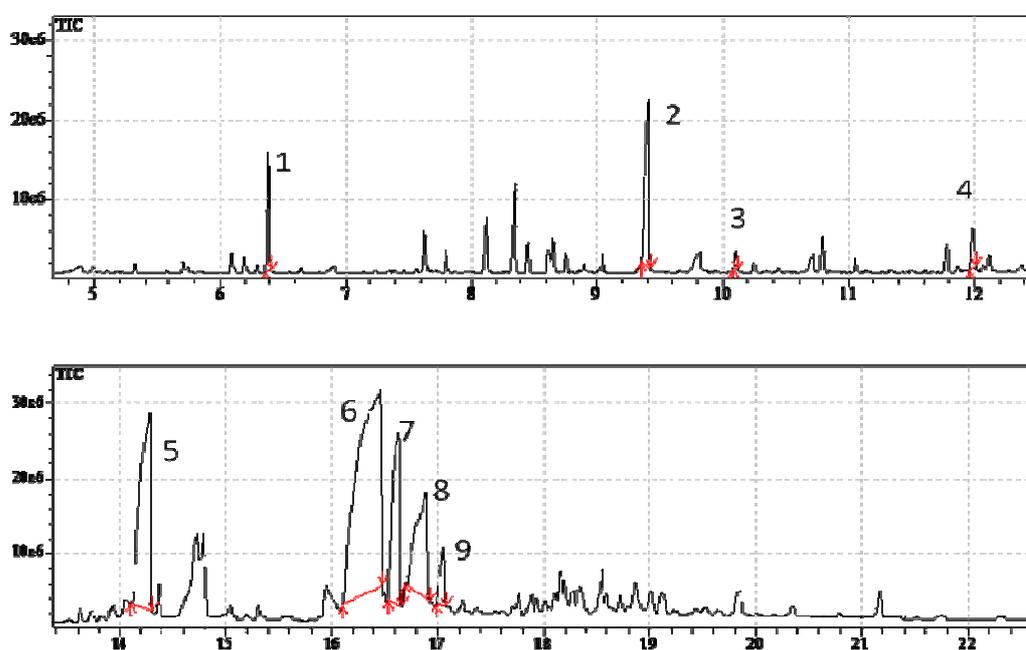


Figura 24 Ampliações do cromatograma dos ésteres metílicos (coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (difetil dimetil polisiloxano) e hélio como gás de arraste).

4.6.2 Identificação de ECSU 3.2 (2-4) (Sitosterol e Estigmasterol)

A substância **FCSU 3.2** (2-4), sólido cristalino branco, isolada da fração FCSU 3.0 [Tabela 4, pág. 20] da fase clorofórmica da semente de *S. tuberosas* após análise por CCDC e borrifamento com reagente de Lieberman Burchard, seguido de aquecimento, apresentou coloração rosa indicando a presença de substância com núcleo esteroidal ou triterpênico. Análise por RMN de ^1H e ^{13}C **FCSU 3.2** (2-4) foram suficientes para determinar com clareza que se tratava de uma mistura de esteróides pertencente à classe do colestano.

O espectro de RMN ^1H (Figura 25) apresenta dois sinais na forma de singletos, um em δ 0,68 e outro em δ 1,01 característicos de hidrogênios de grupos metílicos. Apresenta ainda dubletos e tripletos entre 0,81 a 0,93 característicos de grupos metílicos. Outro sinal em na forma de multipletto em δ 3,52 revelou a presença do hidrogênio carbinólico (H-3), bem como o dubleto em δ 5,35 (d, $J = 5,0$ Hz) de hidrogênio olefínico (H-6). O espectro de RMN ^1H sugere que FCSU 3.2 (2-4) trata-se de uma mistura de sitosterol e estigmasterol.

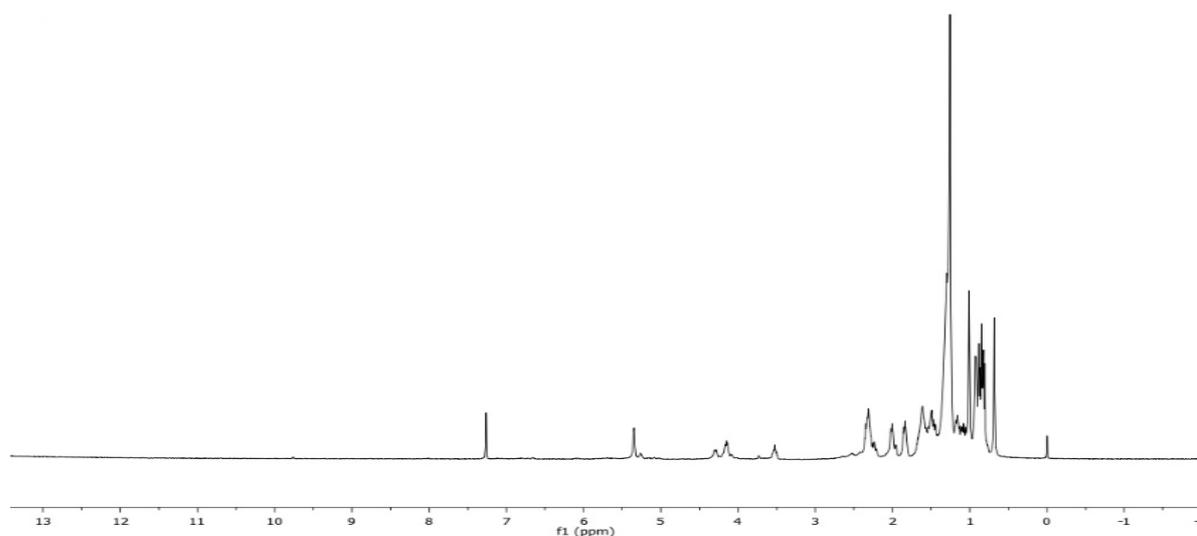


Figura 25 RMN ^1H [CDCl_3 , 500 MHz] de **FCSU 3.2**.

O espectro RMN ^{13}C (Figura 26) confirmou a presença dos carbonos olefínicos em δ 140,7 (C-5) e δ 121,7 (C-6) da ligação dupla trissubstituída do núcleo sitosterol. Outros sinais, também de carbonos olefínicos, correspondentes à ligação dupla dissustituída da cadeia lateral do estigmasterol em δ 138,2 (C-22) e δ 130,0 (C-23). Estes sinais indicam a presença a presença de sitosterol e estigmasterol na amostra em análise. O sinal em δ 71,8 foi atribuído ao C-3 carbinólico. Logo, FCSU

3.2 (2-4) está presente uma mistura de sitosterol (estigmast-5-en-3-ol) e estigmasterol (estigmast-5-en-3-ol), esteroides de núcleo colestano e predominância do sitosterol, substância muito frequente em plantas e animais (Figura 27), cujas fórmulas moleculares são $C_{29}H_{50}O$ (MM = 414) e $C_{29}H_{48}O$ (MM = 412), respectivamente. Os dados de RMN de ^{13}C encontram-se descritos na tabela 15 [página 41]. Além destes, encontram-se presentes uma mistura de triacilglicerídeos, confirmados através dos sinais 62,1(CH₂); 65,1(CH₂); 68,4(CH) e 68,9(CH) que indicam a presença de dois triacilglicerídeos (Figura 27).

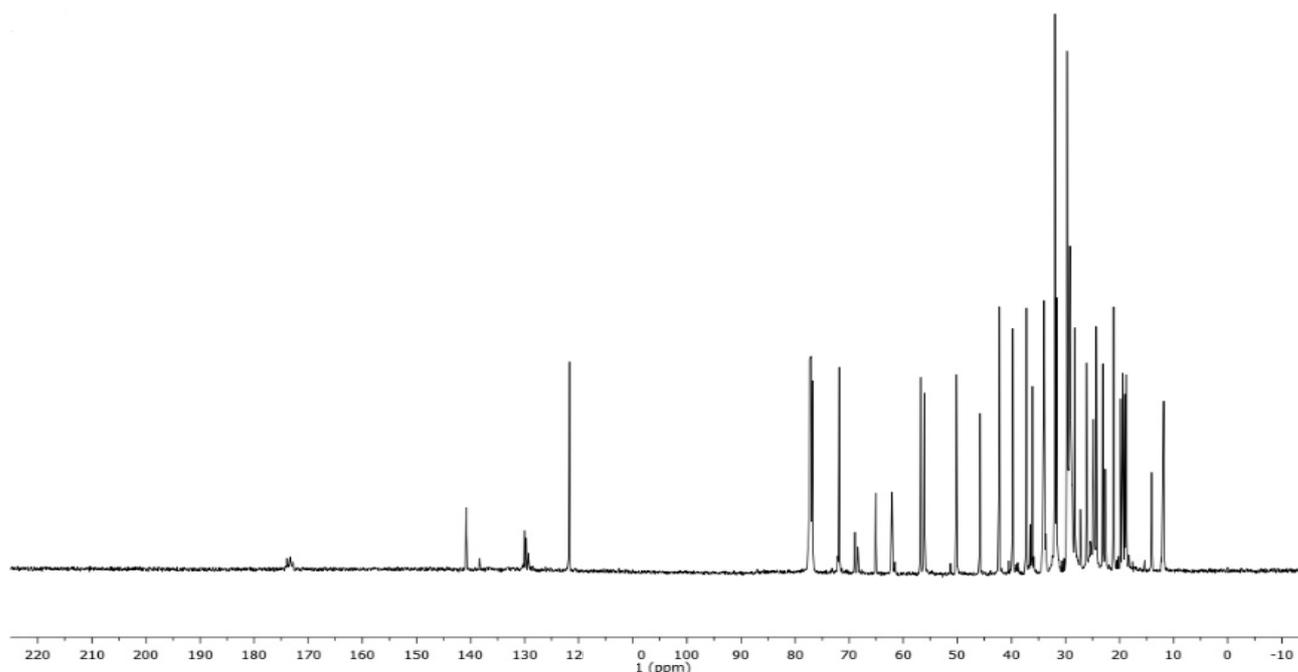


Figura 26 RMN ^{13}C [$CDCl_3$, 125 MHz δ (ppm)] **FCSU 3.2**.

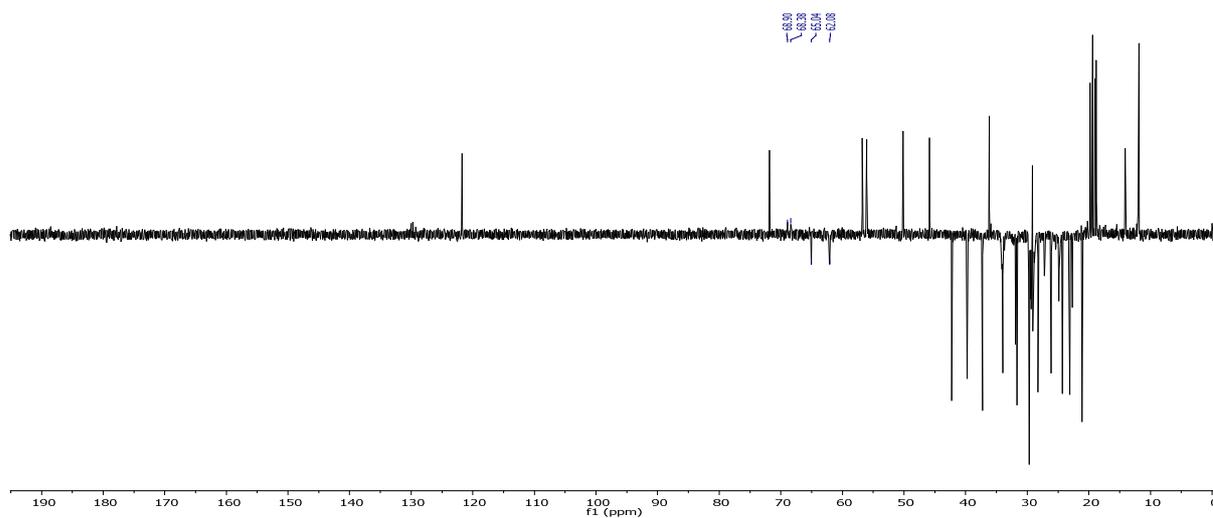


Figura 27 Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^{\circ}$ [CDCl_3 , 125 MHz δ (ppm)] FCSU 3.2.

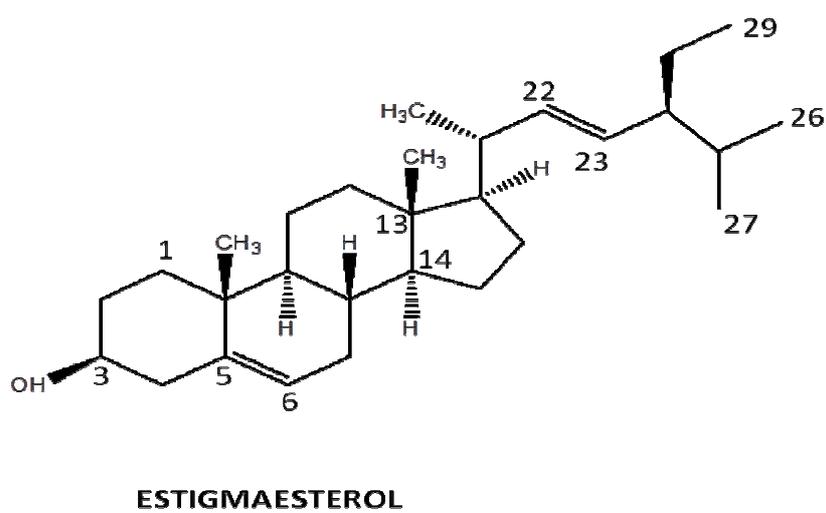
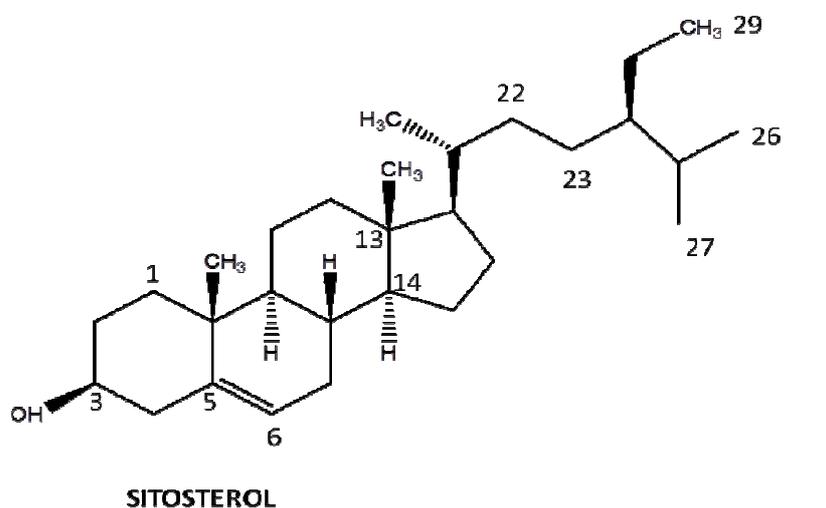


Figura 28 Esteroides isolados, em mistura, das sementes de *S. tuberosa*.

Tabela 15- Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C da **FCSU 3.2**.

Nº do C	ECSU 3.2	sitosterol*	ECSU 3.2	estigmasterol*
1	31,6	31,6	31,6	31,6
2	26,1	26,1	26,1	26,0
3	71,8	71,3	71,8	72,0
4	42,3	41,5	41,5	42,5
5	140,7	140,2	140,7	140,8
6	121,7	121,6	121,7	121,8
7	31,6	31,7	31,9	32,1
8	31,8	31,9	32,5	32,0
9	50,1	50,1	50,1	50,5
10	36,1	36,7	36,5	36,5
11	21,1	20,8	21,1	21,2
12	39,7	39,5	39,7	40,0
13	42,3	42,5	42,0	42,2
14	56,1	56,6	56,7	57,1
15	19,8	20,0	24,3	24,5
16	28,2	28,5	29,3	28,9
17	56,1	55,8	56,8	56,3
18	11,8	11,6	12,0	12,2
19	19,4	19,2	19,0	19,5
20	39,8	40,1	39,8	40,4
21	19,8	20,4	21,2	21,4
22	36,5	36,5	138,2	138,3
23	28,2	28,2	129,7	129,7
24	50,2	51,0	50,2	51,5
25	32,0	31,8	32,0	32,2
26	19,0	19,0	21,1	21,2
27	19,4	21,2	19,0	19,2
28	24,9	25,4	26,1	25,4
29	12,0	12,0	11,9	12,2

*(GOAD, 1991)

4.6.3 Identificação de FCSU 4.5

A substância **FCSU 4.5** foi isolada da subfração da fração FCSU 4.0 (22-24) com aspecto pastoso de coloração branca, das sementes de *S. tuberosa*, apresentando um comportamento cromatográfico como se fosse uma única substância. Após análise por RMN de ^1H e ^{13}C foi possível determinar que se tratava de uma mistura de ácidos graxos.

O espectro de RMN ^1H (Figura 29) apresentou sinais na região de hidrogênios metílicos, metilênicos e olefínicos. A presença do sinal em δ 5,34, integrado para dois hidrogênios, foi indicativo de hidrogênios ligados a carbono tipo sp^2 . Os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos foram registrados na região entre δ 1,26 e 2,36. Os sinais em δ 0,87, referentes aos hidrogênios metílicos, cuja integração correspondeu a quinze hidrogênios, indicou a presença de aproximadamente cinco metilas terminais. Dentre os ácidos graxos presentes, o sinal em δ 5,34 (Figura 30, 2H) indica que existe um ácido graxo insaturado.

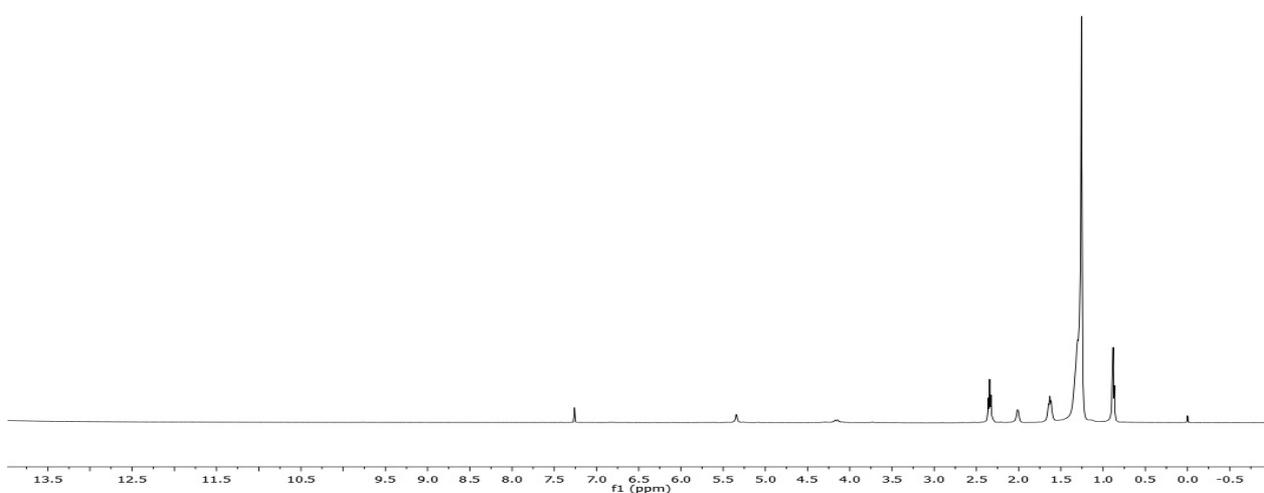


Figura 29 Espectro de RMN de ^1H da mistura de ácidos graxos.

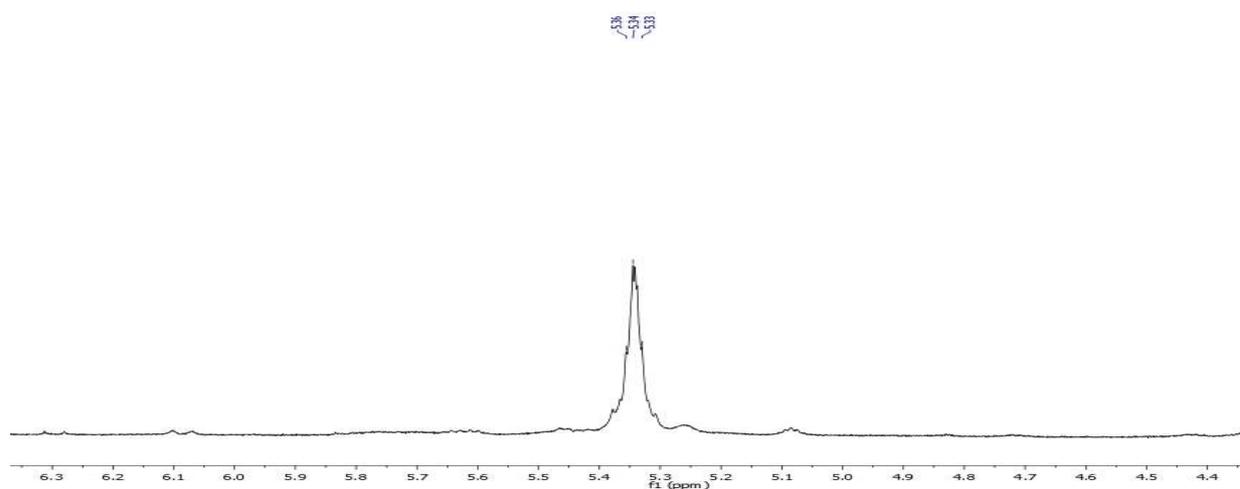


Figura 30 Ampliação do espectro de RMN de ^1H da mistura de ácidos graxos.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 32, página 45) revelou sinal em δ 179,7 para carbono carboxílico; olefínico em δ 130,0 e 129,7 (Figura 32, página 45) indicativo

da presença de ácido graxo insaturado. Carbonos com deslocamento químico em δ 34,0 correspondem aos grupos α -metilênicos em relação à carboxila; carbonos de grupos CH_2 saturados encontram-se em δ 31,9 a 22,7; os carbonos metilênicos (CH_2) externos à $\text{C}=\text{C}$, estão em δ 27,2; os carbonos β -carboxílicos são observados em δ 24,9 e as metilas foram observadas em δ 14,1 (Figura 33).

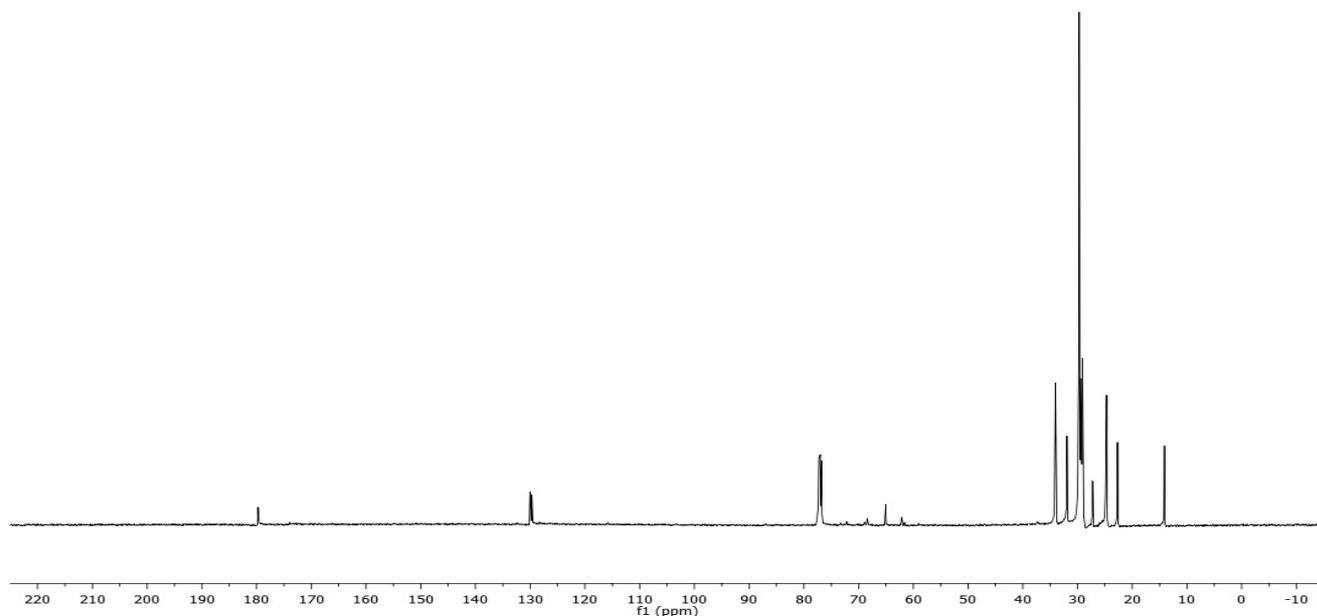


Figura 31 Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de ácidos graxos.

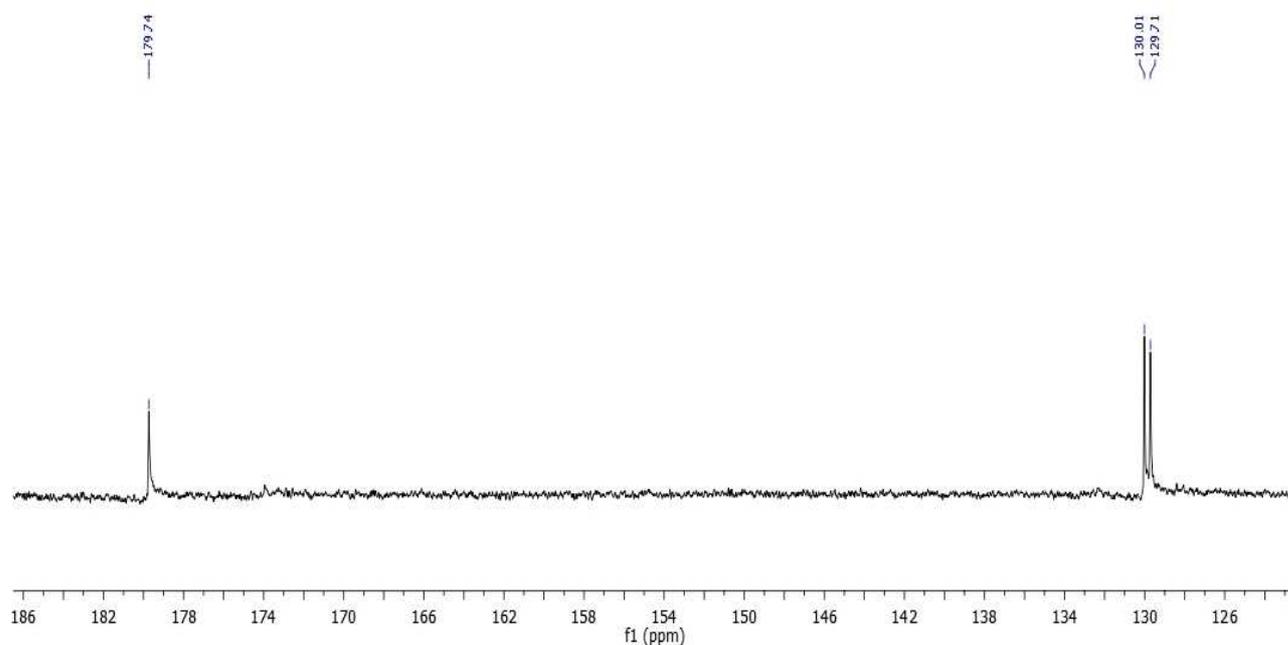


Figura 32 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C FCSU 4.5.

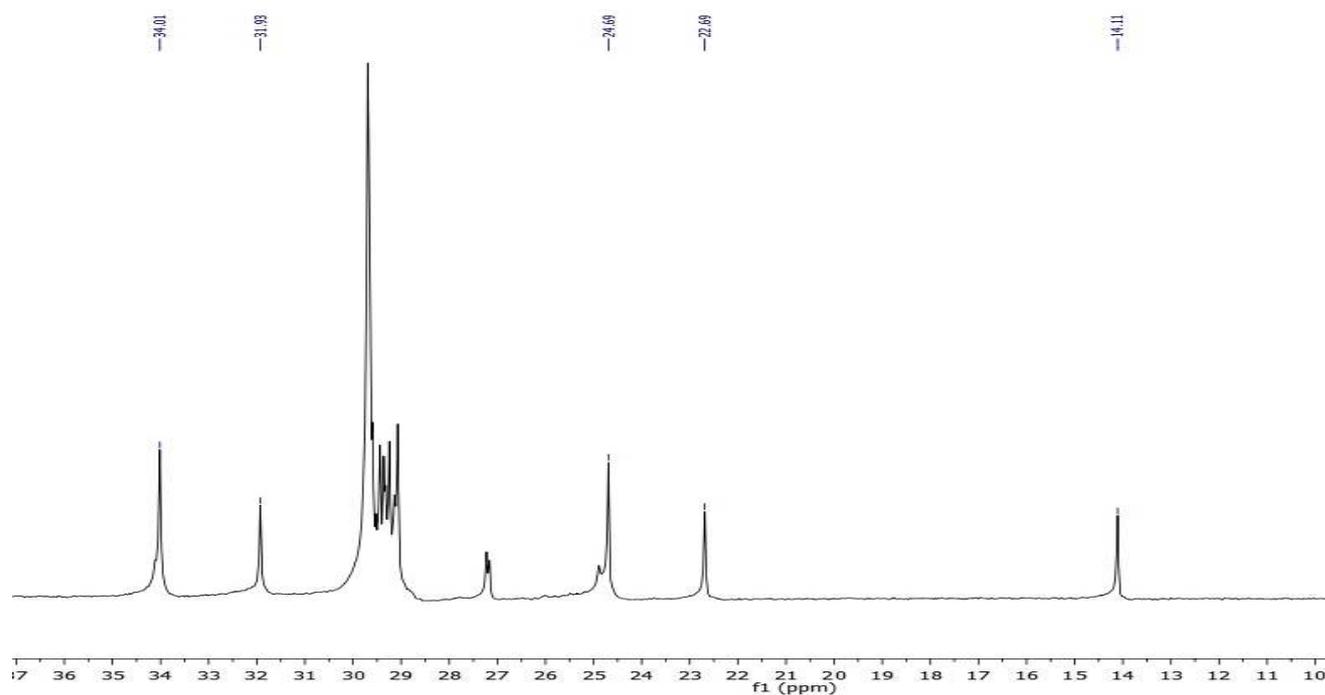


Figura 33 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C FCSU 4.5.

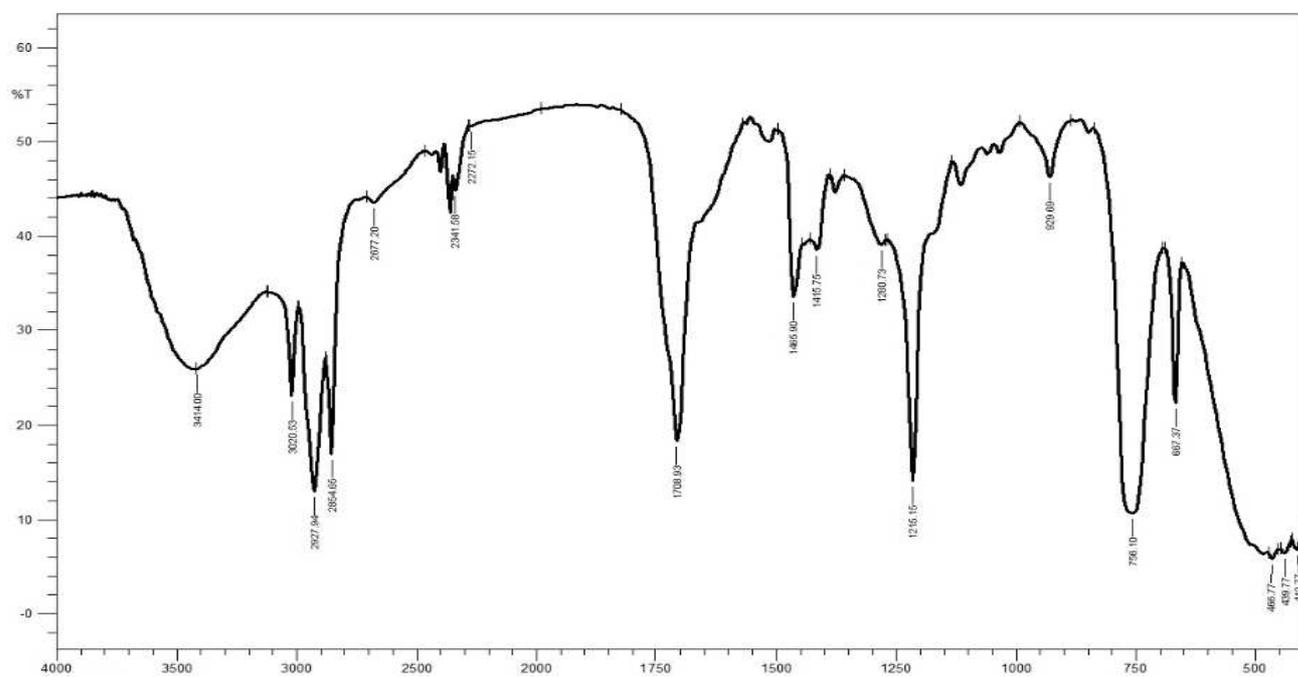


Figura 34 Espectro de IV da mistura de ácidos graxos (em filme).

O espectro no IV exibiu bandas características de vibrações de deformação axial do O-H em 3414 cm^{-1} , vibrações de deformação axial C-H_{sp²} em 3021 cm^{-1} , vibrações de deformação axial de C-H_{sp³} em 2928 e 2855 cm^{-1} , vibrações de deformação axial de C=O (ácido carboxílico) em 1709 cm^{-1} , vibrações de deformação angular C-H fora do plano (cis) em 756 cm^{-1} e vibrações de deformação axial de C-O em 1215 cm^{-1} . Esses dados corroboram com os dados observados nos espectros de RMN, indicando claramente que trata-se de uma mistura de ácidos graxos e que pelo menos um deles possui uma dupla ligação em *cis*.

A amostra **FCSU 4.5** foi submetida à reação de obtenção de ésteres metílicos conforme descrito na metodologia apresentada na página 10.

Os ésteres metílicos derivados de ácidos graxos foram submetidos a análise por CG-EM obtendo-se fragmentações propostas a partir dos espectros de massas, em comparação com espectros existentes no banco de dados do aparelho NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8, apresentando similaridade acima de 90%, com dados descritos na literatura e também com injeção de amostras padrões (misturas de ésteres metílicos).

No cromatograma (Figura 35) foram registrados onze picos majoritários com diferentes tempos de retenção, e cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares foram em m/z 270, m/z 296, m/z 296, m/z 298, m/z 298, m/z 326, m/z 370, m/z 330, m/z 466, m/z 382 e m/z 410 fragmentos correspondentes ao hexadecanoato de metila (1), 10-octadecenoato de metila (2), 16-octadecenoato de metila (3), Octadecanoato de metila (4), 9,12-octadecadienolato de metila (5), Eicosanoato de metila (6), O-isopropil-elaidato de metila (7), 9,10-dihidroxi-octadecanoato de metila (8), Triacotanoato de metila (9), Tetracosanoato de metila (10) e Hexacosanoato de metila (11).

Tabela 16- Composição de ésteres metílicos da mistura de ácidos graxos.

Ésteres metílicos	t _R	% Total	m/z	Estrutura
Hexadecanoato de metila	16,27	39.93	270	
10-Octadecenoato de metila	18,40	21.79	296	
16-Octadecenoato de metila	18,44		296	
Octadecanoato de metila	18,71	15.50	298	
9,12-Octadecadienolato de metila	19,41	2.88	298	
Eicosanoato de metila	20,83		326	
o-Isopropil - elaidato de metila	21,04		370	
9,10-Dihidroxi-octadecanoato de metila	21,89		330	
Triacotanoato de metila	23,46	4.10	466	
Tetracosanoato de metila	27,53	4.81	382	
Hexacosanoato de metila	32,36		410	

t_R= tempo de retenção

Assim, admite-se que a composição dos ácidos graxos presentes na amostra **FCSU 4.5** seja da mistura desses ésteres.

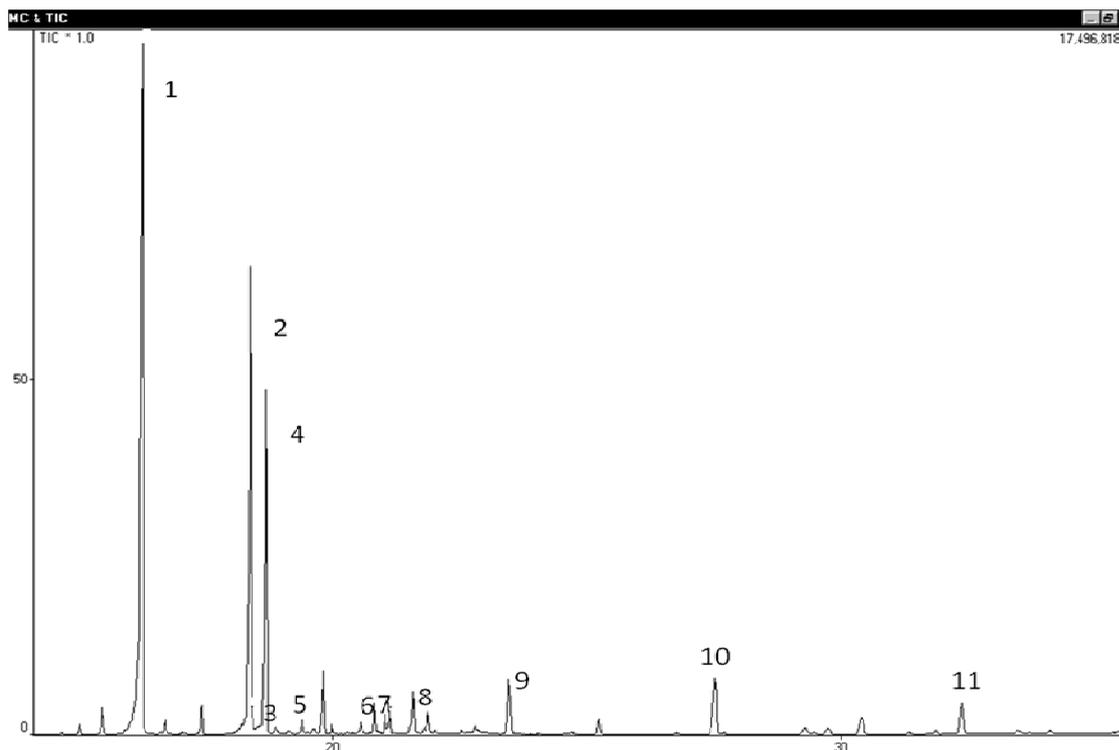


Figura 35 Cromatograma dos ésteres metílicos obtidos da **FCSU 4.5** (coluna ZB-5ms (apolar 5% phenyl Arylene 95% dimethylpolysiloxane) e hélio como gás de arraste).

4.6.4 Identificação de FASU 1.2

A determinação estrutural **FASU 1.2** foi baseada na análise dos dados de RMN de ^1H e correlações observadas em técnicas de RMN bidimensionais HMQC e HMBC, além da comparação com dados da literatura.

O espectro de RMN ^1H de **FASU 1.2** (Figura 36) apresentou um dubletos em δ 7,5 e um duplo triplete em δ 6,6 característicos de hidrogênios olefínicos, integrando para um hidrogênio cada (H-3 e H-4 respectivamente). Sinal em δ 9,54 na forma de singlete, integrando para um hidrogênio, sendo indicativo de hidrogênio da função aldeído. Além disso, verifica-se um singlete em δ 4,5, integrando para dois hidrogênios, correspondentes aos hidrogênios metilênicos.

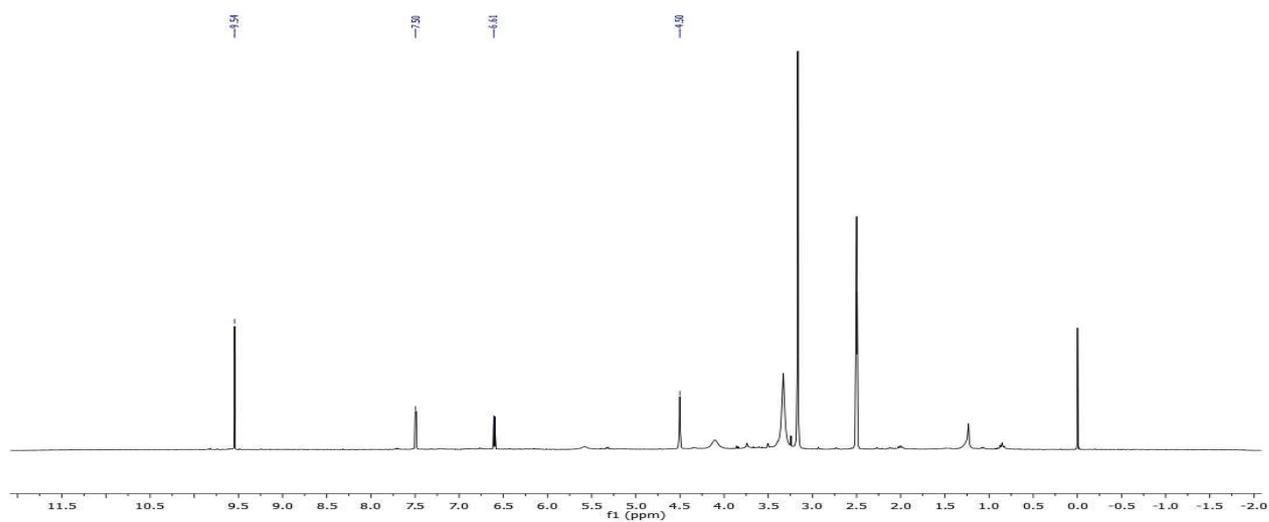


Figura 36 Espectro de RMN de ^1H [300 MHz, DMSO-d^6] do **FASU 1.2**.

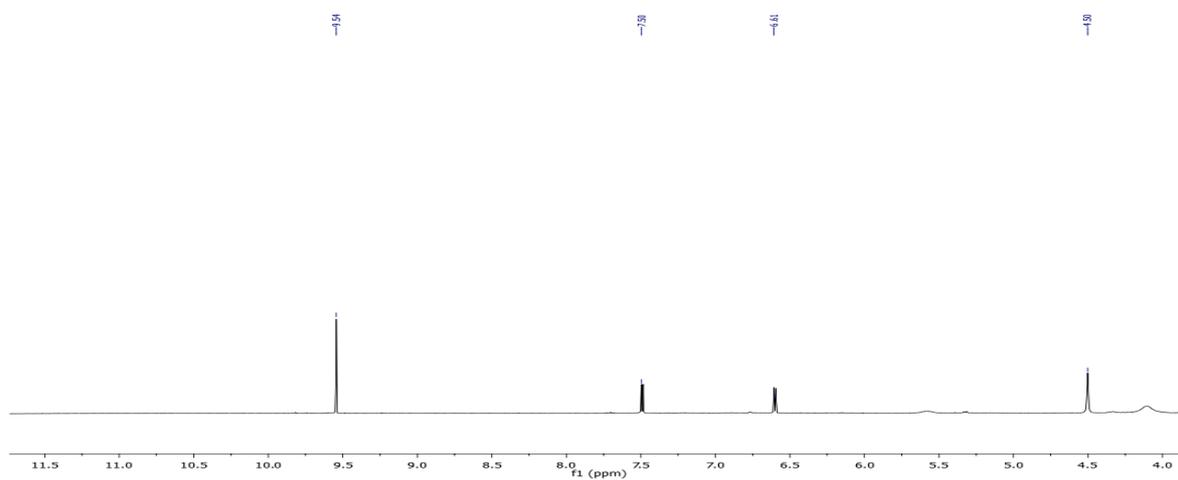


Figura 37 Ampliação do espectro de RMN de ^1H do **FASU 1.2**.

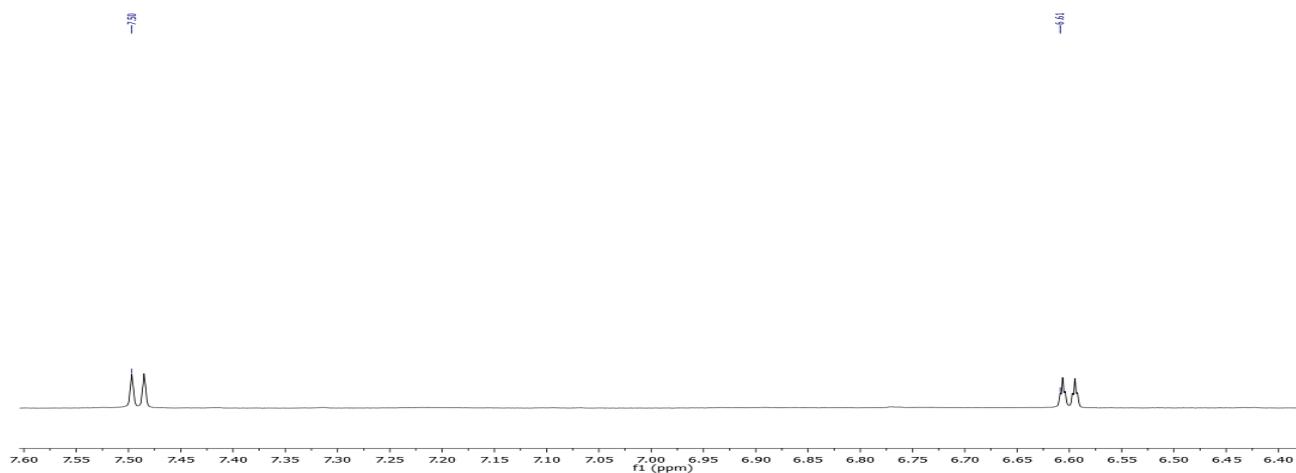


Figura 38 Ampliação do espectro de RMN de ^1H do **FASU 1.2**.

As correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) **FASU 1.2** corroboraram para elucidação e determinação estrutural desta substância. As correlações observadas no espectro de HMQC (Tabela 17) permitiram correlacionar os sinais dos hidrogênios com seus respectivos carbonos. Dentre as principais informações obtidas no espectro bidimensional HMQC pode-se destacar a correlação de H-3 (δ 7,5) com o C-3 (δ 125,0), H-4 (δ 6,6) com o C-4 (δ 110,0), os hidrogênios metilênicos (δ 4,5) com seu respectivo carbono (δ 56,0) e hidrogênio da função aldeído (δ 9,5) com o carbono carbonílico (δ 178,0).

Tabela 17- Dados de RMN ^1H [300 MHz] e de ^{13}C [125 MHz] [DMSO- d_6 , δ (ppm)].

Posição	^1H FASU 1.2	$^{13}\text{C}^*$ FASU 1.2	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
2	---	152,0		150,5
3	7,5 (d)	125,0	7.4	123,9
4	6,6 (d)	110,0	6.6	108,6
5	---	162,0	---	161,1
-CH ₂ OH	4,5 (s)	56	4.6	54,7
-CHO	9,5 (s)	178,0	9.4	177,1

*Atribuído através do HMQC; ^aA. Serra-Cayuela *et al.*,2013; ^bKhokhlova *et al.*,2013

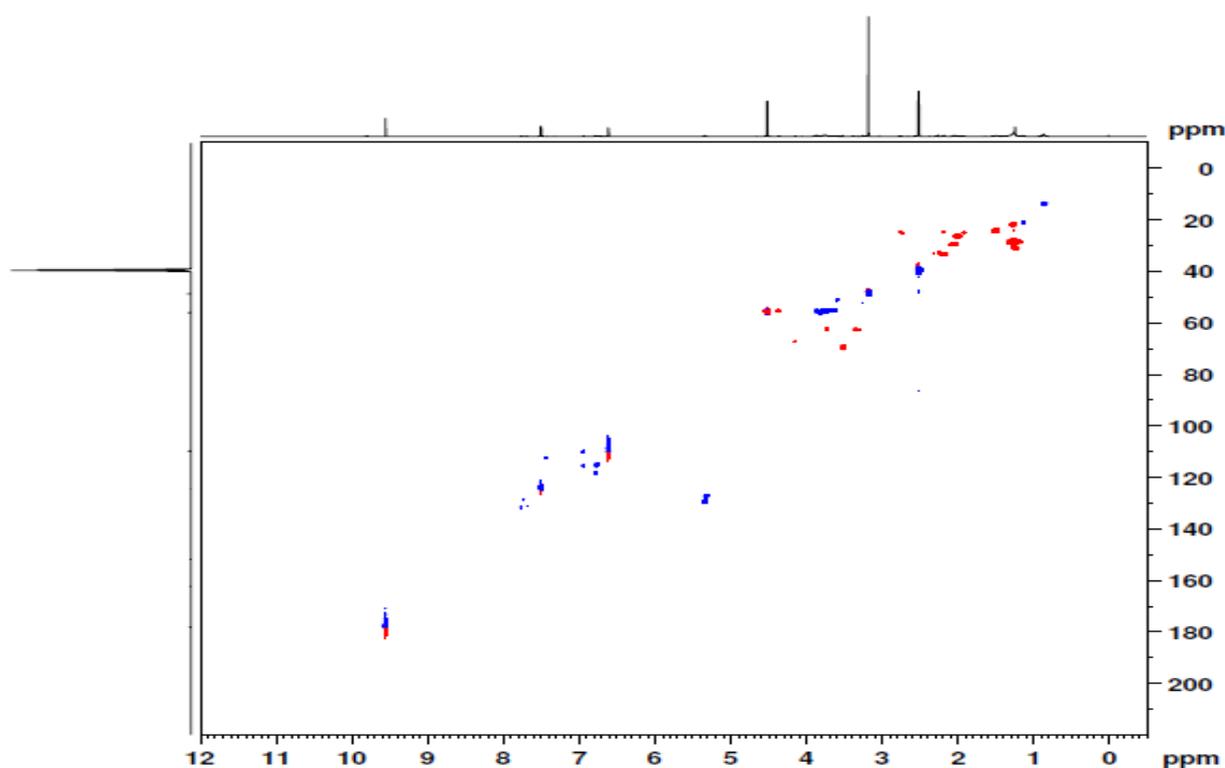


Figura 39 Espectro de HMQC ^1H - ^{13}C de **FASU 1.2**.

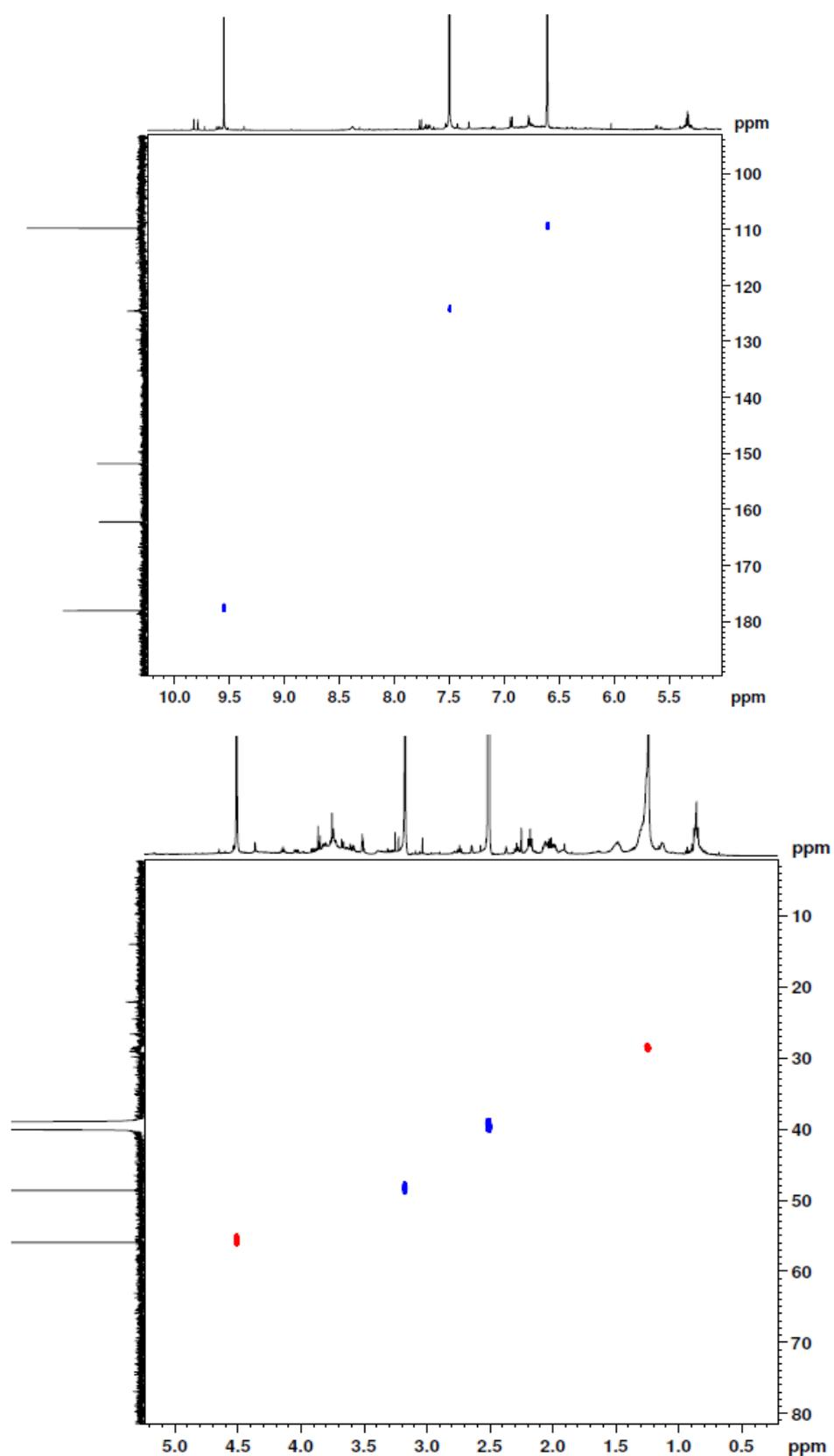


Figura 40 Ampliações do espectro de HMQC ^1H - ^{13}C de FASU 1.2.

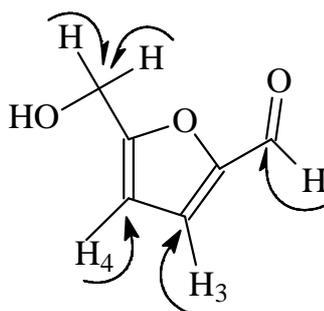


Figura 41 Correlações observadas no HMBC de **FASU 1.2**.

No espectro de RMN HMQC ^1H - ^{13}C (Figura 40) foram observados alguns sinais que não condizem com a estrutura proposta, provavelmente devido a impurezas presentes na amostra.

Análise dos espectros bidimensionais HMBC (Figuras 42, 43, 44 e 45) indicou que o hidrogênio da função aldeído encontrava-se correlacionado com os carbonos C-2 (δ 152,0) e carbono carbonílico (δ 178,0). Foram observados as correlações dos hidrogênios olefínicos H-3 (δ 7,5) e H-4 (δ 6,6) com os carbonos C-2 (δ 152,0), C-4 (δ 110,0) e C-5 (δ 162,0); além dos hidrogênios metilênicos (δ 4,5) que se correlacionavam com os carbonos C-4 (δ 110,0) e C-5 (δ 162,0). Portanto, as correlações obtidas através dos espectros bidimensionais permitiram atribuir corretamente os sinais e confirmar a localização dos grupos substituintes.

Tabela 18- Acoplamentos observados no HMBC de **FASU 1.2**.

HMBC	
RMN ^1H	RMN ^{13}C
7,5 (H-3)	110,0 (C-4); 152,0 (C-2) e 162,0 (C-5)
6,6 (H-4)	110,0 (C-4); 152,0 (C-2) e 162,0 (C-5)
4,5 (-CH ₂ OH)	110,0 (C-4) e 162,0 (C-5)
9,5 (-CHO)	178,0 (-CHO) e 152,0 (C-2)

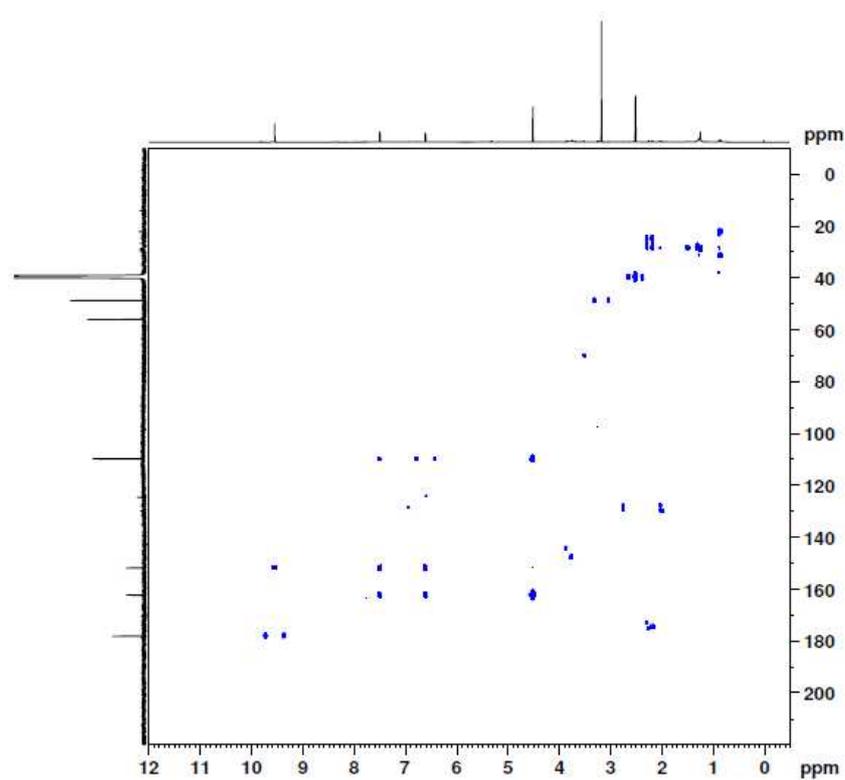


Figura 42 Espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C de FASU 1.2.

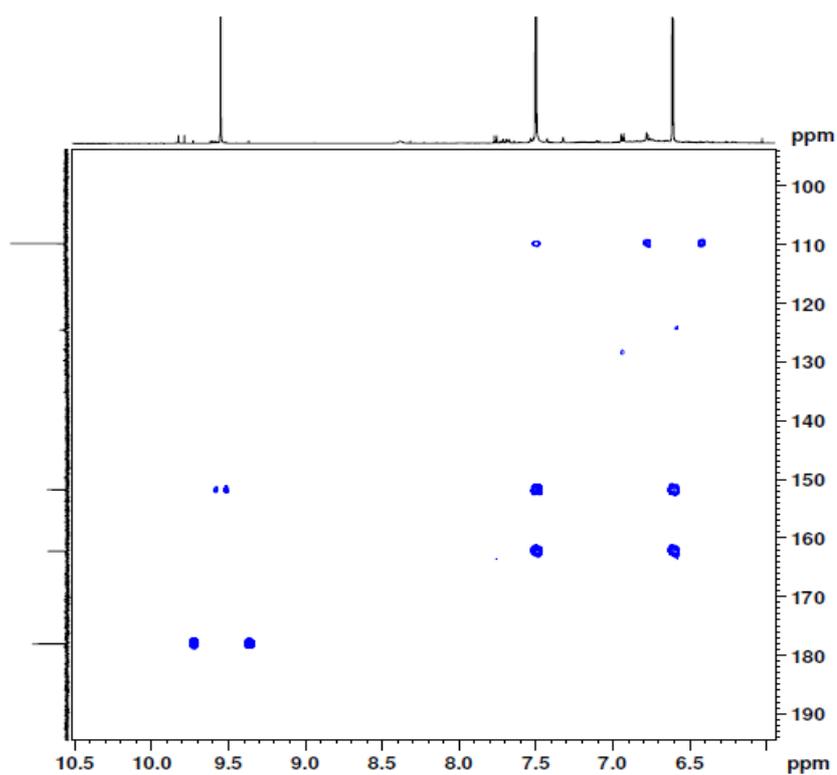


Figura 43 Ampliações do espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C de FASU 1.2.

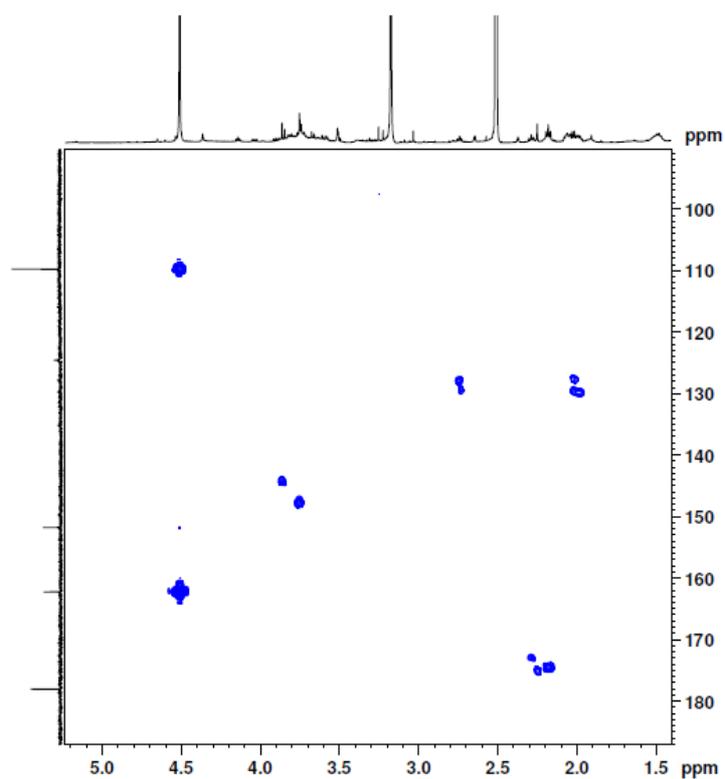


Figura 44 Ampliações do espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C de FASU 1.2.

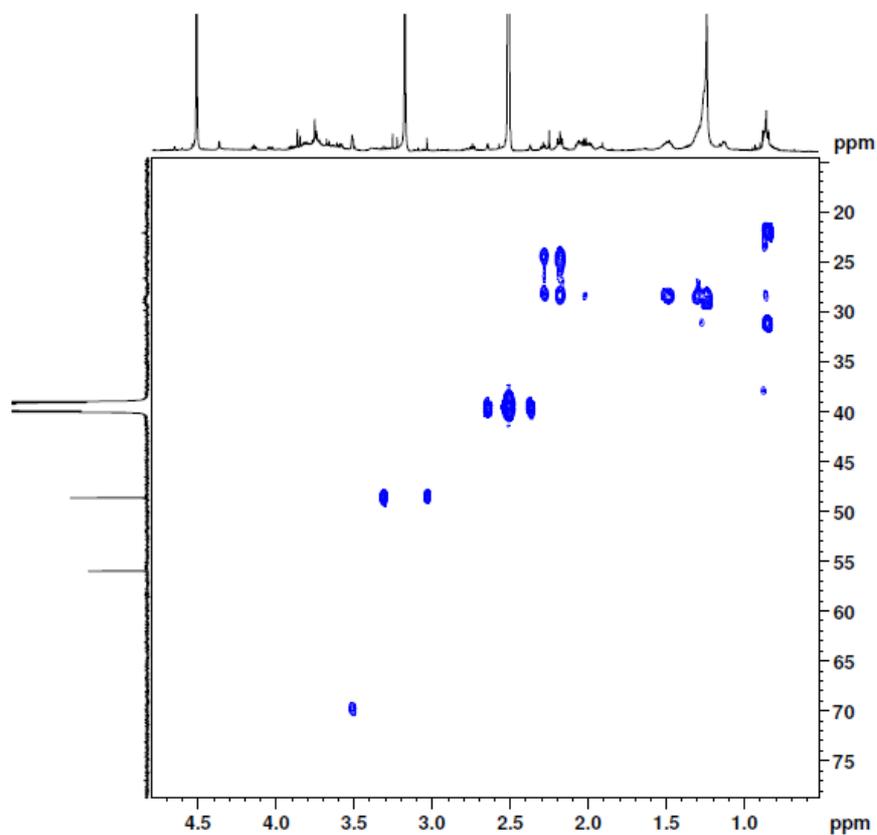


Figura 45 Ampliações do espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C de FASU 1.2.

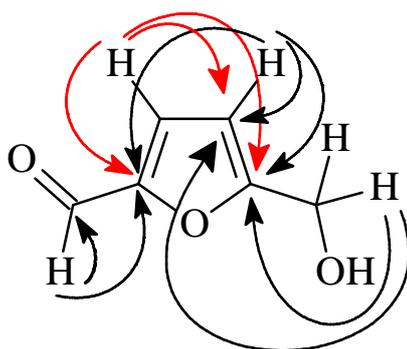


Figura 46 Correlações observadas no HMBC de **FASU 1.2**.

Assim, através da análise dos dados e comparação com a literatura foi possível denominar o **FASU 1.2** como 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF), relatada pela primeira vez na espécie *Spondias tuberosa*. Vale ressaltar que já existe relato sobre essa substância em extratos de diferentes solventes do fruto de *Spondias pinnata* K. (SATPATHY *et al*, 2011) onde o 5-HMF foi identificado através da técnica analítica de CG/MS. Foi relatado também a presença desse composto no extrato AcOEt da polpa da *Spondias aff. Tuberosa* (ALMEIDA *et al*, 2006) apresentando uma notável atividade antioxidante (SRL 90%), o mesmo foi identificado também em amostras de vinho Cava sparkling (SERRA-CAYUELA, *et al.*, 2013) mostrando-se neste trabalho um potencial confiável em relação a redução de oxidação no processo de envelhecimento de vinhos espumantes. Dados literários revelam que o 5-HMF possui várias atividades biológicas, incluindo antioxidantes, anti-miocárdicos, isquemia e um ótimo potencial para controle de hemorragia (ITO, T. *et al.*, 2013). A substância 5-HMF pode ser obtida por decomposição de açúcares como por exemplo, a conversão de glucose e frutose através de reação de desidrogenação catalítica (KHOKHLOVA *et al.*, 2013).

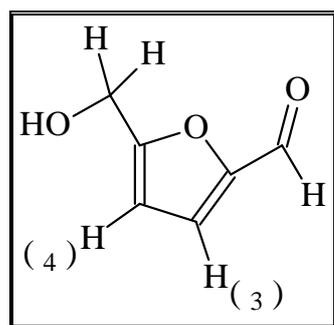


Figura 47 5-hidroximetil-2-furfural isolado das sementes da *S. tuberosa*

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho, o extrato metanólico bruto (CL_{50} 168,3 $\mu\text{g/mL}$) apresentou moderada toxicidade quando testado frente *Artemia salina*, enquanto o extrato hexânico (CL_{50} de 6259,8 $\mu\text{g/mL}$) se apresentou atóxico. Por outro lado, a fase clorofórmica (CL_{50} 152,26 $\mu\text{g/mL}$), obtida da partição líquido-líquido do extrato metanólico, também foi testada apresentando toxicidade moderada. Já para as atividades antioxidantes observa-se que o extrato metanólico apresentou uma atividade de sequestro de radical DPPH eficaz somente a partir de 1,5 mg/mL. A fase clorofórmica apresentou atividade inferior a 60% mesmo em concentração superior a 1,5 mg/mL, tendo então uma fraca ação antioxidante em relação aos resultados mostrados pelo extrato metanólico. Porém, a fase AcOEt mostrou uma atividade eficaz a partir 200 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, em concentrações menores do que as concentrações testadas pela fase CHCl_3 . Quanto ao teste inibição da auto-oxidação do β -caroteno o extrato metanólico mostrou um elevado percentual de inibição a partir da concentração 200 $\mu\text{g/mL}$. A fase AcOEt apresentou elevada atividade em todas as concentrações, enquanto a fase clorofórmica demonstrou elevado percentual de inibição somente na concentração 500 $\mu\text{g/mL}$.

Assim, conclui-se que a forte ação antioxidante apresentada no extrato metanólico deve-se à presença de substâncias antioxidantes presentes na fase acetato de etila.

A partir do extrato hexânico obteve-se uma mistura de triacilglicerídeos. Os ésteres obtidos através da transesterificação apontam como constituintes nove compostos esterificados dentre eles o octanoato de metila, laurato de metila, hexadecanoato de metila (ácido palmítico), tetradecanoato de metila, 9-octadecenoato de metila (ácido oléico), octadecanoato de metila (ácido esteárico), 12-metil-tetradecanoato de metila, 7-octadecenoato de metila e o 9,12-octadecadienoato de metila (ácido linoléico).

A partir do fracionamento da fase CHCl_3 foi obtido uma mistura de esteroides de núcleo colestano conhecido como sitosterol e estigmansterol, além de uma mistura de ácidos graxos que foi submetida à reação de esterificação obtendo-se onze ésteres metílicos denominados de hexadecanoato de metila, 10-octadecenoato

de metila, 16-octadecenoato de metila, Octadecanoato de metila, 9,12-octadecadienolato de metila, Eicosanoato de metila, O-isopropil-elaidato de metila, 9,10-dihidroxi-octadecanoato de metila, Triacotanoato metila, Tetracosanoato de metila e Hexacosanoato de metila.

Para o fracionamento da fase AcOEt obteve-se o 5-hidroximetil-2-furfural.

Vale ressaltar que este trabalho relata pela primeira vez o estudo químico e atividades biológicas das sementes de *Spondias tuberosa*, contribuindo, assim, para ampliar as informações referentes ao estudo químico de espécies da família Anacardiaceae, podendo gerar impacto científico e acadêmico que serão medidos a partir de publicações científicas advindas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Estudo da composição química e atividade antioxidante dos frutos da *Manilkara zapota* (sapoti) e *Spondias aff. tuberosa* (cajá-umbu), **29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia- SP, 2006.

ALMEIDA, F. A. C. Quebra de dormência em sementes de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). **Revista Nordestina de Armazenamento**, Campina Grande, v. 4, p. 3-18, 1987.

AYOKA *et al.* Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 166-175, 2006.

ANDERSON, J. E.; GOETZ, A. Blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens. **Phytochemical Analysis**, v.2, p. 107-111, 1991.

BARRETO L. S.; CASTRO M. S. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do umbu. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2010. p.64.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BORGES *et al.* CHEMICAL COMPOSITION OF UMBU (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) SEEDS. **Química Nova**, v. 30, 49-52, 2007

BORGUINI, R. G. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. **Tese de Doutorado**, 178f., 2006.

CAVALCANTI, N. B., RESENDE, G. M. DE, BRITO, L. T. L. Processamento do fruto do imbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). **Ciências agrotécnicas**. v.24, n.1, p.252-259, 2000.

COATES *et al.* SB-202742, a novel β -lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 654-657, 1994.

CORTHOUT *et al.* Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-1130, 1991.

CORTHOUT *et al.* Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1979-1981, 1992.

CORTHOUT *et al.* Antibacterial and Molluscicidal Phenolic Acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, n.5, p. 460-463, 1994.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1287-1300, 2006.

COSTA *et al.* Caracterização físico-química de frutos de umbuzeiro. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 2, p. 65-71, 2004.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. M.; SILVA, E. S.; DAVID, J. P.; LOPES, L. M. X.; GUEDES, M. L. S.; Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de *Tapirira guianensis*. **Química nova**, v. 31, p.1-4, 2008.

DOLABELA, M. F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-*Trypanossoma Cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Belo Horizonte: UFMG, 1997. 128 p. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DUARTE-ALMEIDA *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

MELO, E. DE A.; ANDRADE, R. A. M. S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.

FEITOSA, S. dos S. Nutrição mineral e adubação da cajazeira (*Spondias mombin* L.) na Zona da Mata Paraibana. **Dissertação** (Solos e Nutrição de Plantas), Areia/PB, 50p., 2007.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press: 3ª ed. **1971**.

GUILLÉN^a, M. D.; RUIZ, A. Edible oils: discrimination by ¹H nuclear magnetic resonance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 338-346, 2003.

GUILLÉN^b, M. D.; RUIZ, A. ¹H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 502-507, 2003.

GUNSTONE, F. D.; ISMAIL, I. A. Fatty Acids, Part 15. Nuclear magnetic resonance spectra of the *cis*-octadecenoic acids and of some acetylenic acids. *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 337-340 (1967).

GUNSTONE, F. D. ¹³C-NMR Spectroscopy of fatty acids and derivatives.
www.lipidlibrary.co.uk

GOAD, L. J. **Phytoosterols**, In: Charlwood, B. V. and Bathorpe, D. V. (Eds). *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press. London, 1991.

ITO, T. *et al.* Isolation, Structural Elucidation, and Biological Evaluation of a 5-Hydroxymethyl-2-furfural Derivative, Asfural, from Enzyme-Treated Asparagus Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9155–9159, 2013.

IUCN, *Plants in danger*. How do we know? Gland. Switzerland and Cambridge. 1986.

KHOKHLOVA, E. A.; KACHALA, V. V.; ANANIKOV, V. P. Conversion of carbohydrates to 5-hydroxymethylfurfural: the nature of the observed selectivity decrease and microwave radiation effect. **Russian Chemical Bulletin**, v. 62, p. 830-835, 2013.

LIMA, L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, L. S. & NASCIMENTO, P. P. Caracterização físicoquímica e sensorial de pitanga roxa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 22, p. 382-385, 2000.

MARTINS, S.T.; MELO, B. Spondias (cajá e outras). Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, MG. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/cajá.html>.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, M. C.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora *Vascular do Cerrado*. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 289-556, 1998.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, vol. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MELO *et al.* Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MITCHELL, J.D.; DALY, D.C. Revisão das espécies neotropicais de *Spondias*

(Anacardiaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46. São Paulo. Anais. São Paulo: Universidade de São Paulo: SBB, 1995. p.207.

NADIA, T. L. *et al.* Polinização de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) e análise da partilha de polinizadores com *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), espécies frutíferas e endêmicas da caatinga. **Revista Brasil. Bot.**, v.30, n.1, p.89-100, 2007.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. **Dissertação de Mestrado**. ESALQ/USP, 106f., 2009.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. A Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 na análise de óleos vegetais termo-oxidados. **Revista Analytica**, n. 31, 2007.

SATPATHY, G.; TYAGI, Y. K.; GUPTA, R. K. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. **Food Research International**, v. 44, p. 2076-2087, 2011.

SACRAMENTO, C.K.; SOUZA, F.X. *Cajá* (*Spondias mombin* L.). Jaboticabal: Funep,(Série Frutas Nativas, 4), p.42, 2000.

SERRA-CAYUELA, A. *et al.* Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3373-3380, 2013.

SILVA, O. N.; CHINALIA L. A.; PAIVA, J. G. A. De. Caracterização histoquímica dos folíolos de *spondias tuberosa* arruda (anacardiaceae lindl.). **Revista Caatinga**, v.21, n.3, p.62-68, 2008.

SILVA, G. A. *et al.* avaliação da letalidade e atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Spondias mombin aff. Tuberosa*. **Revista Facider**, v.1, 2012.

SKORUPA, L.A.; VIEIRA, R. F. Coleta de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. Fundamentos para coleta de germoplasma vegetal. Brasília: Embrapa – Cenargen, 2002.

SHIAO, T.-Y.; SHIAO, M.-S. Determination of fatty acid compositions of triacylglycerols by high resolution NMR spectroscopy. **Botanic Bulletin Academia Sinica**, v. 30, p.191-199, 1989.

VILELA, S. B.; ANTUN, M. C. M .; CÁSSIA, R. M. G.; BRITO, N. C. CHEMICAL COMPOSITION OF UMBU (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) SEEDS. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 49-52, 2007.