



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DO RESÍDUO SÓLIDO E DO HIDROLATO DOS  
RIZOMAS DE PRIPRIOCA (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*,  
CYPERACEAE) CULTIVADA EM SANTARÉM-PA, BRASIL**

**ALINE APARECIDA MÜNCHEN KASPER**

**Santarém, Pará  
Fevereiro, 2016**

**ALINE APARECIDA MÜNCHEN KASPER**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DO RESÍDUO SÓLIDO E DO HIDROLATO DOS  
RIZOMAS DE PRIPRIOCA (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*,  
CYPERACEAE) CULTIVADA EM SANTARÉM-PA, BRASIL**

**ORIENTADOR: LAURO EUCLIDES SOARES BARATA  
CO-ORIENTADORA: KELLY CHRISTINA FERREIRA CASTRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, junto ao Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.  
Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará  
Fevereiro, 2016**

# **ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO RESÍDUO SÓLIDO E DO HIDROLATO DOS RIZOMAS DE PRIPRIOCA (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*, CYPERACEAE) CULTIVADA EM SANTARÉM-PA, BRASIL**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais da Amazônia. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 26 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Troy Patrick Beldini (UFOPA), Coordenador(a) do PGRNA  
Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores:

---

Prof. Dr. Troy Patrick Beldini (UFOPA)  
Examinador 01

---

Prof. Dr. Leopoldo Clemente Baratto (UFRJ)  
Examinador 02

---

Prof. Dra. Kariane Mendes Nunes (UFOPA)  
Examinadora 03

---

Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata (UFOPA)  
Orientador

---

Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro (UFOPA)  
Co-orientadora

**Santarém, fevereiro, 2016.**

*Dedico aos meus queridos pais **Alvani e Luiz Carlos München** e ao meu amado esposo **Lázaro Fernando Kasper** pelo amor, apoio e incentivo incondicionais.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À **Deus** e a **Nossa Senhora Aparecida** que me concedem sabedoria, perseverança e saúde. Ao meu esposo **Lázaro Fernando Kasper** pelo amor, apoio e paciência. Aos meus pais, **Alvani** e **Luiz Carlos München**, que me ensinaram desde cedo o privilégio do conhecimento, que mesmo longe se fazem presentes vocês são minha fortaleza.

Ao professor Dr. **Lauro Euclides Soares Barata**, meu orientador, por ter me acolhido e depositado em mim sua confiança. À minha co-orientadora Dra. **Kelly Christina Ferreira Castro**, por todo o auxílio prestado e palavras de amizade.

Ao professor Dr. **Leopoldo Clemente Baratto**, por abrir as portas do seu laboratório e ser prestativo durante todo o trabalho, me auxiliando muito na parte experimental.

Aos professores do CPQBA-Unicamp que me receberam durante minha curta estadia, transmitindo o máximo de conhecimento possível: Dra. **Vera Lúcia Garcia**, do departamento de Química Orgânica e Farmacêutica; Dr. **Adilson Sartoratto**, pela realização das inúmeras injeções no equipamento CG-EM, por me dar suporte nas análises e me apresentar a técnica de *HE-SPME*, aos técnicos do laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica MSCs. **Adriana da Silva Santos** e **Sinésio Boaventura Júnior**, pela receptividade e disposição em ajudar. À Dra. **Marta Cristina Teixeira Duarte**, da divisão de Microbiologia, à **Camila Delarmelina** pelo auxílio nos testes microbiológicos. À Dra. **Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz** e ao Dr. **João Ernesto de Carvalho**, da divisão de Biologia Celular e Estrutural, pela possibilidade da realização dos testes antiproliferativos e a **Thaís Banzato** por me ensinarem pacientemente a técnica utilizadas nos ensaios. A **Rita de Cássia Souza** por todo auxílio e realização da técnica de *UPLC*.

Aos colegas de laboratório **Breno San Martin**, **Santana Pinto de Castro**, **Inês Ribeiro Machado**, **Michelly Rios Arévalo**, **Maria Yasmim Fonseca Nogueira** e **Amanda Silva** pela amizade e disposição para ajudar e em especial a **Bruna Martins**, por todo o auxílio e conhecimento transmitido sobre testes microbiológicos.

À todos os professores do **PPGRNA** por todo o conhecimento transpassado.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.

Enfim, a **todos** que contribuíram de forma direta ou indireta possibilitando a realização deste trabalho.

**“A tarefa não é tanto ver aquilo que  
ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda  
pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.**

Arthur Schopenhauer

KASPER, ALINE APARECIDA MÜNCHEN. **ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO RESÍDUO SÓLIDO E DO HIDROLATO DOS RIZOMAS DE PRIPRIOCA (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*, Cyperaceae) CULTIVADA EM SANTARÉM-PA, BRASIL**. 2016. 144 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais da Amazônia - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2016.

## RESUMO

A Amazônia é rica em espécies com propriedades medicinais e/ou aromáticas, entretanto a região carece de estudos científicos sobre a composição química e atividade biológica das espécies da região. A priprioca (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*), uma espécie muito utilizada na medicina tradicional e para fins de aromatização, ficou conhecida nacionalmente após sua inclusão na perfumaria pela empresa cosmética Natura®. O óleo essencial dos rizomas de priprioca possui alto valor agregado e complexa composição química. Grandes quantidades de rizomas são extraídas anualmente, gerando toneladas de resíduo sólido (massa vegetal após a retirada de óleo essencial) e muitos litros de hidrolato (resíduo líquido obtido da destilação de plantas aromáticas). Atualmente, o resíduo sólido e o hidrolato de priprioca não apresentam destinação específica e devem tornar-se alvo de estudos científicos devido às propriedades farmacológicas do óleo essencial e de extratos de rizomas de priprioca cientificamente comprovadas e a falta de estudos direcionados a esses resíduos e visando tornar o processo de obtenção do óleo essencial mais sustentável. Portanto, o objetivo do trabalho consistiu no estudo fitoquímico dos extratos orgânicos do resíduo sólido e do hidrolato oriundo do processo de extração de óleo essencial dos rizomas de priprioca (*C. articulatus* var. *nodosus*) cultivada em Santarém-PA e a avaliação da atividade biológica. Para tanto, o resíduo sólido foi extraído com solventes orgânicos em Soxhlet e banho-maria e fracionado via extração ácido-base, partição líquido-líquido e cromatografia em coluna. A caracterização fitoquímica ocorreu mediante CG-EM e UPLC. A avaliação biológica ocorreu mediante ensaios de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, atividade antimicrobiana utilizando teste de microdiluição CIM e atividade antiproliferativa *in vitro* por meio do cálculo de TGI por regressão linear. Os compostos majoritários identificados no hidrolato de priprioca foram a verbenona e a mustacona, porém, a mustacona foi considerada responsável pelo agradável odor do hidrolato. A caracterização fitoquímica do resíduo sólido revelou a presença de sesquiterpenos, tais como a mustacona e corimbolona, ácidos graxos e esteroides. O extrato hexânico do resíduo sólido de priprioca apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* e maior atividade inibitória frente as linhagens tumorais humanas utilizadas no ensaio antiproliferativo, portanto foi fracionado e novamente submetido a testes antiproliferativos nos quais verificou-se duas frações inativas e duas frações ativas. Os ensaios antimicrobianos apresentaram atividade apenas em CIM altas, sendo consideradas fracamente a moderadamente inibitórias. Sendo assim, o hidrolato e o resíduo sólido de priprioca apresentam grande potencial do ponto de vista biológico, químico, econômico e tecnológico, constituindo matéria-prima para indústria de cosmeceuticos.

Palavras-chave: Priprioca, resíduos, atividade biológica, Cyperaceae.

KASPER, ALINE APARECIDA MÜNCHEN. **PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL EVALUATION OF SOLID RESIDUES AND HYDROLATE OF PRIPRIOCA RHIZOMES (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*, CYPERACEAE) FROM SANTARÉM-PA, BRAZIL.** 2016. 144 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais da Amazônia - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2016.

## ABSTRACT

The Amazon is rich in species with medicinal and / or aromatic properties, entretando the region lacks scientific studies on the chemical composition and biological activity of the species in the region. The priprioica (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*), a species widely used in traditional medicine and for flavoring purposes, became nationally known after its inclusion in perfumery for cosmetics company Natura®. The essential oil of priprioica rhizomes have high added value and complex chemical composition. Large amounts of rhizomes are extracted annually, generating tons of solid waste (plant mass after the essential oil extraction) and many liters of hydrolate (liquid residue obtained from the distillation of aromatic plants). Currently, solid waste and hydrolate of priprioica have no specific purpose and should become the subject of scientific studies due to the pharmacological properties of essential oil and scientifically proven priprioica rhizomes extracts and the lack of studies directed to this waste and aiming make the process of obtaining the essential oil more sustainable. Therefore, the aim of the work was the phytochemical study of organic extracts of solid waste and hydrolate derived essential oil extraction process of priprioica rhizomes (*C. articulatus* var. *Nodosus*) grown in Santarém-PA and evaluation of biological activity . Therefore, the solid residue was extracted with organic solvents in Soxhlet and bath and fractionated via acid-base extraction, liquid-liquid partition and column chromatography. The phytochemical characterization was by GC-MS and UPLC. Biological evaluation occurred ahead by toxicity assays microcrustacean *Artemia salina*, antimicrobial activity test using microdilution MIC and antiproliferative activity in vitro by means of TGI by linear regression calculation. The major compounds identified in hydrolate of priprioica were verbenone and mustacona, however, mustacona was held responsible for the pleasant odor of hydrolate. The phytochemical characterization of the solid residue showed the presence of sesquiterpenes such as mustacona and corimbolona, fatty acids and steroids. The hexane extract of solid waste priprioica showed toxicity against the microcrustacean *A. salina* and greater inhibitory activity against human tumor cell lines used in the antiproliferative assay, so was fractionated and again subjected to antiproliferative tests in which there are two inactive fractions and two fractions active. Antimicrobial assays were active only at high CIM, being considered weakly to moderately inhibitory. Thus, the hydrolate and solid waste priprioica have great potential biological vita point, chemical, economic and technological, providing raw materials for cosmeceuticals industry.

Keywords: Priprioica, residueus, biological evaluation, Cyperaceae.

## SUMÁRIO

LISTA DE FLUXOGRAMAS, QUADROS E TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS .....	xiii
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
1.1.1 Uso tradicional de plantas medicinais .....	03
1.1.2 Pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem natural.....	05
1.1.3 Câncer e doenças de origem microbiana.....	06
1.1.4 A espécie <i>C. articulatus</i> L. ....	07
1.1.5 Importância econômica da pirioca no Pará .....	10
1.1.6 Estudos Químicos e Atividade Biológica relatados com <i>C. articulatus</i> L. ....	11
1.1.7 Óleos essenciais, hidrolato e massa vegetal .....	12
1.1.8 Técnicas de análise de produtos naturais: CG-EM, <i>HS-SPME</i> e <i>UPLC</i> .....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 MATERIAIS.....	18
3.2 MÉTODOS .....	20
3.2.1 Coleta do material vegetal .....	20
3.3 EXTRAÇÕES E FRACIONAMENTOS .....	21
3.3.1 Extração do OE1 na Empresa Beraca e obtenção do resíduo sólido de pirioca ....	21
3.3.2 Extração do OE2 em dorna piloto no Lab. P&DBio e obtenção do hidrolato de pirioca .....	22
3.3.3 Obtenção de extratos orgânicos .....	23
3.3.4 Extração ácido-base do extrato etanólico obtido em banho-maria .....	24
3.3.5 Fracionamento em Cromatografia em coluna via úmida .....	25

3.3.6	Partição líquido-líquido do extrato etanólico .....	27
3.3.7	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	27
3.3.8	Caracterização via CG-EM, HS-SPME e UPLC.....	28
3.3.9	Derivatização do extrato hexânico .....	29
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	29
3.4.1	Teste de toxicidade <i>Artemia salina</i> .....	29
3.4.2	Avaliação da atividade antiproliferativa .....	29
3.4.3	Avaliação da atividade antimicrobiana .....	32
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>35</b>
4.1	OBTENÇÃO DO OE1 E RESÍDUO SÓLIDO DE PRIPRIOCA .....	35
4.2	PROCESSO 2: EXTRAÇÃO DO OE2 E HIDROLATO DE PRIPRIOCA .....	37
4.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DOS RESÍDUO SÓLIDO DE PRIPRIOCA .....	44
4.4	PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO E TESTES DE TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i> .....	46
4.5	ENSAIOS ANTIPROLIFERATIVOS COM EXTRATOS DO RESÍDUO SÓLIDO DE PRIPRIOCA .....	49
4.6	ESTUDO FITOQUÍMICO DO PRIR-S-HEX .....	55
4.6.1	Derivatização do PRIR-S-HEX2 e análise CG-EM .....	65
4.7	ENSAIOS ANTIPROLIFERATIVOS COM FRAÇÕES DO PRIR-S-HEX .....	67
4.8	EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE COM SOLVENTES REATIVOS .....	73
4.8.1	Cromatografia em coluna .....	75
4.8.2	Análises em UPLC .....	77
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRI-RES E HIDROLATO DE PRIPRIOCA .....	83

**5. CONCLUSÃO ..... 89**

**6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 91**

**ANEXOS ..... 97**

## LISTA DE FLUXOGRAMAS, QUADROS E TABELAS

<b>Fluxograma 1:</b> Partição líquido-líquido do extrato etanólico de priprioca .....	47
<b>Fluxograma 2:</b> Fracionamento do extrato hexânico do resíduo sólido de priprioca em coluna cromatográfica <i>flash</i> .....	60
<b>Fluxograma 3:</b> Fracionamento do extrato etanólico dos resíduo sólido de priprioca por meio de solventes reativos.....	74
<b>Quadro 1:</b> Comparação entre a composição química do óleo essencial de priprioca obtidos de rizomas coletados em diferentes períodos sazonais (OE1, OE2, OE3) e dos coletados em diferentes municípios paraenses (ZOGHBI).....	39
<b>Tabela 1:</b> Composição química do OE1 dos rizomas de priprioca cultivados em Santarém-PA extraídos em dorna industrial na Empresa Beraca .....	36
<b>Tabela 2:</b> Composição química do OE2 dos rizomas de priprioca cultivada em Santarém-PA extraído em dorna protótipo no Laboratório P&DBio .....	37
<b>Tabela 3:</b> Composição química do hidrolato de priprioca caracterizado por CG-EM .....	41
<b>Tabela 4:</b> Composição química do hidrolato de priprioca caracterizado por <i>HS-SPME</i> .....	42
<b>Tabela 5:</b> Médias das massas obtidas e do rendimento para cada solvente ao extrair o resíduo sólido de priprioca em equipamento tipo Soxhlet .....	46
<b>Tabela 6:</b> Valores de TGI ( $\mu\text{g/mL}$ ) para as 08 linhagens tumorais humanas e para a linhagem tumoral não-humana em testes com os extratos do resíduo sólido de priprioca .....	54
<b>Tabela 7:</b> Análise por CG-EM do PRIr-HEX2 .....	57
<b>Tabela 8:</b> Análise química por CG-EM da PRIr-S-HEX-Fr1,2 .....	62
<b>Tabela 9:</b> Análise química por CG-EM da PRIr-S-HEX-Fr3 .....	63
<b>Tabela 10:</b> Análise química por CG-EM da PRIr-S-HEX-Fr4 .....	64
<b>Tabela 11:</b> Análise química por CG-EM do PRIr-S-HEX derivatizado .....	66
<b>Tabela 12:</b> TGI: concentração de cada amostra ( $\mu\text{g/mL}$ ) necessária para inibir completamente a proliferação celular para cada linhagem testada .....	73
<b>Tabela 13:</b> Valores de CIM ( $\text{mg/mL}$ ) do extrato hexânico e das frações do extrato hexânico do resíduo sólido e do hidrolato de priprioca para as linhagens microbianas testadas .....	85

<b>Tabela 14:</b> Valores de CIM (mg/mL) dos compostos ácidos e dos compostos fenólicos dos resíduo sólido de pripioca para as linhagens microbianas testadas .....	86
---	----

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

<b>Figura 1:</b> Rizomas de priprioca .....	07
<b>Figura 2:</b> Espécie <i>Cyperus articulatus</i> var. <i>nodosus</i> : A: Inflorescência, B: Corte transversal do escapo, C: Inflorescência, D: Corte transversal do escapo, E: Rizomas e Tubérculos. ....	08
<b>Figura 3:</b> Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos de <i>C. articulatus</i> L .....	09
<b>Figura 4:</b> Classes de substâncias presentes no óleo essencial dos rizomas de <i>C. articulatus</i> .....	09
<b>Figura 5:</b> Cultivo de priprioca na comunidade Tabocal, Santarém-PA .....	21
<b>Figura 6:</b> Dorna piloto para extração de óleo essencial de material vegetal .....	22
<b>Figura 7:</b> Equipamento de extração tipo “Soxhlet” .....	23
<b>Figura 8:</b> Fases imiscíveis durante o processo de extração do extrato etanólico do resíduo sólido de priprioca com solventes reativos .....	25
<b>Figura 9:</b> Sistema montado para a realização de cromatografia em coluna <i>flash</i> .....	26
<b>Figura 10:</b> Figura 10: 10 A- Partição líquido-líquido do extrato etanólico do resíduo sólido de priprioca e extratos derivados, 10 B– Frações obtidas. ....	27
<b>Figura 11:</b> Placa de 96 compartimentos usada no ensaio da SRB .....	31
<b>Figura 12:</b> Óleo essencial na fase superior do hidrolato de priprioca .....	41
<b>Figura 13:</b> Hidratante protótipo aromatizado com hidrolato de priprioca.....	44
<b>Figura 14:</b> Placas de 96 poços coradas com SRB .....	50
<b>Figura 15:</b> CCD do extrato hexânico e suas frações .....	60
<b>Figura 16:</b> CCD do extrato hexânico e do extrato hexânico metilado .....	65
<b>Figura 17:</b> Coluna cromatográfica feita com sílica-gel 60 mesh para o fracionamento de PRIr-Bases.....	75
<b>Figura 18:</b> CCDs das frações de PRIr-Bases obtidas por fracionamento em coluna cromatográfica .....	76
<b>Figura 19:</b> CCD das 03 frações de PRIr-Bases consideradas purificadas e enviadas para análise em <i>UPLC</i> .....	76
<b>Figura 20:</b> ESI de PRIr-S-ET no modo positivo.....	78
<b>Figura 21:</b> ESI de PRIr-Ácidos no modo negativo.....	79
<b>Figura 22:</b> ESI de PRIr-Fenóis no modo positivo .....	80

<b>Figura 23:</b> ESI de PRIr-Fenóis no modo negativo .....	80
<b>Figura 24:</b> ESI de PRIr-Bases no modo positivo .....	81
<b>Figura 25:</b> ESI de PRIr- Bases-B3 no modo positivo .....	82
<b>Figura 26:</b> ESI de PRIr- Bases-B4 no modo positivo .....	82
<b>Figura 27:</b> ESI de PRIr- Bases-B7 no modo positivo .....	83
<b>Figura 28:</b> Placas de 96 poços utilizadas para testes com linhagens bacterianas .....	84
<b>Figura 29:</b> Placas de 96 poços utilizada nos testes com linhagens fúngicas .....	85
<b>Figura 30:</b> Placa relativa à MBC da PRIr-S-HEX-Fr3.....	86
<b>Gráfico 1:</b> Ranking mundial de consumo de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética. .....	14
<b>Gráfico 2:</b> Faturamento da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética no Brasil .....	14
<b>Gráfico 3:</b> Distribuição das indústrias de perfumaria, cosmética e higiene pessoal no Brasil .....	15
<b>Gráfico 4:</b> Avaliação da toxicidade frente a <i>A. salina</i> das frações de PRI-RES no período de 24 horas .....	48
<b>Gráfico 5:</b> Atividade antiproliferativa da doxorubicina .....	51
<b>Gráfico 6:</b> Atividade antiproliferativa do <b>PRIr-S-HEX</b> .....	52
<b>Gráfico 7:</b> Atividade antiproliferativa do <b>PRIr-S-DIC</b> .....	52
<b>Gráfico 8:</b> Atividade antiproliferativa do <b>PRIr-S-ACOET</b> .....	53
<b>Gráfico 9:</b> Atividade antiproliferativa do <b>PRIr-S-ET</b> .....	54
<b>Gráfico 10:</b> Atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorubicina .....	68
<b>Gráfico 11:</b> Atividade antiproliferativa do <b>PRIr-S-HEX2</b> .....	69
<b>Gráfico 12:</b> Atividade antiproliferativa da <b>PRIr-S-HEX-Fr1,2</b> .....	69
<b>Gráfico 13:</b> Atividade antiproliferativa da <b>PRIr-S-HEX-Fr3</b> .....	70
<b>Gráfico 14:</b> Atividade antiproliferativa da <b>PRIr-S-HEX-Fr4</b> .....	71
<b>Gráfico 15:</b> Atividade antiproliferativa da <b>PRIr-S-HEX-Fr5</b> .....	72

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

786-0: linhagem celular de adenocarcinoma de rim

ABIHPEC – Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Cosmético e Perfumaria

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

CTT – Cloreto de Trifenil Tetrazólio

DO – Densidade Óptica

ha – hectare

HaCat: linhagem celular de queratinócitos normais humanos

*HS-SPME – Headspace Solid Phase Microextraction*

HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal

INCA – Instituto Nacional do Câncer

K562: linhagem tumoral humana leucemia

MCF-7: linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama

NCI-ADR/RES: linhagem celular humana de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas

NCI-H460: linhagem celular humana de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células

OE – óleo essencial

OVCAR-3: linhagem celular humana de adneocarcinoma de ovário

PC-3: linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata

PRIr-Ácidos - compostos ácidos presentes nos resíduos sólidos de priprioica

PRIr-Bases – compostos básicos presentes nos resíduos sólidos de priprioica

PRIr-Fenóis - compostos fenóis presentes nos resíduos sólidos de priprioica

PRIr-Neutros - compostos neutros presentes nos resíduos sólidos de priprioica

PRIr-P-HEX - extrato hexânico dos resíduos sólidos de priprioica extraído por partição líquido-líquido

PRIr-P-DIC - extrato diclorometânico dos resíduos sólidos de priprioca extraído por partição líquido-líquido

PRIr-P-ACOET - extrato acetato de etila dos resíduos sólidos de priprioca extraído por partição líquido-líquido

PRIr-P-ET - extrato etanólico dos resíduos sólidos de priprioca extraído por partição líquido-líquido

PRI-RES – resíduo sólido de priprioca

PRIr-S-ACOET - extrato acetato de etila dos resíduos sólidos de priprioca extraído via Soxhlet

PRIr-S-DIC - extrato diclorometânico dos resíduos sólidos de priprioca extraído via Soxhlet

PRIr-S-ET - extrato etanólico dos resíduos sólidos de priprioca extraído via Soxhlet

PRIr-S-HEX – extrato hexânico dos resíduos sólidos de priprioca extraído via Soxhlet

PRIr-S-HEX-Fr1,2 – fração 1,2 do extrato hexânico dos resíduos sólidos de priprioca

PRIr-S-HEX-Fr3 - fração 3 do extrato hexânico dos resíduos sólidos de priprioca

PRIr-S-HEX-Fr4 - fração 4 do extrato hexânico dos resíduos sólidos de priprioca

PRIr-S-HEX-Fr5 - fração 5 do extrato hexânico dos resíduos sólidos de priprioca

SRB - Sulforrodamina B

T - média das absorbâncias das células tratadas

T<sub>0</sub> - média das absorbâncias das células controle

TCA - Ácido Tricloroacético

TGI - Total Growth Inhibition (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular)

TMSD – Trimetilsilil-diazometano

U251 - linhagem celular humana de glioblastoma

*UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography*

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas têm se observado um crescente número de pesquisas direcionadas ao descobrimento de novas moléculas ativas, sintéticas ou oriundas de produtos naturais, e ao desenvolvimento de fármacos dos quais o mercado farmacêutico ainda esteja desfalcado. E não somente a obtenção de fármacos tem sido visada, mas também a produção de fitoterápicos, os quais se caracterizam como medicamentos elaborados com base nos extratos vegetais que atuem como coadjuvantes nos tratamentos das enfermidades (SIMÕES e SCHENKEL, 2001).

A floresta amazônica apresenta um grande potencial em termos de plantas medicinais. Sua imensa área possui cerca de 7.600.000 km<sup>2</sup>, representando 7% da superfície do planeta Terra. Mais de 5 milhões de km<sup>2</sup> estão situados no Brasil. Há estimativas de que a região abrigue cerca de 50% da biodiversidade mundial. No entanto, o território amazônico permanece pouco explorado cientificamente, especialmente no que se refere a busca de produtos naturais bioativos. Das 30.000 espécies de plantas superiores existentes no Brasil, acredita-se que um terço são medicinais e/ou aromáticas, 70% são utilizadas na medicina tradicional pela população local, mas apenas 8% já foram alvo de algum estudo científico (MIGUEL, 2007; LUPE, 2011).

Na Amazônia, as populações utilizam intensamente os recursos medicinais e aromáticos das plantas. Em regiões mais remotas, a fauna e a flora significam sobrevivência. Entretanto, como a maioria das plantas ainda não foram estudadas e seus princípios ativos são desconhecidos, o aproveitamento medicamentoso das espécies amazônicas permanece restrito ao conhecimento tradicional, o qual vem se perdendo ao longo das gerações (BERG, 1993).

Estudos científicos devem tornar-se o alicerce da economia da região amazônica, alavancando atividades voltadas ao desenvolvimento sustentável, que gerem retornos financeiros à população detentora dos conhecimentos tradicionais por meio da comercialização de recursos naturais como óleos essenciais e fitofármacos (MAIA e ANDRADE, 2009). Na Amazônia há cerca de 1200 plantas com potencial para a indústria de cosméticos, um mercado mundial que ultrapassa os US\$ 40 bilhões/ano (MEIRELLES FILHO, 2006).

Estima-se que atualmente na região amazônica 20 mil famílias têm sua renda obtida a partir da exploração de plantas medicinais e aromáticas, dentre elas: piaçaba (*Attalea funifera*), buriti (*Mauritia flexuosa*), muruci (*Byrsonima crassifolia*), bacuri (*Platonia insignis*), bacaba

(*Oenocarpus bacaba*), palha e cipó. Por isso, a região é fonte de matéria-prima para diversos setores empresariais, principalmente a indústria Cosmética e Farmacêutica (BARATA, 2005).

No estado do Pará, a pripioca é muito utilizada em banhos de cheiro em festas de São João e na aromatização da água de lavagem devido a sua fragrância agradável. O odor, conhecido como cheiro do Pará, foi introduzido há muitos anos nos perfumes regionais, mas a partir de 2003 teve sua inclusão na perfumaria nacional pela empresa Natura®. A complexa mistura de compostos químicos presentes no óleo essencial de pripioca tornam o seu aroma único (ZOGHBI *et al.*, 2008).

O destaque obtido pelo odor do óleo de pripioca aumentou a demanda pelos rizomas da planta, agregando valor ao produto. Inúmeras famílias na região amazônica iniciaram o cultivo desta espécie em escala comercial (ZOGHBI *et al.*, 2008). O processo de extração de óleo essencial gera dois resíduos: sólido (massa vegetal esgotada de óleo essencial) e hidrolato (líquido aquoso resultante da destilação por arraste a vapor com baixa porcentagem de óleo essencial, sobretudo substâncias com maior afinidade pela água).

Há um grande número de pesquisas envolvendo caracterização química e avaliação da atividade biológica do óleo essencial e de extratos dos rizomas de pripioca. No entanto, não são encontradas pesquisas relacionadas aos resíduos oriundos do processo de extração de óleo essencial. O resíduo sólido costuma ser queimado para alimentar as caldeiras do sistema de arraste à vapor e o hidrolato é descartado em rios. Entretanto, ambos os resíduos possuem substâncias orgânicas remanescentes do processo de extração de óleo essencial, e resíduo sólido contém ainda as substâncias que não são extraídas no arraste à vapor. Essas substâncias possuem potencial atividade biológica, podendo trazer danos ao ambiente quando descartadas inadequadamente. Além disso, devido ao odor agradável e as propriedades farmacológicas podem constituir matéria-prima para indústrias de cosmecêuticos, já que os resíduos são produzidos em grande quantidade e não possuem valor agregado.

Portanto, visando agregar valor aos resíduos e buscando tornar o processo de obtenção do óleo essencial mais sustentável, este trabalho realizou o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade biológica do resíduo sólido e do hidrolato oriundos do processo de extração de óleo essencial por arraste à vapor dos rizomas de pripioca cultivada em Santarém-PA.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Uso tradicional de plantas medicinais

O reino vegetal apresenta-se como o grande responsável pela produção das substâncias químicas conhecidas e registradas na literatura. A variedade e a complexidade dos constituintes dos componentes que constituem o metabolismo secundário das plantas são a consequência direta de milhões de anos de evolução sendo ainda inalcançável reproduzi-los em vias laboratoriais (VIEGAS JR., BOLZANI E BARREIRO, 2006).

Há milhares de anos as plantas são utilizadas no tratamento de diversas patologias. Provavelmente uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais tenha sido a ingestão de ervas e folhas buscando a cura de doenças (VIEGAS JR., BOLZANI E BARREIRO, 2006).

Os primeiros registros da utilização de plantas em benefício da saúde humana foram encontrados em placas de argila oriundas da Mesopotâmia, cerca de 2600 a. C. Nestas placas estão descritos alguns óleos, como de *Cupressus sempervirens* (L), *Cedrus*, *Papaver somniferum* L., *Glycyrrhiza glabra* Torr., *Commiphora* Jacq., que eram e até os dias atuais são indicados para o tratamento de inflamações, indisposição e mal-estar, infecções parasitárias e resfriados (GURIB-FAKIM, 2006).

De acordo com Maciel, Pinto e Veiga Jr. (2002), as plantas utilizadas na medicina popular sempre despertaram o interesse de pesquisadores, os quais buscam comprovar a eficácia destas cientificamente. O conhecimento popular sobre as plantas é proveniente de décadas, séculos e até milênios de utilização das mesmas na cura de enfermidades.

Para Albuquerque e Hanazaqui (2006), a etnofarmacologia e a etnobotânica têm sido reconhecidas por cientistas de todo o mundo e utilizadas como critério de seleção para o estudo de plantas medicinais. A etnobotânica tem por definição a relação homem-planta, enquanto a etnofarmacologia o método tradicional por meio do qual a planta é utilizada no tratamento de enfermidades.

Em 1803 com o isolamento da substância morfina da espécie *Papaver somniferum* L. iniciou-se o processo da extração e do isolamento de compostos ativos. No entanto, a substituição atual dos extratos vegetais por fármacos sintéticos foi consequência da ausência de estudos

científicos e de comprovações da eficácia do produto natural, assim como a dificuldade do controle de qualidade e a falta de testes farmacológicos e toxicológicos (SANTOS *et al.*, 2012).

Com a modernização dos métodos de isolamento de substâncias, reacendeu-se a busca por novas substâncias naturais. Além disso, muitas moléculas bioativas são praticamente impossíveis de serem sintetizadas em laboratório, devido, principalmente a presença de centros quirais. Além disso, muitas moléculas agem em sinergismo com outras moléculas, não apresentando efeitos quando isolada. Desta forma, as plantas conquistam seu espaço novamente (SANTOS *et al.*, 2012).

Não são só os seres humanos que se beneficiam do uso de plantas. Alguns macacos e outros primatas utilizam algumas plantas em sua dieta para obter efeitos analgésicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, digestivos e de regulação da fertilidade (HUFFMAN, 1997).

Ao longo dos anos, as informações populares transmitiram uma variedade de informações importantes relacionadas à eficiência e aos efeitos medicinais das plantas. Entretanto, são necessários estudos fitoquímicos que validem a eficácia dessas plantas, assim como a identificação dos compostos naturais bioativos que lhes conferem essa atividade (OTTOBELI *et al.*, 2011).

A Amazônia beneficia-se diretamente da demanda de plantas aromáticas e medicinais. Atualmente, a preocupação com a preservação da floresta tem induzido a introdução de outros meios de geração de renda, como a comercialização de outros produtos florestais não madeireiros (tais como óleos essenciais e óleos essenciais). Estes produtos são matéria-prima na fabricação de cosméticos, perfumes, fitofármacos, inseticidas, fungicidas, bactericidas, larvicidas, dentre outros (PEREIRA, 2012).

Neste contexto está inserida a *priprioca*, uma planta aromática muito utilizada na medicina popular em muitos países da África (Camarão, República da África Central, Gabão e Senegal), ocorrendo também nos Estados Unidos, América Central, Caribe, Índias Ocidentais, Ásia, Austrália, e Oriente Médio. No Brasil, a planta já era utilizada por tribos indígenas na Amazônia para o tratamento de diversos males e até os dias atuais encontra-se na cultura local (NGO BUM, 2001).

### 1.1.2 Pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem natural

Os produtos vegetais são reconhecidamente uma ampla fonte de moléculas bioativas. Os metabólitos secundários das plantas representam os fatores de interação com o meio e com os organismos do meio, sendo assim, frequentemente possuem importantes atividades farmacológicas. A produção de metabólitos ocorre devido a necessidades biológicas e possibilidades biosintéticas. Essas substâncias são produzidas, transformadas e acumuladas garantindo vantagens para a sobrevivência e para a perpetuação da espécie (SANTOS, 2007).

A natureza provém produtos medicinais ao homem concomitantemente a sua perpetuação no planeta. Mais recentemente, a tecnologia permitiu o aperfeiçoamento de métodos de isolamento, identificação e síntese de moléculas orgânicas, e durante o último século centenas de fármacos foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, principalmente espécies vegetais. Atualmente, mais de 60% dos agentes anticâncer utilizados são provenientes de produtos naturais: plantas, microrganismos e organismos marinhos (CRAGG e NEWMAN, 2005).

As plantas são rica fonte de moléculas exploradas pela indústria farmacêutica, como por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis*, utilizados para insuficiência cardíaca, a vimblastina e a vincristina, alcaloides isolados da *Catharanthus roseus*, epipodofilotoxinas de *Podophyllum peltatum* L.; taxanos de *Taxus brevifolia* Nutt e camptotecinas de *Camptotheca acuminata* Decne, sendo todos esses utilizados no tratamento de cânceres (FOGLIO *et al.*, 2006) (BALUNAS *et al.*, 2006).

Os fitofármacos apresentam uma alternativa econômica e tecnológica frente ao elevado custo do desenvolvimento de um novo fármaco por meio da análise combinatória e da síntese de moléculas a partir de moldes biológicos (SHARKER e NAHAR, 2007).

### 1.1.3 Câncer e doenças de origem microbiana

Atualmente a palavra câncer recebe a denominação científica neoplasia, especificamente tumores malignos, ou seja, células malignas que crescem descontroladamente. São quase 200 tumores malignos correspondentes aos vários sistemas de células do corpo, que apresentam capacidades de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes. De acordo com a OMS (Organização

Mundial da Saúde) estatisticamente o câncer é a terceira maior causa de mortes no mundo, já no Brasil é a segunda causa de mortes por doença (ALMEIDA, 2005).

Para que células normais adquiram o fenótipo neoplásico geralmente estas passam por um complexo processo, que pode levar décadas, o processo é multi-etapas e pode ser representado pela necessidade das células neoplásicas (tumoriais) adquirirem características que favoreçam o seu desenvolvimento, podendo tornar-se malignos. Essas características são chamadas de *Hallmarks* do câncer: proliferação auto-sustentada, evasão dos sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular, replicação ilimitada, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Alguns fatores desencadeantes do câncer são conhecidos: os erros naturais que ocorrem durante a divisão celular, a hereditariedade e o ambiente (ambiente físico e estilo de vida). A grande maioria dos cânceres são causados por fatores externos ao corpo. Dentre os fatores externos encontram-se o tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, hábitos sexuais, fatores ocupacionais, medicamentos e exposição solar prolongada. Além disso, o aumento na expectativa de vida aumenta proporcionalmente o número de casos de câncer, já que quanto mais o indivíduo vive, mais se expõe aos fatores que predispõe ao desenvolvimento de células malignas (INCA, 2015).

No Brasil os tipos de câncer mais incidentes são próstata e pulmão para o sexo masculino e mama e cólon de útero para as mulheres. A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que no ano de 2030 ocorram 27 milhões de casos de câncer (INCA, 2015).

Entretanto, quando se trata de saúde pública, não somente o aumento nos registros de casos de câncer tem sido alarmante, mas também o histórico de evolução das doenças infecciosas e ao desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos aos antibióticos disponíveis atualmente, fator que incentiva a procura por antibióticos de origem natural. O homem vem sendo vítima de doenças de origem microbiana desde os princípios de sua existência, utilizando empiricamente produtos naturais para tratar enfermidades. A eficácia destes produtos tem sido comprovada cientificamente recentemente e a busca por moléculas bioativas alvo de muitas pesquisas científicas (DUARTE, 2006).

### 1.1.4 A espécie *Cyperus articulatus* L.

A priprioca (Fig 1) pertence à família *Cyperaceae* Juss. conhecida como a terceira maior família de monocotiledôneas. Esta família possui 115 gêneros e 3.600 espécies, sendo a maior parte dessas consideradas ervas daninhas, mas algumas apresentam importante papel ecológico e econômico. O gênero *Cyperus* é formado por aproximadamente 550 espécies que ocorrem preferencialmente em ambientes alagados, margens de estradas, campos e campinas (ROCHA, 2008; ZOGHBI *et al.*, 2008).



**Figura 1:** Rizomas e tubérculos de priprioca (*C. articulatus*).

**Fonte:** Arquivos pessoais de Michelly Rios Arévalo.

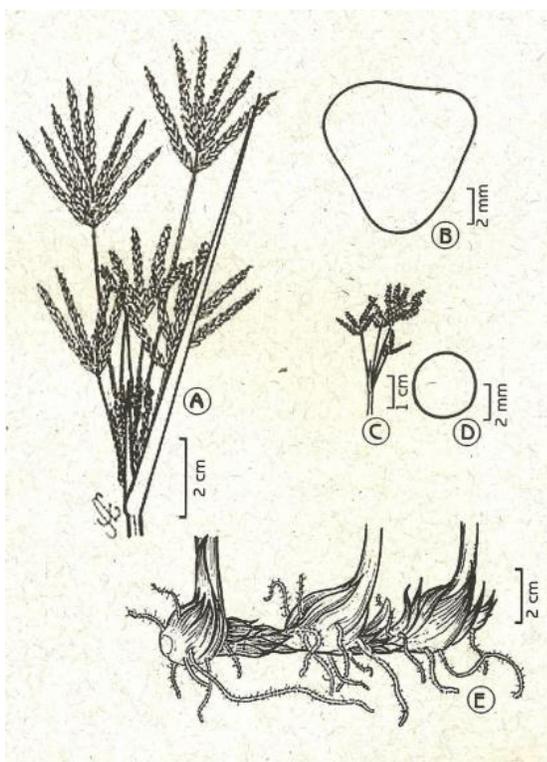
No estado do Pará, devido ao clima favorável, há a ocorrência de inúmeras espécies do gênero *Cyperus*, tais como: *C. aggregatus* (Willd.) Endl., *C. articulatus* L. (var. *articulatus* e var. *nodosus*), *C. diffusus* Vahl, *C. distans* L. f., *C. elegans* L., *C. giganteus* Vahl., *C. ligularis* L., *C. luzulae* (L.) Rottb. Ex Retz, *C. Prolixus* Kunth, *C. rotundus* L., *C. sphecellatus* Rottb. Ex Retz, *C. prolixus* Kunth, *C. rotundus* L., *C. sphecellatus* Rottb e *C. surinamensis* Rottb. Portanto é de extrema importância a identificação correta da espécie em estudo, pois a composição química das espécies diferem entre si (ZOGHBI *et al.*, 2008).

No Pará três espécies são conhecidas como priprioca ou derivações, termos que sofrem variação regionalmente. Geralmente o termo priprioca é empregado para *C. articulatus*, pripriocão ou priprioca-verdadeira para *C. prolixus* e priprioquinha para *C. rotundus* (ZOGHBI *et al.*, 2008).

Essas espécies são utilizadas para diferentes finalidades. *C. articulatus* tem seus tubérculos muito utilizados na perfumaria e cosmética local e mais recentemente nacional, sendo

plantadas em escalas comerciais. *C. prolixus* e *C. rotundus* são utilizadas para fins medicinais e cultivadas nos quintais de residências (ROCHA, 2008).

A espécie *C. articulatus* L. apresenta-se como uma planta perene com rizoma endurecido, tendo seus tubérculos cobertos com brácteas avermelhadas, multinérveas e lanceoladas, com escapo cilíndrico a trígono e liso. Os órgãos aéreos da planta são escapo<sup>1</sup> e folhas, enquanto órgãos subterrâneos são rizoma, tubérculo e raízes (Fig 2). A altura da planta varia de 30 a 250 cm (ROCHA, 2008).



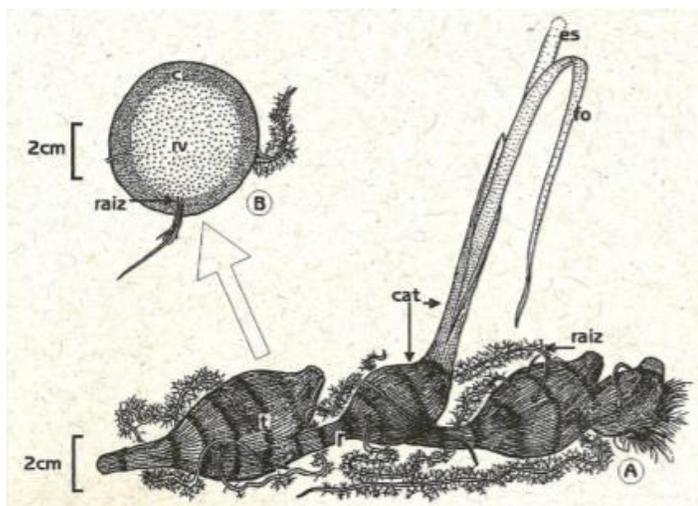
**Figura 2:** Espécie *Cyperus articulatus* var. *nodosus*: A: Inflorescência, B: Corte transversal do escapo, C: Inflorescência, D: Corte transversal do escapo, E: Rizomas e Tubérculos.

**Fonte:** Rocha, 2008.

Seus órgãos vegetativos subterrâneos são utilizados tanto na perfumaria quanto na medicina popular, isto devido a presença exclusiva de células oleíferas no rizoma e nos tubérculos, como é comum na família Cyperaceae. As células oleíferas com conteúdo lipofílico (óleo) são de paredes delgadas, a distribuição é aleatória, mas as células encontram-se em maior porcentagem

<sup>1</sup> Haste que sai do rizoma, bulbo, não ramificado, áfilo e sustenta flores na extremidade; ocorre em plantas cujo caule é muito reduzido ou subterrâneo e suas folhas aparentam nascer diretamente do solo.

nos tubérculos do que nos rizomas, ou seja, seria mais adequado referir-se a tubérculos e rizomas do que a somente rizomas (Fig 3), no entanto, devido a ampla utilização do termo rizoma, este trabalho considerará rizoma a junção de tubérculos e rizomas (ROCHA, 2008; SANTOS *et al.*, 2012).

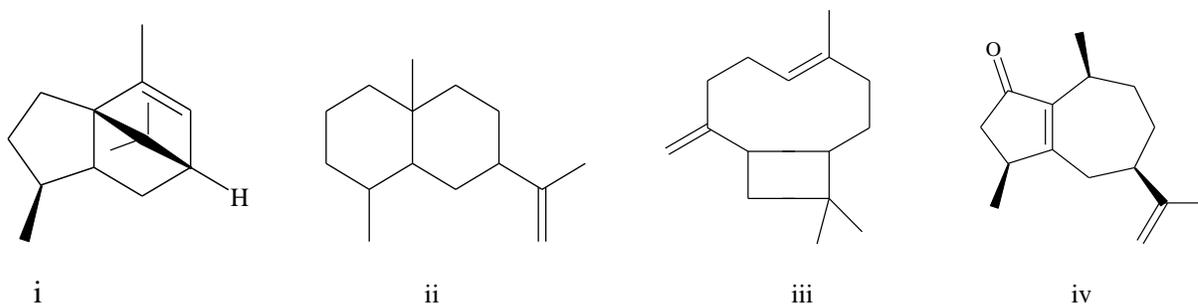


**Figura 3:** Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos de *C. articulatus* L. A – Órgãos subterrâneos e aéreos, B – Seção transversal do tubérculo, c = córtex, cat = catafilo, es = escapo, fo = folha, r = rizoma, rv = região vascular, t = tubérculo.

Fonte: Santos *et al.*, 2008.

Dos rizomas de *C. articulatus* é extraído óleo essencial (OE) de coloração amarelo forte e odor característico. O óleo dessa espécie difere-se do óleo de *C. prolixus* e *C. rotundus* graças a maior porcentagem de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno e a presença de mustacona (ZOGHBI *et al.*, 2008).

Substâncias sesquiterpênicas das classes dos patchulanos (i), eudesmanos (ii), cariofilanos (iii) e rotundanos (iv) são predominantes nos óleos essenciais e extratos apolares das espécies de *Cyperus* (ZOGHBI *et al.*, 2008).



**Figura 4** – Classes de substâncias presentes no óleo essencial dos rizomas de *C. articulatus*.

### 1.1.5 Importância econômica da priprioca no Pará

A expansão do mercado de Produtos Florestais Não Madeiros (PFNMs) tem trazido a tendência da inserção do cultivo de espécies nativas e adaptadas que levem ao desenvolvimento sustentável (MIGUEL, 2007).

No entanto, a exploração de recursos naturais na Amazônia ainda enfrenta muitos problemas, como a falta de controle de qualidade do produto, oferta e custos, disponibilidade de matéria-prima, entre outros. Os poucos conhecimentos científicos dos produtores tendem a limitar a produção, tornando-os pouco competitivos no mercado (SILVA, MOTA E CONCEIÇÃO, 2008).

A priprioca tornou-se a partir dos anos 2000 uma importante fonte de recursos para comunidades do entorno de Belém-PA e da ilha de Cotijuba-PA. Depois desta data a Empresa Natura, uma das mais importantes do setor de Cosméticos do Brasil e do mundo, iniciou a produção de perfumes baseados no óleo essencial de priprioca, antes estudado por Barata & Ortiz e cujo óleo essencial e informações pertinentes foram passadas ao pessoal da mesma Empresa e Coligados .

Visando uma economia voltada ao desenvolvimento sustentável e que gere perspectivas reais de riqueza para a região e após a inserção no mercado da perfumaria nacional, iniciou-se uma grande demanda pelos tubérculos da priprioca, estimulando a produção orgânica da espécie por pequenos produtores rurais (SILVA, MOTA e CONCEIÇÃO, 2008).

O tempo estimado desde o plantio até a colheita é de oito meses. O plantio é realizado em canteiros em sistema orgânico e a preparação da terra é feita pela derrubada, queima e coiva, método considerado tradicional. A produtividade média que se tem observado é de 15 a 42 toneladas por hectare (SILVA, MOTA e CONCEIÇÃO, 2008).

Portanto, a cultura da priprioca é anual e o processo de cultivo praticamente todo manual. Os produtores devem manter a área de cultivo limpa e preparar canteiros que devem receber adubação antes do plantio. O plantio é feito através de mudas, no caso, tubérculos. A colheita também é feita manualmente (CASTELLANI *et al.*, 2012).

A espécie representa importante fonte de renda para muitas famílias de produtores rurais. Em Belém, por exemplo, os rizomas são vendidos no complexo do Ver-o-Peso, onde o maço custa em média de R\$ 2,00 a R\$3,00 (OLIVEIRA e ZOGBHI, 2008).

Recentemente, estudos visam a utilização da parte aérea da planta, que normalmente é descartada como material de ornamentação. As folhas da priprioca podem ser utilizadas em

arranjos, junto a flores ou não, em substituição ao junco. A durabilidade das hastes mantidas em água é de 7 a 15 dias, o que as torna adequadas para este fim. Assim, o produtor além de comercializar os rizomas da priproica comercializa suas partes aéreas aumentando sua renda (ROBLES *et al.*, 2008).

### 1.1.6 Estudos Químicos e Atividade Biológica relatados com *C. articulatus* L.

Na África e na Amazônia os rizomas de *C. articulatus* L. são utilizados no tratamento de diversas enfermidades como dor de estômago, febre, constipação, infecções respiratórias e vermes. Segundo Ngo Bum *et al.* (2004) o pó seco preparado a partir dos rizomas da planta é usado sobre a pele contra enxaqueca, dores de cabeça, febres, edemas e para problemas de ovulação.

Nos extratos provenientes da decocção dos rizomas de *C. articulatus* foram encontrados saponinas, flavonoides, terpenos, taninos e açúcares (NGO BUM *et al.*, 2001). Estudos realizados por Bum *et al.* (2000) demonstraram que os extratos aquosos da espécie, coletada em estação seca, não apresentaram efeitos analgésicos ou paralisantes, porém a atividade motora em camundongos foi diminuída significativamente após a ingestão do extrato. Observou-se, portanto, que a espécie apresenta propriedades similares a outros sedativos conhecidos, induzindo o sono.

De acordo com Rukunga *et al.* (2007) os sesquiterpenos corimbolona e mustacona, isolados do extrato clorofórmico dos rizomas de *C. articulatus* apresentaram atividade antiplasmódica significativa, sendo que o sesquiterpeno mustacona mostrou-se mais eficiente. Thebtaranonth *et al.* (1995) já haviam constatado a atividade antimalárica de sesquiterpenos presentes em tubérculos de *C. rotundus*.

Oladosu *et al.* (2011) relatam a atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. articulatus* oriundas da Nigéria e apontam para a maior susceptibilidade de bactérias do tipo *gram* negativo a esse óleo essencial.

A atividade anti-cândida de plantas brasileiras foi constatada nos estudos de Duarte *et al.* (2005) sendo uma destas plantas a priproica. Foram testados o óleo essencial e o extrato etanólico dos rizomas da espécie. O óleo essencial foi considerado moderadamente inibitório, enquanto que o extrato etanólico foi considerado fracamente inibitório. Os autores concluíram que para se atingir a concentração mínima inibitória seriam necessárias altas concentrações do óleo essencial e do extrato.

Segundo Sousa *et al.* (2008) o óleo essencial de *C. articulatus* apresenta atividade antiespasmódica, a ação seria entre os receptores histaminérgicos e muscarínicos da musculatura lisa do íleo de cobaia.

Além dessas atividades, Souza Filho *et al.* (2008) realizaram estudos sobre a atividade alelopática do óleo essencial e dos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico dos tubérculos da espécie. O estudo constatou altos valores de inibição e desenvolvimento da radícula de duas espécies de plantas daninhas: malícia (*Mimosa pudica*), mato-pasto (*Senna obtusifolia*) e também da leguminosa forrageira puerária (*Puerária phaseoloides*) indicando potencial herbicida da espécie.

### **1.1.7 Óleos essenciais, hidrolato e massa residual**

Óleos essenciais (OE), também conhecidos como óleos voláteis, são metabólitos secundários obtidos de partes de plantas como raízes, caules, rizomas, sementes, flores e folhas, tendo como principal método de extração a destilação por arraste a vapor d'água e hidrodestilação (PROBST, 2012). Não possuem alta estabilidade, em especial na presença de ar, calor, luz, umidade e metais (LUPE, 2011).

Os óleos essenciais são constituídos especialmente por compostos como hidrocarbonetos terpênicos aldeídos, fenois, álcoois simples e terpênicos, cetonas, éteres, óxidos, cumarinas, ésteres, peróxidos, lactonas, ácidos orgânicos, furanos e compostos com enxofre. Normalmente apresentam compostos majoritários; os demais compostos geralmente formam uma mistura complexa e são compostos minoritários. Um óleo essencial pode ser identificado pelo seu marcador químico, que corresponde a padronização da substância majoritária encontrada em sua composição química (SIMÕES e SPITZER, 2002).

Há séculos os óleos essenciais são usados como flavorizantes, cosméticos e perfumes e para fins medicinais. Estes óleos costumam apresentar baixa toxicidade aos mamíferos, são biodegradáveis e podem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo (PROBST, 2012).

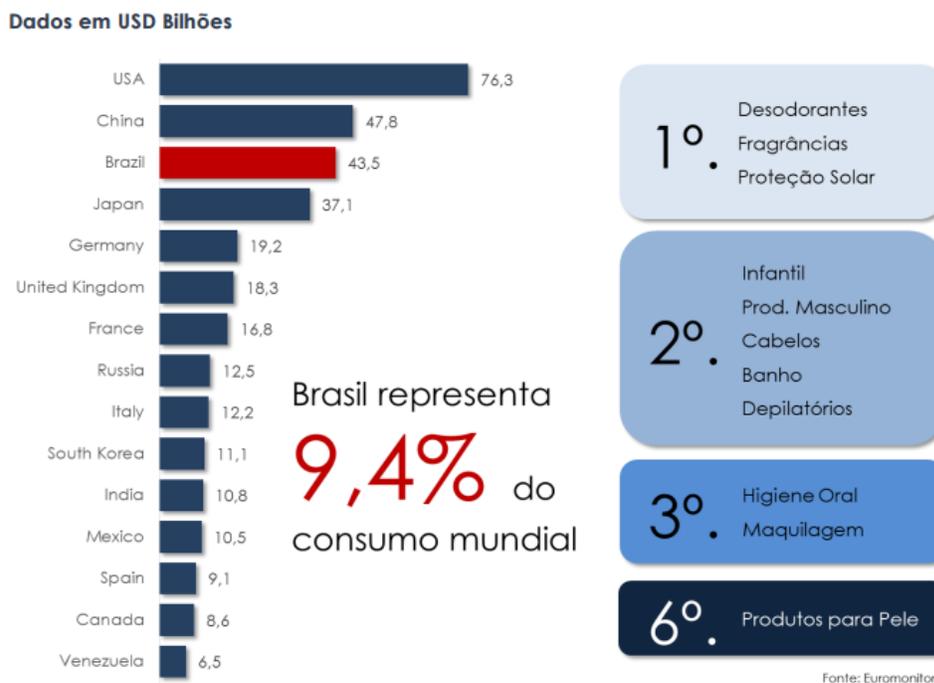
Atualmente, os óleos essenciais mais comercializados do Brasil são os óleos de pau-rosa, patchouli, vetiver e os cítricos. No entanto, a fragrância amadeirada, forte e agradável da priprioca tem sido destaque da perfumaria nacional e mundial. A priprioca supera barreiras regionais e sai

dos quintais para ganhar a atenção do luxuoso mercado da perfumaria (ZOGHBI, 2005; BIZZO *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais são amplamente estudados, buscando-se a composição química e a atividade biológica dos mesmos. No entanto, os resíduos gerados pelo processo extrativo, tanto o material vegetal (resíduo sólido) quanto o material líquido (hidrolato) são pouco estudados.

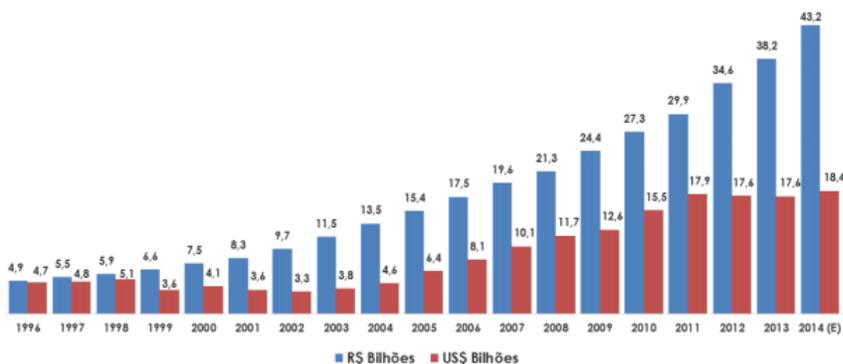
O resíduo sólido consiste na massa vegetal esgotada de óleo essencial. Já o hidrolato, hidrosol ou água floral consiste no resíduo aquoso proveniente da extração do óleo essencial do material vegetal. O vapor de água passa pelas glândulas lipofílicas do material vegetal arrastando consigo moléculas voláteis. Devido a diferença de densidade, óleo essencial e água não se misturam, facilitando o processo de extração de óleo essencial. Entretanto, uma pequena quantidade de óleo essencial, sobretudo monoterpenos e arilpropanoídeos, substâncias de baixo peso molecular, são arrastadas pelo vapor d'água utilizado no processo de extração, condensam e permanecem no hidrolato. Assim, o hidrolato mantém certas características olfativas do óleo essencial, é gerado em grandes quantidades e não possui valor agregado, sendo assim apresenta grande potencial para se tornar matéria-prima para a Indústria Cosmética, um dos setores que mais cresce anualmente.

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética – ABIHEPC, (2015), a tendência mundial para o setor de cosmética e higiene pessoal nos próximos anos baseia-se em marcar com consciência ética e sustentável e aponta para uma elevação do potencial de crescimento de matérias-primas tais como, fragrâncias naturais, sendo assim produtos naturais extraídos da Amazônia garantem destaque em tal setor. O Brasil se destaca no ranking mundial de consumidores de produtos cosméticos, representando 9,4% do consumo mundial de produtos cosméticos, estando abaixo apenas dos Estados Unidos da América e da China. Produtos para a pele foram listadas em 6º lugar no ranking dos produtos mais utilizados (Gráfico 01).



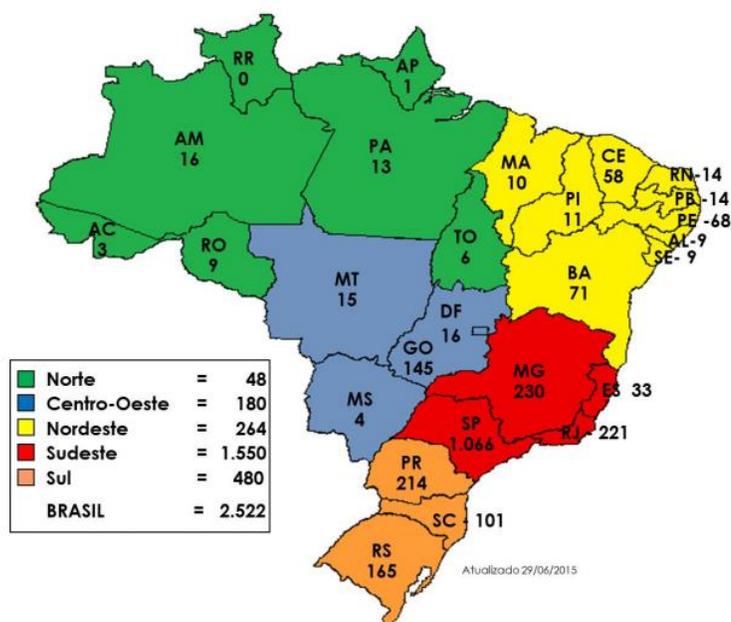
**Gráfico 01:** Ranking mundial de consumo de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética.  
Fonte: ABIHEPC, 2015.

Alguns fatores como o aumento da expectativa de vida e a vontade de manter uma aparência mais jovem, a inserção da mulher no mercado de trabalho e a necessidade de comprar produtos prontos, têm contribuído para o aumento da demanda de produtos de cosméticos e higiene pessoal. De acordo com a ABIHEPC (2015), a Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética apresentou um crescimento médio deflacionado composto próximo a 10% ao ano nos últimos 19 anos. Como se observa no gráfico 02 o faturamento passou de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 43,2 bilhões em 2014.



**Gráfico 02:** Faturamento da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética no Brasil.  
Fonte: ABIHEPC, 2015.

Embora o consumo de produtos cosméticos e de higiene pessoal sofram aumentos anuais, as indústrias que fabricam estes produtos estão distribuídas de forma disforme pelo território nacional (Gráfico 03). O Norte do Brasil é a região que possui menos indústrias desse setor, mesmo abrigando uma gama de plantas medicinais e aromáticas. Considerando o Estado do Pará, onde se encontra a UFOPA, estes números são mais alarmantes, apenas 13 empresas estão registradas no Pará e apenas uma em Santarém-PA.



**Gráfico 03:** Distribuição das indústrias de perfumaria, cosmética e higiene pessoal no Brasil.  
Fonte: ABIHEPC, 2015.

### 1.1.8 Técnicas de análise de produtos naturais: CG-EM, HS-SPME e UPLC

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) baseia-se na técnica de separação das substâncias de uma amostra por meio de sua distribuição ao longo da fase estacionária (sólida ou líquida) e móvel (gasosa), sendo muito utilizada para gases ou substâncias voláteis. A amostra é inserida na coluna contendo a fase estacionária onde a temperatura adequada volatiliza as substâncias que permanecem retidas de acordo com suas propriedades e propriedades

da coluna, sendo assim chegam ao final da coluna em tempos diferentes, podendo ser detectadas por um espectrômetro de massas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Já a técnica *HS-SPME* (Micro extração em fase sólida no *headspace*<sup>2</sup>) não utiliza solvente e tem alto poder de concentração, adequada a sensibilidade dos detectores de CG, a mesma é aplicável a muitos tipos de analito. O elemento básico da técnica é um bastão de fibra ótica de 100 mm de diâmetro, feita com sílica fundida (FS), com 10 mm de extremidade recoberta com um filme fino de um polímero (PDMS=polidimetilsiloxano, PA=poliacrilato ou Carbowax=Cxx) ou de um adsorvente sólido (carvão ativo microparticulado=Carboxen). A extração ocorre mergulhando a seção recoberta no “headspace” da amostra (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

*UPLC* (Ultra Performance Liquid Chromatography) vem da *HPLC* (High Performance Liquid Chromatography). A técnica *UPLC* é uma ferramenta ideal para a separação rápida de misturas complexas. *UPLC* é considerada a nova direção da cromatografia líquida, aprimorando três áreas: velocidade, resolução e sensibilidade. A grande diferença está no tamanho das partículas utilizadas na coluna, as partículas da *UPLC* são muito menores. Ao utilizar partículas menores a velocidade e o número de picos registrados em função do tempo são muito melhores (PRATIMA, SHRADDHA e ZIBRAN, 2013).

O clássico método de separação *HPLC* apresenta muitas vantagens como robustez, facilidade de uso, boa seletividade e sensibilidade ajustável. A sua principal limitação é a falta de eficiência em comparação com a cromatografia gasosa ou a eletroforese capilar devido aos baixos coeficientes de difusão em fase líquida, envolvendo difusão lenta de analitos na fase estacionária (PRATIMA, SHRADDHA e ZIBRAN, 2013).

A *UPLC* é adequada para análise de produtos naturais pois fornece separações de alta qualidade e capacidades de detecção para identificar os compostos ativos em amostras altamente complexas que resultam de produtos naturais e fitoterápicos tradicionais (PRATIMA, SHRADDHA e ZIBRAN, 2013).

---

<sup>2</sup> Da tradução “espaço de cabeça” consiste no espaço vazio no qual estão volatilizados os compostos presentes na amostra.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter o perfil fitoquímico do resíduo sólido proveniente do processo de extração de óleo essencial de priprioça (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*) cultivada em Santarém-PA. Avaliar o potencial tóxico, citotóxico (antiproliferativo) e antimicrobiano dos extratos do resíduo sólido de priprioça. Caracterizar quimicamente o hidrolato de priprioça e avaliar a atividade antimicrobiana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Preparar extratos do resíduo sólido de priprioça com solventes orgânicos de diferentes graus de polaridade em sistema Soxhlet e em sistema descontínuo (banho-maria).
- b. Fracionar o extrato etanólico dos resíduos sólidos de priprioça por meio de extração ácido-base.
- c. Fracionar o extrato etanólico dos resíduos sólidos em compostos polares e apolares.
- d. Fracionar o extrato hexânico obtido no item a em coluna cromatográfica *flash*.
- e. Identificar por Cromatografia de Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) compostos voláteis presentes no óleo essencial, no extrato hexânico do resíduo sólido e no hidrolato de priprioça.
- f. Identificar compostos voláteis presentes no hidrolato por *HS-SPME*.
- g. Avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos dos itens **a**; **d**.
- h. Avaliar a toxicidade frente *Artemia salina* dos extratos do item **c**.
- i. Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos nos dos itens **b**; **d** e do hidrolato de priprioça.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Para a execução da parte experimental do trabalho utilizou-se os seguintes equipamentos:

- Balança analítica da marca Shimadzu, modelo AUY 220;
- Moinho triturador da marca Garthen;
- Moinho de facas da marca Marconi;
- Evaporador rotativo da marca Fisatom, modelo 801 com sistema de refrigeração acoplado;
- Refrigerador marca Brastemp, modelo Inverse maxi;
- Dorna piloto (protótipo de 150L em aço inox);
- Cromatógrafo à Gás acoplado a Espectrômetro de Massas Agilent, modelo: HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas;
- Cromatoplasmas de alumínio, sílicagel 60 mesh, marca Merck;
- Estufa ALGINE;
- Espectrofotômetro Shimadzu UV mini 1240;
- Molecular Devices®, modelo VersaMax;

Para o estudo químico e biológico foram utilizados os seguintes reagentes, solventes e materiais biológicos:

#### **Reagentes:**

- HCl;
- Ágar;
- NaHCO<sub>3</sub>;
- Caldo Müller Hilton;
- Cloreto de trifenil tetrazólio (CTT);
- NaOH;
- RPMI 1640;
- Sílica Merck 400 mesh;
- Sílica Merck 60 mesh;
- Soro fetal bovino;

- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- Sulforrodamina B (SRB);
- Trizma base.

**Solventes:**

- Acetato de etila P. A (AcOET);
- Ácido tricloroacético (TCA);
- Diclorometano P.A (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Etanol 96% (EtOH);
- Hexano P.A. (HEX);
- Metanol P. A (MeOH);
- Trimetilsilil-diazometano (TMSD);
- Tween® 80%.

**Material biológico:****Cepas**

- *Aspergillus niger* – ATCC 16404;
- *Bukorolderia cepaceae* – ATCC 25416;
- *Candida albicans* - ATCC 10231;
- *Escherichia coli* - ATCC 11775;
- *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 13388;
- *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538.

**Linhagens tumorais humanas:**

- 786-0 (rim);
- HT29 (cólon);
- K562 (leucemia);
- MCF-7 (mama);
- NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células);
- NCI-ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos);

- OVCAR-3 (ovário);
- PC-3 (próstata);
- U251 (glioma).

**Linhagem não tumoral humana:**

- q = HaCat (queratinócitos imortalizados).

**Microcrustáceo**

- Náuplios de *Artemia salina*.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Coleta do material vegetal

A espécie de priprioca implantada e cultivada em Santarém foi a espécie *C. articulatus* var. *nodosus* da região de Belém, PA, obtida especificamente do município de Santo Antônio de Tauá – PA. O número de registro da exsicata é MG: 207174 e encontra-se depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi localizado em Belém, Pará. Para implantar um hectare de cultivo de priprioca foram necessários 300 kg de rizomas/ha, adquiridos ao preço de R\$ 4,00/kg.

A coleta dos órgãos subterrâneos (rizomas, tubérculos e raízes) foi realizada na área onde se desenvolve o projeto de cultivo da priprioca, localizada na comunidade Tabocal, BR-163, km 23, adentrando cerca de 3 km no ramal da Terra Preta, município de Santarém-PA [(-54°43'00,10"W e -02°37'41,10"S)]. O solo da área de Tabocal após análise granulométrica<sup>3</sup> foi classificado como arenoso, com pH igual a 5, considerado de baixa acidez, devido ao processo de calagem sofrido nos últimos dois anos. A área também passou por adubação orgânica, incorporação de cama de frango curtido, recebendo, assim, rica quantidade de macro e micronutrientes

Em março de 2014 foram coletados 1000 kg de órgãos subterrâneos (rizomas, tubérculos e raízes) de priprioca (Fig 5). Após a colheita, os órgãos subterrâneos passaram por um processo de limpeza para a retirada dos catáfilos e escapos. Para condução e armazenamento foram utilizados sacos de rafia com capacidade de 50 kg, com pequenos furos que permitiram o arejamento do

---

<sup>3</sup> O cultivo faz parte de um projeto maior apoiado pela CAPES conduzido pelo Pós-Doc Michelly Rios Arévalo e orientado pelo Prof. Lauro E. S. Barata coordenador do Lab. P&DBIO-UFOPA.

material, impedindo, assim, a formação de um microclima que possibilite a proliferação de microrganismos. Os rizomas foram lavados em duas águas e em água adicionada de hipoclorito de sódio 2,5%. A secagem dos rizomas e tubérculos foi realizada em estufas a 60°C. Depois de seco o material perdeu 45% de umidade, restando 550 kg. O material foi transportado de barco (2 dias) para a Empresa Beraca em Belém-PA onde foram triturados em moinho industrial<sup>4</sup> e teve o óleo essencial extraído. Em consequência gerou um resíduo sólido (PRI-RES) que foi utilizado para esta pesquisa.



**Figura 5A:** Cultivo de priprioca na comunidade Tabocal, Santarém-PA;  
**Figura 5B:** Rizoma de *C. articulatus* var. *nodosus*) cultivados em Santarém-PA.  
**Fonte:** Arquivos pessoais de Michelly Rios Arévalo.

### 3.3 EXTRAÇÕES E FRACIONAMENTOS

#### 3.3.1 Extração do OE1 na Empresa Beraca e obtenção dos resíduo sólido de priprioca

A extração do óleo essencial dos rizomas e tubérculos foi realizada pelo método de arraste à vapor em dorna industrial nas imediações da Empresa Beraca no processo coordenado pelo Prof. Dr. Lauro E. S. Barata.

Para eliminar traços de água oriundos processo de separação e que ainda está contido no óleo essencial utilizou-se 20 mg de sulfato de sódio anidro.

Ao final, dos 550 kg de rizomas secos de priprioca, foram extraídos 2,2 litros de óleo essencial com rendimento de 0,45%.

<sup>4</sup> O processo foi coordenado pelo Prof. Lauro E. S. Barata na Empresa BERACA, Belém-PA

### 3.3.2 Extração do OE2 em dorna piloto no Lab. P&DBio e obtenção do hidrolato de priprioica

O hidrolato utilizado para caracterização química e ensaios biológicos foi proveniente da extração de OE dos rizomas de priprioica coletados na área de cultivo Tabocal em junho de 2015. O material vegetal foi seco em estufa a 60°C. A extração foi realizada em junho de 2015, pela técnica de arraste a vapor<sup>5</sup> em dorna piloto (Fig 6) de 150L em aço inox do laboratório P&DBIO. 2,070 kg de rizomas de priprioica foram triturados e inseridos na dorna. Obteve-se 3,131 g de óleo essencial de priprioica e um rendimento de 0,15%.



**Figura 6:** Dorna piloto para extração de óleo essencial de material vegetal por arraste a vapor.

**Fonte:** Arquivos pessoais da autora.

O hidrolato foi armazenado em frascos de plástico e mantido sob refrigeração em geladeira a aproximadamente 4°C. 500 mL de hidrolato de priprioica foram extraídos com 3 X 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Recuperou-se 121,4 mg de óleo essencial de priprioica, rendimento de 2,4%.

<sup>5</sup> Na técnica de arraste à vapor o material vegetal não entra em contato com a água. O vapor de água passa através do material moído e arrasta os compostos voláteis presentes.

O OE de priprioca e o concentrado de hidrolato foram caracterizado quimicamente por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).

### 3.3.3 Obtenção dos extratos orgânicos

Soxhlet: As extrações via Soxhlet foram realizadas em triplicatas nas quais 40 g de resíduo sólido de priprioca foram inseridos num cartucho de papel de filtro dentro do copo extrator do Soxhlet (Fig 7). Adicionou-se 500 mL de n-hexano no balão de fundo redondo. O período de extração foi de 8 h para cada solvente. Após o hexano completar o período utilizou-se o diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), em seguida o acetato de etila (AcOEt) e por fim etanol (EtOH), sendo este tipo de extração conhecida como extração sucessiva. As soluções de extratos foram concentradas em evaporador rotativo a pressões reduzidas gerando um extrato concentrado com as seguintes médias de rendimento: Extrato hexânico (PRIr-S-HEX): 810 mg, Extrato diclorometânico (PRIr-S-DIC): 980 mg, Extrato acetato de etila (PRIr-S-ACOET): 1,057 g, extrato etanólico (PRIr-S-ET): 3,02 g.



**Figura 7:** Equipamento de extração do tipo “Soxhlet”  
**Fonte:** Arquivos pessoais da autora.

Banho-maria: A extração por banho maria foi realizada em triplicatas com 150 gramas de resíduo sólido de priproica inseridos juntamente com 600 mL de etanol 96° L/L em béqueres de 2000 mL imersos no banho à 60 °C. A extração perdurou durante 8 h com agitações periódicas. As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo a pressões reduzidas gerando um concentrado de extratos etanólicos com média 10,5 g.

### 3.3.4 Extração ácido-base do extrato etanólico obtido em banho-maria

Utilizou-se 10 g do extrato etanólico extraído em banho-maria do resíduo sólido de priproica. Ressolubilizou-se o extrato etanólico em 50 mL de acetato de etila. A solução AcOEt inicial (A) foi transferida para um funil de separação de 250 mL, e extraída com as soluções aquosas na ordem descrita abaixo (Fig 8):

a) Extração com HCl: Extraíu-se a solução de acetato de etila inicial (A) com solução aquosa de HCl 2% (3x30 mL). A solução AcOEt (A) foi mantida no funil para prosseguir a extração. Juntou-se as frações aquosas ácidas. Neutralizou-se pela adição de uma solução 5 M de NaOH até meio básico (pH = 12). Essa solução aquosa foi extraída com acetato de etila (3x30 mL) utilizando um outro funil de separação. Transferiu-se esta solução para um erlenmeyer, secou-se com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Evaporou-se a solução em evaporador rotativo. Obteve-se rendimento de 4,22 %. Este extrato foi denominado: **PRIr-Bases**.

b) Extração com NaHCO<sub>3</sub>: Extraíu-se a solução de acetato de etila (A) no funil de separação, com NaHCO<sub>3</sub> 5% (3x30 mL). Guardou-se a solução de acetato de etila (A) para prosseguir a extração. Juntou-se as frações aquosas de NaHCO<sub>3</sub>. Resfriou-se a aproximadamente 10°C e neutralizou-se adicionando pequenas quantidades de HCl concentrado, agitando vigorosamente até meio ácido (pH= 4). Coletou-se o precipitado formado através de uma filtração a vácuo utilizando o funil de Büchner. Obteve-se rendimento de 8,76%. Este extrato foi denominado: **PRIr-Ácidos**.

c) Extração com NaOH: Extraíu-se a solução de acetato de etila (A) com NaOH 3% (3x30 mL). Guardou-se a solução de acetato de etila para prosseguir a extração. Resfriou-se á aprox. 10°C e neutralizou-se adicionando pequenas quantidades de HCl concentrado, agitando vigorosamente até meio ácido (pH= 4). Coletou-se o precipitado formado através de uma filtração

a vácuo utilizando o funil de Büchner. Obteve-se rendimento de 10,61%. Este extrato foi denominado: **PRIr-Fenóis**.

d) Compostos neutros: Lavou-se a solução acetato de etila (A) do funil de separação (A) com solução aquosa de NaCl (2%) (2x30 mL). Transferiu-se a solução de acetato de etila para um erlenmeyer. Secou-se com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrou-se e a solução foi concentrada em evaporador rotativo. Obteve-se rendimento de 19,14%. Este extrato foi denominado: **PRIr-Neutros**.



**Figura 8:** Processo de extração do extrato etanólico do resíduo sólido de priproica com ácidos e bases em funil de separação.

**Fonte:** Arquivos pessoais da autora.

### 3.3.5 Fracionamento em Cromatografia em coluna via úmida

Compostos básicos (PRIr-Bases): 142,5 mg de PIR-Bases foram fracionados em cromatografia de coluna, preparada em coluna de vidro com filtro sinterizado com 20 g de sílica Merck 60 mesh. As fases móveis utilizadas foram: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 99:1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 98:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 97:3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 95:5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 90:10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 80:20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 70:30, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 50:50, MeOH 100%. Foram coletadas 21 frações que após análise em CCD as que apresentaram um perfil semelhante foram reunidas, totalizando 8 frações.

Extrato hexânico obtido via Soxhlet: Para o preparo da coluna *flash* (Fig 9) utiliza-se sílica de partículas menores (230-400 mesh) sendo necessária a utilização de um sistema de bombeamento a vácuo para empacotamento e eluição (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998). Utilizou-se 20 gramas de sílica Merck 400 mesh.

A coluna cromatográfica foi preparada em funil de vidro com filtro sinterizado e empacotada a seco. Utilizou-se 2,24 g de extrato hexânico para a preparação da amostra a ser fracionada. Redissolveu-se o extrato em hexano depositando-o sob uma capsula de porcelana em banho-maria. Após a evaporação do solvente o extrato foi incorporado à sílica e a amostra foi depositada sobre a sílica na coluna cromatográfica. Um algodão foi inserido sobre a amostra para que o empacotamento da sílica não fosse comprometido ao verter o solvente. O kitassato foi acoplado ao sistema de vácuo.

Os eluentes utilizados para a fase móvel foram, respectivamente: Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 70:30 (Fração 1), Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 30:70 (Fração 2), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% (Fração 3), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 98/02 (Fração 4) e MeOH (Fração 5). Após análise em CCD as frações 1 e 2 foram agrupadas.

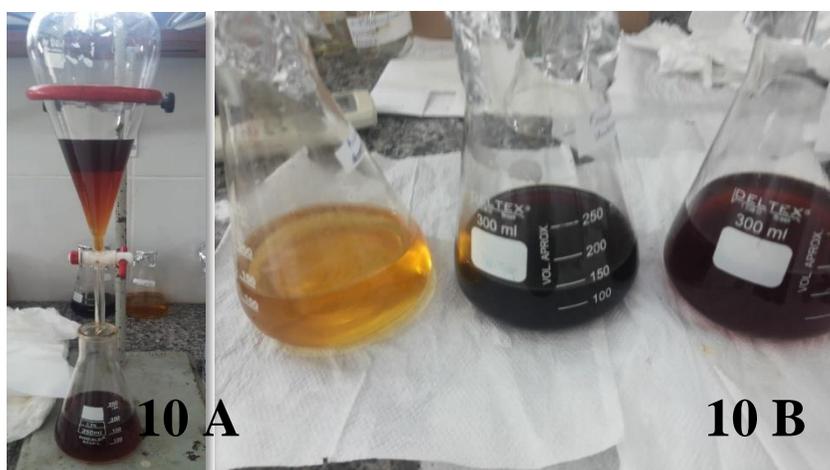


**Figura 9:** Sistema montado para a realização de cromatografia em coluna *flash*.

**Fonte:** Arquivos pessoais da autora.

### 3.3.6 Partição líquido-líquido do extrato etanólico

Para o fracionamento por polaridade 11,22 g de extrato etanólico obtido via banho-maria foi solubilizado em 150 mL de solução etanol/água 70:30 (Fig 10). A solução foi transferida para um funil de separação e iniciou-se o processo de partição líquido-líquido na ordem: hexano, diclorometano e acetato de etila (3 X 30 mL cada). Ao final, as soluções foram secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtradas e concentradas em evaporador rotativo a pressão reduzida, obtendo-se os extratos: PRIr-P-HEX, PRIr-P-DIC e PRIr-P-ACOET.



**Figura 10:** **10 A-** Partição líquido-líquido do extrato etanólico do resíduo sólido de priproica e extratos derivados, **10 B-** Frações obtidas do processo de partição líquido-líquido.

**Fonte:** Arquivos pessoais da autora.

### 3.3.7 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As CCDs foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio, sílicagel 60 mesh, marca Merck. As fases móveis foram produzidas de acordo com a polaridade dos extratos e observação da separação de substâncias nas placas. Para a revelação as placas foram submetidas a irradiação com lâmpadas Ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda: 254 nm e 366 nm. Como agente revelador utilizou-se vanilina sulfúrica e anisaldeído seguidos por aquecimento das placas.

### 3.3.8 Caracterização via CG-EM, HS-SPME e UPLC

O equipamento utilizado para cromatografia gasosa foi o Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas Agilent, modelo: HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas, patrimônio do CPQBA – Unicamp.

Para 1  $\mu\text{L}$  o óleo essencial e hidrolato de priprioca:

- Coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).
- Temperatura injetor = 220°C,
- Temperatura detector = 250°C,
- Coluna= 60 °C, 3° C.  $\text{min}^{-1}$ , 240 °C (20min),
- Gás de arraste= He 1,0 mL.  $\text{min}^{-1}$ .

Para 10 mg/mL de extrato hexânico do resíduo sólido de priprioca, extrato hexânico derivatizado e frações do extrato hexânico do resíduo sólido de priprioca obtidas via cromatografia em coluna *flash* utilizou-se o método Cumaru, especialmente desenvolvido pelo prof. Dr. Adilson Satoratto para análise de compostos voláteis em extratos:

- Coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).
- Temperatura injetor = 250°C,
- Temperatura detector = 300°C,
- Coluna= 80 °C, 5° C.  $\text{min}^{-1}$ , 280 °C (20min),
- Gás de arraste= He 1,0 mL.  $\text{min}^{-1}$ .

Os espectros de massa obtidos foram comparados com os disponibilizados na biblioteca NIST e bibliografia Adams (2007).

A técnica de microextração em fase sólida no *headspace* da amostra (HS-SPME) foi utilizada para determinação dos componentes voláteis presentes no hidrolato. Para tanto, 50 mL de hidrolato foram inseridos em um frasco fechado e foi aquecido a 60 °C juntamente com agitação constante. Após a estabilização do sistema, a fibra PDMS-DVB (polidimetilsiloxano-divinilbenzeno) com 65  $\mu\text{m}$  de espessura do filme foi exposta aos componentes voláteis presentes no *headspace* ficando retidos na fibra por adsorção. Após 30 minutos a fibra foi recolhida para o interior da seringa e inserida no cromatógrafo à gás acoplado a detector seletivo de massas (CG-EM).

As análises em *UPLC* foram realizadas para o extrato etanólico do resíduo sólido e as frações obtidas via extração ácido-base, além de três frações obtidas via fracionamento dos compostos básicos em coluna cromatográfica em equipamento Acquity Plus®, no laboratório de Espectrometria de Massas, no Instituto de Química da Unicamp.

### **3.3.9 Derivatização do extrato hexânico**

Para a derivatização do extrato hexânico (esterificação dos ácidos graxos) solubilizou-se 10 mg de extrato hexânico do resíduo sólido de priprioca em 2 mL de solução CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 90:10. Em seguida adicionou-se o reagente trimetilsilil-diazometano (TMSD) (BOAVENTURA JR., 2015).

## **3.4 AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

### **3.4.1 Teste de toxicidade em *Artemia salina***

O teste de toxicidade em *Artemia salina* foi realizado com as três frações obtidas por partição líquido-líquido: PRIr-P-HEX, PRIr-P-DIC e PRIr-P-ACOET. As frações foram diluídas em água salina com auxílio do reagente Tween® 80%. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições em esquema fatorial 4x3, sendo quatro o número de concentrações: 50; 5,0; 0,50 e 0,05 µg/mL das amostras testadas e três frações oriundas do processo de partição líquido-líquido. O teste positivo e negativo foi avaliado com etanol e água salina respectivamente. A mortalidade por toxicidade da *A. salina* foi avaliada com 10 indivíduos por tubo de ensaio.

### **3.4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa**

Os testes de atividade antiproliferativa foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas) – UNICAMP, sob coordenação da Dra. Ana Lúcia Ruiz.

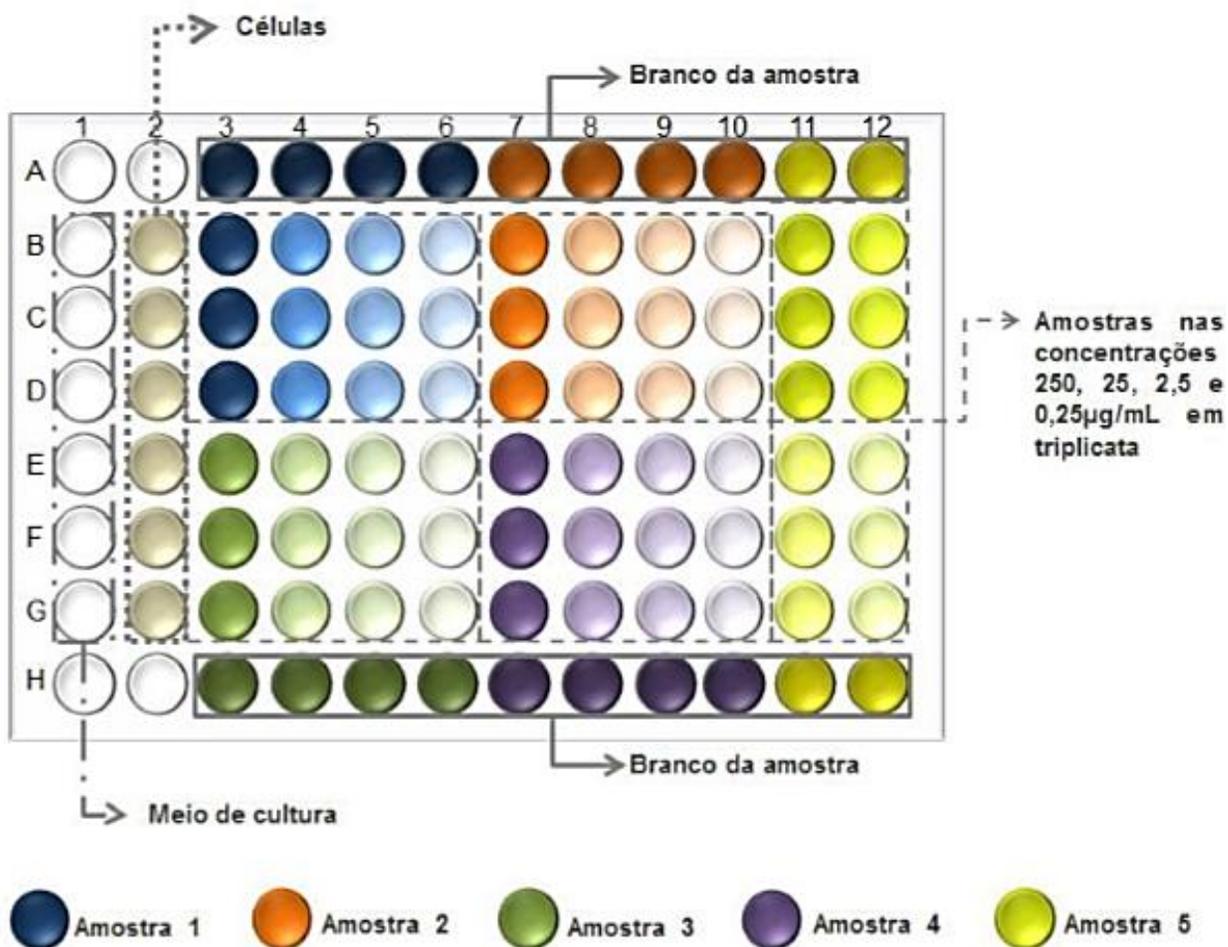
Foram utilizadas nove linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); 786-0 (rim); NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário); HT29 (côlon); K562 (leucemia) e NCI-ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos) e uma linhagem não tumoral humana: q = HaCat (queratinócitos imortalizados).

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementadas com 5% de SBF e penicilina:estreptomicina (100UI/mL:100µg/mL), densidade de inoculação:  $3,0 \times 10^4$  cel/mL. Foram inoculados 100 µL por compartimento de suspensão celular em placas de 96 compartimentos. Preparou-se também uma placa controle ( $T_0$ ) com as respectivas linhagens celulares. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de gás carbônico ( $CO_2$ ) em ambiente úmido.

Os extratos foram diluídos em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. Essas soluções foram diluídas cerca de 400 vezes no meio de cultura com a finalidade de evitar a toxicidade de DMSO. Os extratos foram adicionados nas concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL em triplicata, em seguida foram incubados por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de  $CO_2$  e ambiente úmido em placas de 96 poços (Fig. 11).

As células inoculadas na placa controle  $T_0$  foram fixadas com a adição de 50 µL/compartimento de TCA a 50% para a determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, correspondendo este ao valor basal  $T_0$ . As células foram fixadas após 48 horas de tratamento com 50µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA) e incubadas a 4°C durante 1 h. Após o período, as placas passaram por processo de quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio de soro fetal e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, foram adicionados 50 µL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (coloração fortemente rosada) a 4% m/v dissolvido em solução de ácido acético 1% sendo as placas mantidas em temperatura ambiente por cerca de 30 min. Em seguida as placas foram lavadas por quatro vezes com solução de ácido acético 1% e, após secagem, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base. A leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).



**Figura 11:** Placa de 96 compartimentos usada no ensaio da SRB.  
**Fonte:** Divisão de Farmacologia e Toxicologia - CPQBA – Unicamp.

Descontando o valor de seus respectivos brancos foi possível calcular as médias das absorvâncias e determinar a porcentagem de crescimento de cada amostra testada. Se T representa a média da absorvância das células, C o controle de célula e  $T_0$  o controle de células no dia da adição das amostras,  $T > C$  significa que a amostra-teste estimulou o crescimento celular,  $T \geq T_0$  e  $< C$  significa que a amostra teste inibiu o crescimento celular, ou seja, houve efeito citostático.

O cálculo do crescimento celular (%) é realizado pela fórmula:  $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$ . Se  $T < T_0$  a amostra-teste induziu morte celular, portanto apresentou efeito citocida. Esses resultados foram expressos em curva de crescimento celular em função da concentração da amostra através de regressão não linear, com o software ORIGIN 8.0 (SKEHAN *et al.*, 1990; MONKS *et al.*, 1991; SHOEMAKER, 2006).

### 3.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes microbiológicos foram realizados na Divisão de Microbiologia do CPQBA (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas) – UNICAMP, sob coordenação da Dra. Marta Teixeira.

Extrato hexânico, frações do extrato hexânico e frações da extração ácido-base do resíduo sólido e o hidrolato de pripioca foram avaliados em testes com 06 microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bukorolderia cepaceae*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* em quatro concentrações 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95 µg/mL.

PRIr-Ácidos, PIRr-Fenóis, PIRr-S-HEX2; PIRr-S-HEX-Fr1,2; PIRr-S-HEX-Fr3; PIRr-S-HEX-Fr4 E PIRr-S-HEX-Fr5 e o hidrolato de pripioca foram diluídos em meio Müller-Hinton, preparando-se uma concentração de 8 mg/mL, obtendo concentração de 2 mg/mL no primeiro compartimento da placa de microdiluição.

Os inóculos das quatro bactérias para os testes de susceptibilidade foram preparados de acordo com as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2003). Transferiu-se culturas de bactérias de 24h cultivadas em meios específicos para tubos de ensaio contendo 4 mL de solução salina estéril. Após agitação das soluções de bactérias em vórtex, alíquotas de 2 mL foram analisadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 625 nm e ajustadas com solução salina para DO de 0,08 a 0,10 correspondente à concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. O mesmo volume de solução salina foi adicionado aos 2 mL remanescentes. Com as soluções padronizadas, realizou-se uma diluição seriada, sendo a última concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL e, dessas últimas soluções, 6 mL foram transferidos para tubos com 3 mL de meio de cultura (Caldo Mueller Hinton ou BHI), estabelecendo-se uma concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL ou  $1,0 \times 10^5$  em 100 µL, nos quais cada poço das microplacas inoculados apresentem concentrações de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

Para a levedura *C. albicans* esperou-se o seu crescimento em tubo de ensaio contendo meio ágar Saboraud a 35°C por 48 h. Alíquotas da cultura foram transferidas com o auxílio de alça de platina para um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução salina 0,85% estéril. A solução foi homogeneizada em vórtex sendo uma alíquota (2 mL) lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 530 nm e ajustada com solução salina 0,85% para uma DO de 0,09 a 0,11,

correspondente à  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL. A partir da solução padronizada foi realizada a diluição seriada para obter ao final da mesma  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL. Finalmente, 1 mL da solução diluída foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo RPMI-1640, correspondendo à concentração de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL ou  $2,5 \times 10^2$  UFC em 100  $\mu$ L (NCCLS, 2002b).

Já os fungos filamentosos foram cultivados em placa de Petri com o meio mais adequado por 10 dias. Após a esporulação, as placas contendo fungo foram cobertas com 1,0 mL de solução estéril de Tween 20 a 0,5% e homogeneizadas delicadamente com alça de Drigalski. O sobrenadante (suspensão de esporos) das placas foi retirado com pipeta Pasteur estéril, filtrado em gaze para reter os fragmentos de hifas e transferido para um tubo de ensaio estéril.

Uma alíquota da suspensão de esporos foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 530 nm e ajustada com solução salina 0,85% para uma DO de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%). O processo se repetiu para a alíquota remanescente, buscando-se as mesmas concentrações. Em seguida, a suspensão padronizada foi diluída na proporção 1:50 no meio padrão (RPMI-1640), correspondendo a 2x a densidade necessária de aproximadamente  $0,4 \times 10^4$  UFC/mL (NCCLS, 2002a).

- **Teste da Microdiluição**

Foram depositados 100  $\mu$ L de caldo RPMI-1640 em uma microplaca estéril de 96 orifícios ou poços (8 linhas A-H/1-12 colunas). 50  $\mu$ L do extrato diluído (controle de esterilidade das amostras) foram depositados na primeira coluna. Na segunda coluna foram depositados 100  $\mu$ L de cada extrato, sendo o conteúdo dos orifícios homogeneizados com o meio e transferidos para os orifícios da coluna seguinte, repetindo-se o procedimento até a coluna 12, sendo os 100  $\mu$ L finais desprezados. As concentrações avaliadas variaram entre 2000 e 1,95  $\mu$ g/mL. Adicionou-se nas colunas de 2 a 12 um volume de 100  $\mu$ L do inóculo padronizado (esporos, leveduras ou bactérias), selando-as com *parafilm*.

As placas foram incubadas em estufa a 25 °C por 24 h para as bactérias. Após o tempo de incubação, foram depositados em todos os poços 50  $\mu$ L de solução 0,1% de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) e as placas reincubadas por um período de 2h. O CTT confere ao meio o aparecimento da coloração vermelha quando as células apresentam atividade respiratória (NCCLS,

2003). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha.

Após o período de incubação das bactérias foram adicionados 50  $\mu$ L da solução de CTT e as placas reincubadas por 3 h. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória.

Após o período de incubação da levedura e do filamentoso foi verificada mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DO OE1 E RESÍDUO SÓLIDO DE PRIPRIOCA (PRI-RES)

Para o processo industrial realizado na Empresa Beraca em Belém-PA, sob supervisão do professor Lauro Barata, foi necessária a produção de uma tonelada dos rizomas da espécie, que depois de seca em estufa por três dias foi extraída por meio do processo de arraste a vapor, gerando cerca de 2,2 litros do OE1, um rendimento de 0,45%. Corumbá (2009) relata que o rendimento do OE de priprioca pode atingir a percentuais de até 1%, utilizando-se métodos mais sofisticados de extração, como a extração com fluído supercrítico (CO<sub>2</sub>). Observou-se que os rizomas de priprioca possuíam 45% de umidade. Até o momento não há relatos na literatura acerca da utilização desse resíduo por parte de indústrias cosméticas. Após a extração do óleo essencial, estes resíduos foram submetidos a extração com solventes orgânicos.

Após extração do OE restou uma quantidade aproximada de 500 kg de resíduos sólidos (borra), dos quais uma alíquota foi o objeto de nossos estudos. Calcula-se que pelo menos 10 ton de rizomas de priprioca são extraídos anualmente na Empresa Beraca para produzir cerca de 50 kg de OE, considerando um rendimento de ~0,5%, onde a maior parte é fornecida à Natura. Aparentemente, o resíduo que sobra do processo (em torno de 9,5 ton), é desperdiçado, transformado em adubo ou queimado nas caldeiras para gerar vapor (BARATA, 2015)<sup>6</sup>. Sabe-se que os rizomas da priprioca são ricos em substâncias sesquiterpênicas, principalmente das classes dos patchulanos, eudesmanos, cariofilanos e rotundanos (ZOGHBI *et al.*, 2008). Estudos realizados pelo Laboratório P&DBio sobre a composição química do óleo essencial de priprioca corroboram com os dados informados pela literatura.

A Tabela 1 mostra a composição química do OE1 dos rizomas de priprioca cultivados em Santarém-PA, extraídos pela técnica de arraste a vapor na Empresa Beraca. O óleo essencial foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplado a detector seletivo de massas (CG-EM)<sup>7</sup> no CPQBA-UNICAMP em parceria com o Lab. P&DBIO. A caracterização revela as mesmas classes de substâncias encontradas por Zoghbi *et al.* (2008) embora não necessariamente os mesmos percentuais descritos.

---

<sup>6</sup> Informações pessoais de Lauro E. S. Barata.

<sup>7</sup> Cromatogramas em ANEXOS.

**Tabela 1:** Composição química do OE1 dos rizomas de piprioca cultivados em Santarém-PA, coletados em março de 2014, extraídos em dorna industrial na Empresa Beraca

<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>IR</b>	<b>Identificação</b>	<b>% rel.</b>
5,54	933	$\alpha$ -pineno	4,85
6,05	953	tuja-2,4(10)-dieno	0,56
6,66	977	$\beta$ -pineno	1,94
8,08	1024	$\rho$ -cimeno	0,83
8,21	1028	limoneno	0,49
9,70	1071	M = 152	2,12
10,35	1090	$\rho$ -cimeneno	1,47
12,26	1139	trans-pinocarveol	3,08
12,64	1148	n.i.	0,69
13,39	1167	para-menta-1,5-dien-8-ol	1,33
14,37	1191	alfa-terpineol	1,19
14,62	1198	mirtenol	4,21
15,11	1209	verbenona	2,77
21,66	1366	ciclosativeno	0,69
22,06	1375	$\alpha$ -copaeno	6,57
22,99	1398	cipereno	3,29
23,25	1404	M = 202	2,79
25,38	1457	rotundeno	2,06
26,00	1473	M = 202	1,32
26,12	1476	$\delta$ -cadineno	2,28
26,53	1486	$\beta$ -selineno	8,45
27,01	1498	M = 220	2,45
27,29	1505	M = 204	2,38
27,61	1513	M = 202	0,86
27,96	1523	trans-calameneno	2,52
28,32	1532	M = 220	2,40
28,42	1534	M = 220	1,72
28,73	1542	$\alpha$ -calacoreno	2,63
29,04	1550	M = 220	0,90
29,69	1567	M = 220	1,41
30,20	1581	óxido de cariofileno	1,28
30,62	1591	M = 220	1,12
31,46	1614	M = 220	1,19
33,29	1664	M = 218	1,66
33,61	1672	M = 222	0,92

**continua**

33,84	1679	mustacona	10,65
34,36	1693	ciperotundona	1,49
34,91	1708	cis-tujopseno	3,44
35,91	1737	M = 234	1,04
36,36	1750	ciccolorenona	6,99

As estruturas químicas de todas as substâncias listadas nesse trabalho são apresentadas ANEXOS.

O resíduo sólido proveniente da extração do OE1 foi o utilizado neste estudo. No entanto, o seu hidrolato não pôde ser utilizado para estudos, pois o mesmo apresentou-se contaminado com furfural, provavelmente proveniente do recipiente no qual o mesmo foi armazenado. Portanto, foi necessária uma nova extração de óleo essencial dos rizomas de priprioica cultivada na comunidade Tabocal para a obtenção do hidrolato de priprioica livre de contaminações.

#### 4.2 PROCESSO 2: EXTRAÇÃO DO OE2 E HIDROLATO DE PRIPRIOICA

Os rizomas de priprioica utilizados no processo 2 foram coletados no período chuvoso (junho de 2015) da Região Amazônica brasileira. A obtenção do OE2 gerou o hidrolato estudado. A caracterização química do óleo essencial foi realizada para auxiliar na comparação da composição química do hidrolato obtido, visando também a utilização deste subproduto em cosméticos e domissanitários devido ao odor intenso e agradável. Obteve-se 3,13 g de óleo essencial de priprioica com rendimento de 0,15%. Os componentes majoritários identificados estão relacionados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Composição química do OE2 dos rizomas de priprioica cultivada em Santarém-PA extraído em dorna protótipo no Laboratório P&DBio

tr (min)	IR	Identificação	% rel.
5,502	970	$\alpha$ -pineno	3,27
6,619	997	$\beta$ -pineno	1,97
12,205	1136	trans-pinocarveol	1,72
14,519	1194	mirtenal	3,23
21,996	1380	$\alpha$ -copaeno	9,91
22,939	1403	$\delta$ -selineno	5,5

**continua**

23,204	1410	cipereno	3,98
25,338	1463	M=204	2,47
26,460	1491	$\alpha$ -selineno	10,74
29,669	1571	M=206	5,42
29,897	1577	M=220	2,95
30,384	1589	óxido de cariofileno	8,63
32,878	1651	$\beta$ -humuleno	4,12
33,768	1686	mustacona	15,19
34,864	1700	aristolona	1,9
36,310	1736	2(1H) naftalenona- 3,5,6,7,8,8a-hexahidro- 4,8a-dimetil-6-(1- metiletenil)	4,81

Houve ainda a extração do óleo essencial (OE3) para fins comparativos, a coleta ocorreu em novembro de 2014, período seco na Amazônia. O OE3 apresentou um percentual de aproximadamente 21,5 % de monoterpenos e aproximadamente 77,15% de sesquiterpenos

A composição química do OE3 de *prurioca* apresentou como compostos majoritários a isocorimbolona (18,61%), a mustacona (14,24%), a aristolona (9,85%), o *trans*-pinocarveol (5,9%) e o óxido de cariofileno (5,34%). Outros compostos com concentrações superiores a 2% também foram encontrados: mirtenol (4,67%), viridifloreno (2,83%), verbenona (2,74%), 1,3,8-*p*-mentatrieno (2,73%),  $\beta$ -humuleno (2,7%), *trans*-calameneno (2,4%),  $\alpha$ -selineno (2,08%), além de dois compostos não identificados com concentrações de 4,33% e 2,61% respectivamente.

Já o OE1, com os rizomas coletados em março de 2014, período chuvoso na Amazônia, apresentou como compostos majoritários as seguintes substâncias mustacona (10,65%),  $\beta$ -selineno (8,45%), ciclocoloronona (6,99%),  $\alpha$ -copaeno (6,57%),  $\alpha$ -pineno (4,85%), mirtenol (4,21%), *cis*-tujopsenal (3,44%), cipereno (3,29%), *trans*-pinocarveol (3,08%).

Em contrapartida, o OE2, com rizomas coletados em junho de 2015 apresentou os seguintes compostos majoritários identificados: mustacona (15,19%),  $\alpha$ -selineno (10,74%),  $\alpha$ -copaeno (9,91%) óxido de cariofileno (8,63%),  $\delta$ -selineno (5,50%), naftalenona (4,81%),  $\beta$ -humuleno (4,12%) e cipereno (3,98%).

O Quadro 1 mostra a comparação dos constituintes majoritários da composição química dos óleos essenciais cultivados em Santarém-PA, nos períodos chuvoso e seco e os compostos

majoritários encontrados por Zoghbi *et al* (2008), cultivados em diferentes municípios paraenses (Caratateua, Santarém Novo, Igarapé-Açu e Vigia).

**Quadro 1:** Comparação entre a composição química do óleo essencial de priprioca obtidos de rizomas coletados em diferentes períodos sazonais (OE1, OE2, OE3) e dos coletados em diferentes municípios paraenses (ZOGHBI)

OE1 (período chuvoso - 2014)	OE3 (período seco - 2015)	OE2 (período chuvoso - 2015)	ZOGHBI <i>et al</i> (2008)
<b>mustacona (10,65%)</b>	isocorimbolona (18,6%)	<b>mustacona (15,19%)</b>	<b>mustacona (6,6-14,5%)</b>
$\beta$ -selineno (8,45%)	<b>mustacona (14,2%)</b>	$\alpha$ -selineno (10,74%)	<i>trans</i> -pinocarveol (1,8-8,1%)
ciclocolorenona (6,99%)	aristolona (9,85%)	$\alpha$ -copaeno (9,91%)	óxido de cariofileno (6,7-13,7%)
$\alpha$ -copaeno (6,57%)	<i>trans</i> -pinocarveol (5,90%)	óxido de cariofileno (8,63%)	$\alpha$ -pineno (4,7-11,9%)
$\alpha$ -pineno (4,85%)	óxido de cariofileno (5,34%)	$\delta$ -selineno (5,50%)	epóxido de humuleno (1,5-11,2%)
mirtenol (4,21%)	mirtenol (4,67%)	naphtalenona (4,81%)	cipereno (0,6-8,9%)
cis-tujopsenal (3,44%)	viridifloreno (2,83%)	$\beta$ -humuleno (4,12%)	mirtenol (3,8-8,3%)
cipereno (3,29%)	verbenona (2,74%)	cipereno (3,98%)	iedol (2,5-8,3%)
<i>trans</i> -pinocarveol (3,08%)	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno (2,7%)	$\alpha$ -pineno (3,27%)	$\beta$ -pineno (3,1-7,4%)
verbenona (2,77%)	$\beta$ -humuleno (2,7%)	mirtenal (3,23%)	eudesma-311-dien-5-ol (0,9-3,6%)
$\alpha$ -calacoreno (2,63%)	<i>trans</i> -calameneno (2,4%)	$\beta$ -pineno (1,97%)	ciperotundona (2,6-5,3%)
<i>trans</i> -calameneno (2,52%)	$\alpha$ -selineno (2,08%)	aristolona (1,9%)	$\beta$ -selineno (0,0-3,3%)

As porcentagens relativas médias descritas por Zoghbi (2008) e as observadas nos óleos OE1, OE2 e OE3 dos rizomas de priprioca cultivados em Santarém-PA, representam uma grande variação na composição química do óleo essencial de priprioca. Os OE1, OE2 e OE3 apresentaram uma composição química variada, mesmo todos sendo provenientes de rizomas cultivados no mesmo local (Tabocal 01). A grande variação na composição química de óleos essenciais é

resultado da influência de diversos fatores bióticos e abióticos. Entre os fatores bióticos estão a herbivoria e a proteção contra patógenos (PROBST, 2012). Já entre os fatores abióticos estão o estresse hídrico, o solo, a temperatura, a radiação solar, o horário de colheita e o processo de colheita e pós colheita (MORAES, 2009; GLOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A variação da composição química em óleos essenciais não é um fator desejável, especialmente em escala industrial. No caso da *priprioca*, a mustacona é a principal substância responsável pelo odor agradável da planta e também por sua atividade antiplasmódica (Rukunga, 2007). Sendo assim, óleos essenciais com maiores percentuais de mustacona serão mais eficientes para esta finalidade. Observa-se que a mustacona não foi o composto majoritário apenas no OE3, cuja coleta dos rizomas ocorreu no período seco. A tarefa de manter um padrão de qualidade de produtos naturais mostra-se desafiadora.

O óleo essencial de rizomas de *priprioca* cultivados em Santarém-PA apresenta uma qualidade olfativa única devido as baixas concentrações de pineno, um composto que apresenta impacto odorífico negativo<sup>8</sup>, além de apresentar grandes porcentagens de mustacona.

O óleo essencial de *priprioca* possui um alto valor de mercado devido a sua qualidade olfativa e fixativa, portanto, é utilizado para a fabricação de perfumes nobres, como faz a Natura®, que atualmente comercializa o perfume que leva o nome *Priprioca*. De acordo com Tuccorri *et al. apud* Zogbhi (2008), o óleo de *priprioca* fornece difusão, frescor e caráter distinto (madeira molhada, verde, *spicy*), contribui para as notas de cabeça, de coração e de fundo do perfume, sendo assim, a reconstituição é muito difícil e não fornece as mesmas características.

Ao que tudo indica, a inclusão do OE de *priprioca* na perfumaria, embora recente, tende a ser permanente, garantindo a produção dos subprodutos resíduo sólido e hidrolato.

O hidrolato de *priprioca* (Fig 12) apresenta um odor muito agradável e é gerado em grandes quantidades durante o processo de extração de óleo essencial:

---

<sup>8</sup> Informação pessoal do Prof. Dr. Lauro E. S. Barata, repassada por perfumistas.



**Figura 12:** Óleo essencial na fase superior do hidrolato de pripioca.

A quantidade de OE presentes no hidrolato de pripioca foram avaliadas apartir da extração líquido-líquido de 500 g de hidrolato com 150 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Devido a apolaridade das substâncias orgânicas presentes no hidrolato, estas têm mais afinidade para o diclorometano, passando facilmente da fase aquosa para a fase orgânica extrativa. Obteve-se 120 mg de concentrado de substâncias remanescentes do OE2, ou seja, rendimento de 2,4% no hidrolato. O concentrado obtido da extração líquido-líquido do hidrolato de pripioca foi caracterizado quimicamente por CG-EM. A Tabela 3 corresponde a caracterização via CG-EM:

**Tabela 3:** Composição química do hidrolato de pripioca caracterizado por CG-EM

$t_R$ (min)	IR	Identificação	% rel.
9,52	1070	M=152	1,95
12,081	1134	trans-pinocarveol	8,82
12,475	1144	M=137	2,71
13,232	1162	M=152	3,63
14,026	1182	p-cimen-8-ol	3,62
14,204	1187	M=150	2,97
14,452	1193	mirtenol	6,96
14,945	1205	verbenona	23,1
31,679	1621	M=218	2,7
33,197	1659	M=221	2,03

**continua**

33,613	1670	mustacona	11,9
33,748	1673	M=218	5,73
34,159	1683	M=218	2,79
35,342	1713	M=236	4,043
35,731	1722	M=234	3,09
36,914	1752	M=218	2,38
38,091	1781	M=234	0,31
39,712	1821	M=236	3,89
40,792	1848	corimbolona	7,32

O perfil cromatográfico mostrou que o componente majoritário presente no OE obtido a partir do hidrolato de pripioca é a mustacona (11,9%) além da verbenona (23,1%). O OE obtido do hidrolato ainda apresentou altas porcentagens relativas de *trans*-pinocarveol (8,82%), a corimbolona (7,32%) e o mirtenol (6,96%).

Realizou-se ainda a análise do hidrolato utilizando a técnica de *HS-SPME* para identificação dos compostos mais voláteis. Os compostos identificados pela técnica encontram-se relacionados na Tabela 4:

**Tabela 4:** Composição química do hidrolato de pripioca caracterizado por *HS-SPME*

tr (min)	IR	Identificação	% rel.
12,049	1132	<i>trans</i> -pinocarveol	2,46
14,401	1191	mirtenol	2,48
14,882	1203	verbenona	2,5
31,684	1621	M=218	4,16
32,924	1652	M=220	2,94
33,713	1672	mustacona	41,46
33,792	1673	M=218	2,56
34,194	1684	M=218	8,62
34,74	1697	aristolona	8,42
36,159	1732	7-isopropenil-1,4a-dimetil- 4,4a,5, 6,7,8-hexahidro— 3H-naftalen-2-ona	8,43
55,942	2225	Ni	15,93

A composição química do concentrado de substâncias remanescentes extraídas por partição líquido-líquido e por *headspace* do hidrolato demonstram uma discrepância entre os compostos majoritários encontrados. Isso ocorre porque no *SPME* apenas as substâncias muito

voláteis (aquelas que dão a característica olfativa), são volatilizadas e se fixam na resina. No SPME observa-se grande relevância da substância mustacona (41,46%). Esse resultado é muito significativo, pois demonstra que a mustacona é a maior responsável pelo agradável aroma do hidrolato de priprioica. Rukunga (2007) sugeriu utilizar a mustacona como marcador químico da espécie *C. articulatus*, devido a sua importante atividade antiplasmódica. Sugere-se que a mustacona seja considerada o marcador químico da fragrância do hidrolato de priprioica, podendo-se estabelecer um parâmetro da qualidade olfativa do mesmo.

Na Tabela 3 e no Quadro 1 pode-se observar que a composição dos OE é pobre em verbenona (~2,7%), diferentemente da composição do hidrolato que tem 23% desta mesma substância. No entanto, a verbenona, por ser um monoterpene, com estrutura química de baixo peso molecular e alguma polaridade conferida pelo grupo C=O terá mais afinidade pela água, solvente mais polar, que do óleo, mais apolar. As Tabelas 3 e 4 mostram que todos os sequeiterpenos presentes no hidrolato são oxigenados e que os monoterpeneos são hidroxilados, ou seja, apresentam a função álcool. Os álcoois são substancias que fazem facilmente ligações de hidrogênio com a água, isso explica a afinidade com a água e a presença dessas moléculas na fase aquosa. Observa-se que alguns monoterpeneos, que também enriquecem o hidrolato estão presentes em menor proporção no óleo essencial.

Portanto, o hidrolato de priprioica possui muitos compostos orgânicos remanescentes em sua composição, os quais podem ser prejudiciais quando descartados de maneira inadequada no ambiente aquático. Um estudo realizado por Pinheiro *et al.* (2015) avaliou a toxicidade aguda do hidrolato de priprioica em alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier) indicando no teste de concentração letal em 96 h (CL<sub>50-96h</sub>) um percentual de toxicidade de 12,1%. Se considerarmos as 10 toneladas de rizomas que aparentemente são extraídas na empresa Beraca, chega-se ao número de cerca de 30 toneladas de lixo industrial (resíduo líquido) jogados no ambiente, causando incalculável dano aos rios na região amazônica. Assim sendo, o processo de agregar valor ao hidrolato de priprioica evitando o seu descarte além de tornar o processo mais sustentável e valoroso para indústrias, evita danos ambientais.

O hidrolato de priprioica apresenta grande potencial para o uso em perfumaria e em cosmética, devido ao agradável odor proveniente de seus constituintes químicos e ao baixo custo do resíduo líquido, atualmente sem uso e sem valor agregado.

Para mostrar as possibilidades dos Produtos Amazônicos, e principalmente do uso de um resíduo industrial, um hidratante protótipo tendo por base o hidrolato de priprioica e com o aroma natural da planta, foi desenvolvido durante as aulas da disciplina Pesquisa e Desenvolvimento Sustentável de Produtos Naturais da Amazônia, ministradas pelo professor Dr. Lauro Barata.

O hidratante (Fig 13) foi produzido com base na seguinte formulação: 40 % de hidrolato de priprioica (essência), álcool cetílico, ácido esteárico, monoestearato de glicerila, polawax, óleo de silicone, miristrato de isopropila, vaselina líquida, óleo de amêndoas, nipazol, nipagim, trietanolamina, propilenoglicol, água deionizada, uma composição comum a muitos hidratantes comerciais, no entanto, o aroma é muito peculiar aos produtos com priprioica. O hidrolato consiste num produto sustentável e com grande potencialidade na indústria cosmética.



**Figura 13:** Desenvolvimento de um hidratante aromatizado com um produto sustentável da Amazônia: o hidrolato de priprioica

#### 4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO RESÍDUO SÓLIDO DE PRIPRIOCA

A extração via Soxhlet apresenta-se como um dos mais eficientes métodos de extração de material vegetal devido a constante renovação do solvente utilizado, já que a massa vegetal permanece dentro do extrator, diferentemente dos demais métodos que por vezes a eficiência da extração é comprometida devido a saturação do solvente (SANTOS, 2013).

O resíduo sólido de priprioica foi triturado para aumentar a superfície de contato com o solvente, aumentando a eficiência de extração. Devido ao material vegetal haver passado pelo

processo de extração de óleo essencial, os compostos apolares encontram-se em quantidade reduzida, compostos como mono, di e sesquiterpenos são extraídos com o óleo essencial, no entanto, como as extrações não apresentam 100 % de eficiência, os compostos que estão na planta em grande quantidade ainda estarão presentes nos rizomas após o processo de extração, ou seja, deve-se encontrar na massa vegetal ainda algum óleo essencial residual. Principalmente, se a extração por arraste à vapor não tiver sido eficiente. Raízes, tubérculos e madeiras costumam ser extraídas por longo tempo no sistema de arraste à vapor, até 6 h seguidas, não é incomum usar-se vapor sob pressão para aumentar a eficiência quando se usam estes materiais. Como no nosso caso, o sistema é aberto (tanto o Clevenger quanto a dorna piloto) espera-se que a retirada do óleo essencial da massa vegetal não seja mesmo completa. Mesmo no sistema industrial, usado pela Beraca, com dornas de 2000 L o processo foi equivalente, sem pressão, mesmo que tenha levado 6 h.

Os solventes utilizados para as extrações sucessivas apresentam polaridades diferentes. O hexano ( $C_6H_{12}$ ) composto apenas por carbono e hidrogênio é um solvente apolar, portanto terá afinidade com substâncias apolares, extraíndo-as. O diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ) e o acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ) apresentam polaridades próximas, sendo o acetato de etila o mais polar, os átomos de cloro conferem polaridade intermediária ao cloreto de metileno e os dois oxigênios presentes no acetato de etila elevam a polaridade deste. Já o etanol ( $C_2H_6O$ ) possui características polares conferida pela hidroxila, extraíndo portanto, substâncias bem mais polares. Baseado no princípio que apolar extrai apolar e polar extrai polar, pode-se esperar substâncias apolares no hexano e substâncias muito polares no extrato etanólico. Adicionalmente, o etanol por ter uma “cabeça” polar num “corpo” apolar, tem a capacidade de extrair, tanto substâncias polares como apolares, daí o fato de ser deixado por último no processo. Observa-se que o rendimento das extrações aumentou conforme a polaridade do solvente utilizado.

Os rendimentos dos extratos obtidos a partir da extração à quente via Soxhlet estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5:** Médias das massas obtidas e do rendimento para cada solvente ao extrair o resíduo sólido de priprioica em equipamento tipo Soxhlet

<b>Massa PRIr-RES</b>	<b>Solvente</b>	<b>Massa extrato</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Código</b>
<b>40 g</b>	Hexano	0,810 g	1,85%	PRIr-S-HEX
<b>40 g</b>	Diclorometano	0,980 g	2,24%	PRIr-S-DIC
<b>40 g</b>	Acetato de Etila	1,05 g	2,40%	PRIr-S-ACOET
<b>40 g</b>	Etanol	3,02 g	6,91%	PRIr-S-ET

A análise dos dados mostra o aumento nos rendimentos das extrações diretamente proporcional ao aumento da polaridade dos solventes utilizados, isso indica a presença majoritária de substâncias de média e alta polaridade no PRI-RES. De acordo com Ngo Bum *et al.* (1991) os rizomas íntegros de priprioica contêm substâncias das classes dos terpenos, taninos, flavonoides, saponinas e açúcares. Devido estas substâncias, taninos, flavonoides, saponinas e açúcares, não serem extraídas pelo processo de arraste à vapor, espera-se que estejam concentradas no resíduo sólido, com excessão de açúcares que necessitariam um solvente ou mistura de solventes bem mais polar.

Devido ao material vegetal utilizado ser os resíduos sólidos dos rizomas de priprioica, a grande maioria dos compostos apolares deve ter sido extraída pelo processo de extração do óleo essencial, restando poucos voláteis apolares. Já as substâncias como diterpenos, flavonoides, saponinas e esteroides que não são extraídos com o óleo essencial, deverão estar presentes nos resíduos sólidos da priprioica, objeto desse estudo.

A extração com solventes orgânicos com diferentes graus de polaridade agrupa as substâncias com polaridades similares, facilitando a caracterização fitoquímica do extrato e a avaliação de sua atividade biológica.

#### 4.4 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO E TESTES DE TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

A extração com solventes é um método simples, empregado na separação e isolamento de substâncias componentes de uma mistura. A técnica de extração envolve a separação de um composto, presente na forma de uma solução (ou suspensão) em um determinado solvente, através da agitação com um segundo solvente, no qual o composto orgânico seja mais solúvel e que seja

pouco miscível com o solvente que inicialmente contém a substância (BARATA, CASTRO e TAUBE JR., 2014).

A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente da extração, da razão das fases e do número de extrações.

**Fluxograma 1:** Partição líquido-líquido do extrato etanólico de pripricoa



A partição líquido-líquido resultou três frações com rendimentos diferentes. A extração com hexano resultou no rendimento de 4,85%, diclorometano 23,81% e acetato de etila 4,08%.

Algumas classes de compostos são mais prováveis de serem separadas de acordo com o a afinidade e poder de extração de cada solvente:

Extração com hexano: esteroides, ácidos graxos, terpenos, hidrocarbonetos e acetofenonas.

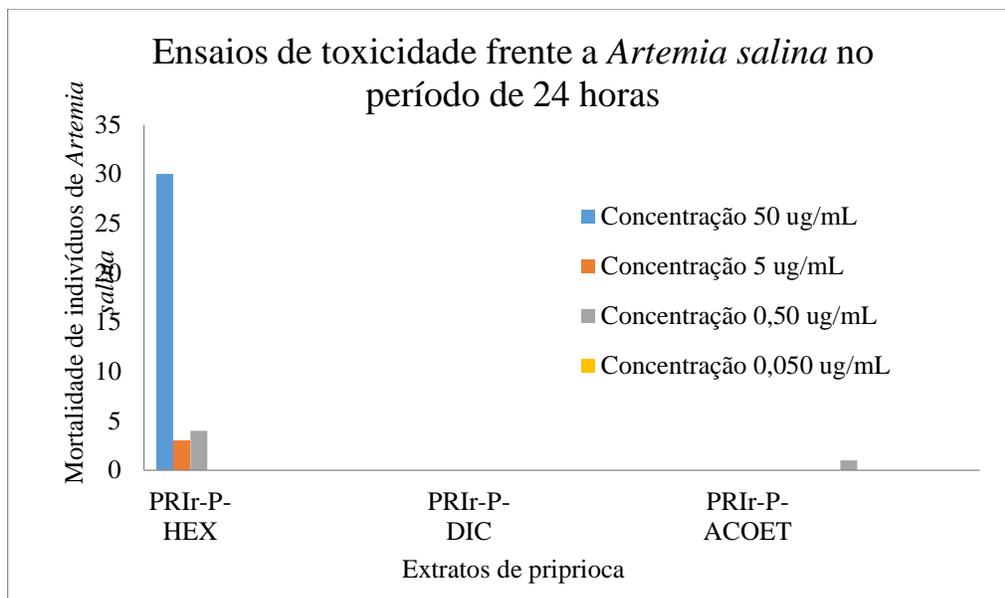
Extração com diclorometano: lignanas, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas.

Extração com acetato de etila: flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral.

(SIMÕES *et al.*, 2000).

O teste de toxicidade em *A. salina* foi realizado com as três frações obtidas da partição líquido-líquido PRIr-P-HEX, PRIr-P-DIC e PRIr-P-ACOET. O design experimental foi

inteiramente casualizado com três repetições em esquema fatorial 3X4. Os fatores observados foram as frações do extrato etanólico (primeiro fator) e as diferentes concentrações: 50, 5,0, 0,50 e 0,05 µg/mL (segundo fator). O controle positivo e o negativo foram etanol e solução salina respectivamente. O gráfico abaixo relaciona concentração da amostra, mortalidade e período (Gráf. 04):



**Gráfico 04:** Avaliação da toxicidade aguda das frações do extrato etanólico do PRI-RES frente a *A. salina*

O ensaio de toxicidade aguda das frações do extrato etanólico do PRI-RES frente a *A. salina* revelou a fração PIRr-P-HEX como mais tóxica, causando a mortalidade de 100% dos náuplios de *A. salina* na concentração mais elevada, indicando que as substâncias apolares presentes no PRI-RES são responsáveis pela toxicidade frente ao microcrustáceo.

O ensaio utilizando *A. salina* pode indicar correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos. Esse ensaio levou a descoberta do *Annonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos (MCLAUGHLIN *et al.*, 1998). Portanto, confirmada a atividade tóxica de extratos de PRI-RES, optou-se por avaliar também a atividade antiproliferativa de extratos de PRI-RES obtido por meio de extração via Soxhlet com solventes com diferentes graus de polaridade.

#### 4.5 ENSAIOS ANTIPROLIFERATIVOS COM EXTRATOS DO RESÍDUO SÓLIDO DE PRIPRIOCA

Em estudos anteriores realizados pela pós-doutoranda Inês Ribeiro, do Laboratório P&DBio, testou-se o óleo essencial e o extrato etanólico do resíduo sólido da priprioica. Foram testadas as linhagens tumorais humanas U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão) nas concentrações: 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A concentração efetiva TGI (*Total Growth Inhibition*) foi analisada por meio de regressão linear simples. De acordo com os valores de TGI o óleo essencial extraído por arraste a vapor dos rizomas de priprioica cultivada em Santarém-PA apresentou atividade citotóxica na concentração de 250 µg/mL, para as três linhagens celulares. Esse valor de TGI é considerado elevado. Já para o extrato etanólico do resíduo, os valores de TGI foram considerados citotóxicos nas concentrações acima de 100 µg/mL para as três linhagens celulares.

Devido aos resultados positivos do extrato etanólico do resíduo sólido de priprioica nos ensaios antiproliferativos optou-se pela continuidade dos estudos utilizando extratos do resíduo sólido de priprioica obtidos via Soxhlet por meio de extrações sucessivas com os seguintes solventes: **PRIr-S-HEX**, **PRIr-S-DIC**, **PRIr-S-ACOET**, **PRIr-S-ET**. Devido a diferença de polaridade dos solventes, cada extrato apresenta um perfil químico, que varia do mais apolar (**PRIr-S-HEX**) ao mais polar (**PRIr-S-ET**). Assim é possível avaliar qual grupo de substâncias possui atividade antiproliferativa, entretanto, há a possibilidade da atividade diminuir ao longo dos fracionamentos, pois muitas vezes os compostos presentes nos extratos vegetais atuarem conjuntamente.

De acordo com Costa (2012), o extrato de uma planta pode apresentar seletividade, ou seja, diferentes perfis de atividade inibitória dependendo da linhagem celular, portanto foram utilizadas neste estudo oito linhagens tumorais humanas de diferentes origens histológicas e genéticas: U251 (glioma - ectoderme), MCF7 (mama - ectoderme), 786-0 (rim - mesoderme), NCI-460 (pulmão - endoderme), PC-3 (próstata - mesoderme), OVCAR-03 (ovário - mesoderme), HT-29 (côlon - endoderme), K562 (leucemia - mesênquima). Além disso, a atividade antiproliferativa foi avaliada em células com fenótipos não-tumorais (HaCat/queratinócito humano).

A técnica utilizada para determinação do crescimento celular foi a espectrofotometria por meio do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Fig 14). O corante sulforrodamina B (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>) apresenta a coloração fortemente rosada e brilhante, possui dois grupos sulfônicos

e é solúvel em água. Em condições ácidas a sulforrodamina liga-se aos aminoácidos da proteína básica, em células viáveis fixadas previamente com ácido tricloroacético (TCA). O corante SRB é utilizado como indicador quantitativo de conteúdo proteico, sendo este conteúdo proporcionalmente linear à densidade das células. Portanto, a quantidade de corante presente na cultura celular indica o grau de citotoxicidade causado pelo composto em estudo. Assim sendo, poços fortemente coloridos de rosa indicam baixa citotoxicidade do composto, já poços sem a presença do corante indicam compostos altamente citotóxicos (SKEHAN *et al.*, 1990; MONKS *et al.*, 1991).

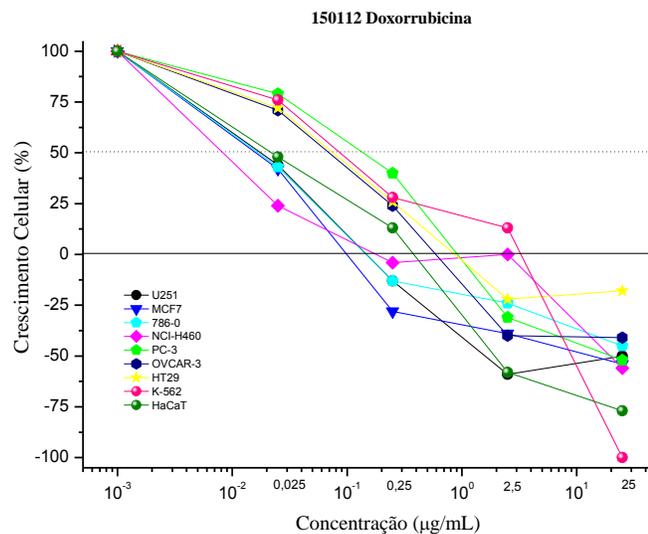


**Figura 14:** Placas de 96 poços coradas com SRB.

A porcentagem de crescimento celular e a concentração das amostras testadas encontram-se relacionadas nos gráficos abaixo. Os valores entre 0 e 100% representam a inibição de crescimento, ou seja, efeito citostático, no qual a linha 0 é o marco para inibição total do crescimento, quando a quantidade de células ao final do experimento é a mesma que a quantidade inicial (placa  $T_0$ ). Por outro lado, os valores negativos significam morte celular, logo o número de células ao final do experimento é menor do que a quantidade do momento da adição (placa  $T_0$ ) (Monks *et al.*, 1991). A tabela 6 indica os valores de TGI (Total Growth Inhibition), ou seja, a concentração de amostra necessária para inibir totalmente o crescimento celular em 48 h de tratamento.

A técnica da triagem *in vitro* permite uma avaliação da atividade antiproliferativa com especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade, portanto tal triagem seleciona os compostos mais promissores para estudos mais aprofundados em modelos experimentais de câncer utilizando animais (Monks *et al.*, 1991).

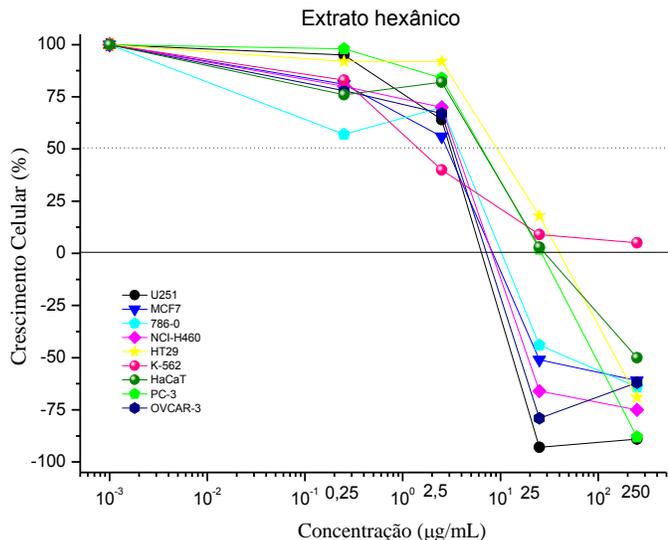
O quimioterápico doxorrubicina foi utilizada como controle positivo neste teste.



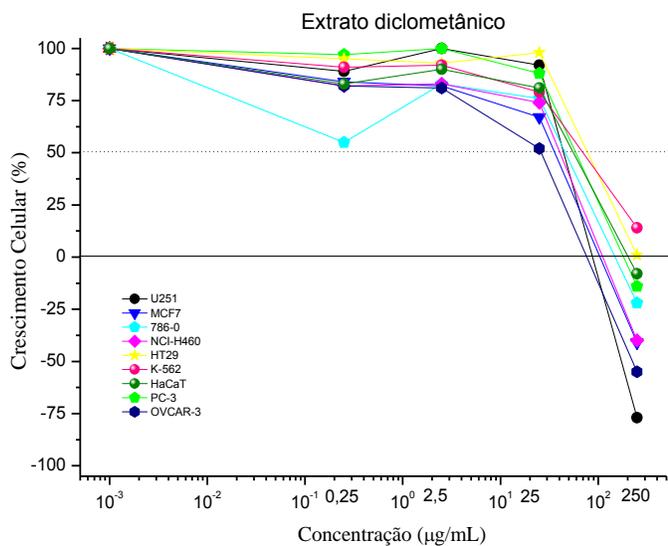
**Gráfico 5:** Atividade antiproliferativa da doxorrubicina em painel de 08 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

Em seguida foram avaliados os extratos de PRI-RES obtidos em extração via Soxhlet **PRIr-S-HEX**, **PRIr-S-DIC**, **PRIr-S-ACOET**, **PRIr-S-ET**:

PRIr-S-HEX (Gráfico 6) inibiu o crescimento de todas as células analisadas em função das concentrações empregadas e induziu a morte celular de todas as linhagens, com exceção a K-562 (leucemia). Este extrato apresentou os menores valores de TGI dos extratos testados, sendo as linhagens mais sensíveis U251 (glioma), MCF7 (mama) e NCI-H460 (pulmão) com valores de TGI abaixo de 10µg/mL.



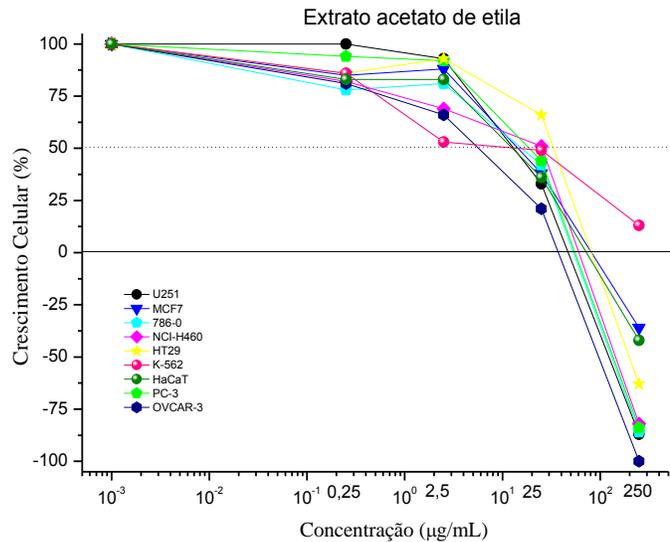
**Gráfico 6:** Atividade antiproliferativa **PRIr-S-HEX** em painel de 08 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).



**Gráfico 7:** Atividade antiproliferativa do **PRIr-S-DIC** em painel de 08 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

PRIr-S-DIC (Gráfico 7), da mesma forma que o PIRr-S-HEX, inibiu o crescimento de todas as linhagens celulares, com exceção da linhagem K-562 (leucemia). A linhagem HT29 (côlon) apresentou inibição do crescimento, porém os resultados sugerem que não houve indução

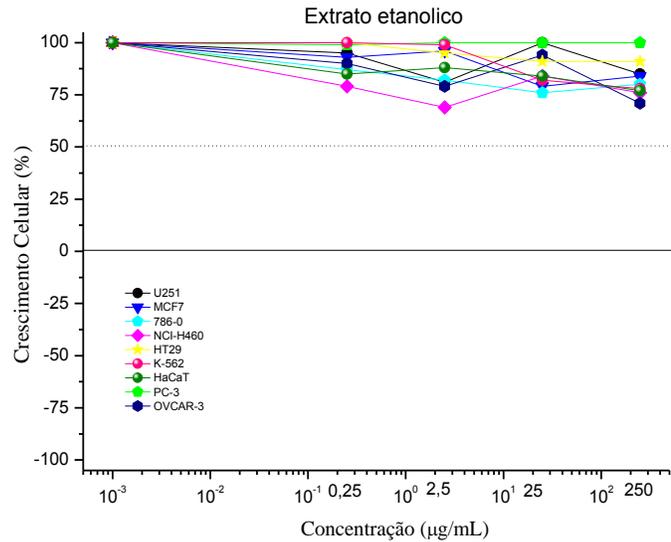
a morte celular, permanecendo o número de células igual a  $T_0$ . Portanto, o TGI de K-562 e HT29 foram  $>250 \mu\text{g/mL}$ . As demais linhagens foram induzidas a morte celular entretanto os valores de TGI foram mais elevados que os apresentados pelo extrato hexânico, com valores acima de  $70 \mu\text{g/mL}$ . As linhagens mais sensíveis ao extrato diclorometânico foram U251 (glioma) e OVCAR-3 (ovário).



**Gráfico 8:** Atividade antiproliferativa do **PRIr-S-ACOET** em painel de 08 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e  $250 \mu\text{g/mL}$ ).

Assim como o PRIr-S-HEX e o PRIr-S-DIC, o PRIr-S-ACOET (Gráfico 8) inibiu o crescimento de todas as linhagens celulares, com exceção da linhagem K-562 (leucemia). As demais linhagens foram induzidas a morte celular e os valores de TGI foram superiores PRIr-S-HEX, mas consideravelmente inferiores ao PRIr-S-DIC, sendo a linhagem celular mais sensível OVCAR-3 (ovário).

A amostra PRIr-S-ET (Gráfico 9) não apresentou atividade antiproliferativa. Esse extrato não inibiu 50% do crescimento celular, portanto é considerado inativo para todas as linhagens testadas, mesmo em concentrações mais elevadas.



**Gráfico 9:** Atividade antiproliferativa do **PRIr-S-ET** em painel de 08 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

Os valores de TGI foram calculados por meio de regressão não linear com o auxílio do programa Origin® e encontram-se relacionados na Tabela 6:

**Tabela 6:** Valores de **TGI** (µg/mL) para as 08 linhagens tumorais humanas e para a linhagem tumoral não-humana em testes com os extratos do resíduo sólido de pripioca

	<b>2</b>	<b>M</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>P</b>	<b>O</b>	<b>H</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>
<b>Doxorubicina</b>	0,18	0,15	0,32	0,32	1,17	0,85	2,1	1,2	0,28
<b>PRIr-S-HEX</b>	5,1	9,3	11,1	8,3	25,3	6,8	38,6	>250	35,7
<b>PRIr-S-DIC</b>	95,3	108,6	135,8	119,8	201,6	73,2	>250	>250	215,1
<b>PRIr-S-ACOET</b>	40,1	82,2	45,7	53,1	47,6	29,8	81,1	>250	70,8
<b>PRIr-S-ET</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); P= PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT29 (cólon); k = K562 (leucemia).

Linhagem não tumoral humana: q = HaCat (queratinócitos imortalizados).

PRIr-S-HEX apresentou valores promissores de TGI, especialmente para as linhagens tumorais U251 (glioma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H40 (pulmão), OVCAR-3 (ovário). O valor mais significativo foi obtido para a linhagem glioma com TGI de 5,1 µg/mL; os valores de TGI variaram de 5,1-38,6 µg/mL. Para fins comparativos, Riva *et al.* (2012) também demonstraram

que o extrato hexânico de *Sinningia allagophylla* foi o mais ativo em testes antiproliferativos, com valores de TGI variando entre 15,5-32,7 µg/mL.

PRIr-S-ET (de maior polaridade) apresentou-se inativo (TGI>250µg/L) para todas as linhagens celulares testadas, o que sugere que as substâncias mais polares presentes no resíduo sólido de priprioica não apresentam atividade antiproliferativa.

PRIr-S-DIC e PIRIr-S-ACOET apresentaram polaridade semelhantes e ambos apresentaram valores intermediários de TGI, sendo que PIRIr-S-ACOET (mais polar que o extrato diclorometânico) se mostrou mais eficiente que o PIRIr-S-DIC. Esse resultado encontra-se em conformidade com o ensaio de toxicidade realizado em *A. salina*, no qual PIRIr-P-HEX foi a fração mais tóxica, seguida por PIRIr-P-ACOET e, por fim, PIRIr-P-DIC.

Nenhum extrato obtido do resíduo sólido dos rizomas de priprioica foi efetivo contra células tumorais do tipo K-562 (leucemia) apresentando valores de TGI acima de 250µg/L.

Porém a atividade citocida seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Nesse último modelo, as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são obtidas, enquanto em testes *in vitro* esses dados não podem ser obtidos. Portanto, o estudo necessita de continuidade para avaliar os efeitos citocidas *in vivo* (SMITH, 2005).

As análises ocorrem com parâmetros de TGI, não de LC50 ou GC50, pois nem todas as linhagens tumorais foram inibidas, no caso, a linhagem K-562 não foi inibida por nenhuma fração.

A amostra PIRIr-S-HEX apresentou maior atividade antiproliferativa no ensaio *in vitro*, ou seja, menores valores de TGI (5,1-38,6 µg/mL), sendo, portanto, a escolhida para caracterização fitoquímica por CG-EM, fracionamento em cromatografia em coluna *flash*, novos testes antiproliferativos e testes antimicrobianos.

#### 4.6 ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO PRIR-S-HEX

O hexano (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>) é um hidrocarboneto de cadeia aberta e devido a sua apolaridade é característico por extrair ácidos graxos, esteroides, terpenos, hidrocarbonetos e acetofenonas.

Foi necessária a extração de uma nova cota do mesmo material vegetal (PRI-RES) com hexano para a obtenção de mais quantidade de extrato hexânico, a extração ocorreu com a mesma metodologia, gerando-se o extrato PIRIr-S-HEX2.

O extrato PRIr-S-HEX2 foi analisado por CG-EM com o intuito de averiguar a similaridade das substâncias terpênicas remanescentes no resíduo sólido comparando-as com as do óleo essencial dos rizomas. A técnica de CG-EM é aplicada facilmente para análise de óleos essenciais, ou substâncias voláteis, mas não é a mais adequada para extratos. Apesar disso, o extrato hexânico mostrou por CG-EM sesquiterpenos, os quais também estão presentes no óleo essencial de priproica, além de esteroides e ácidos graxos. Portanto a técnica possibilitou uma caracterização parcial de tal extrato (Tabela 7), sendo que para as substâncias não identificadas foi possível apenas a determinação de sua massa molecular. Para tal caracterização utilizou-se a biblioteca NIST e a bibliografia disponível (ADAMS, 2007).

**Tabela 7:** Análise por CG-EM do PRIr-HEX2

<b>Tempo de retenção</b>	<b>Analito</b>	<b>Porcentagem relativa</b>
11.936	$\alpha$ -copaeno	0.230%
14.596	$\beta$ -guaiano	0.388%
15.893	$\alpha$ -calacoreno	0,246%
18.502	M=212	0.321%
18.648	M=218	0.498%
18.953	mustacona	3.652%
19.348	M=218	1.014%
19.507	M=236	0.310%
19.602	aristolona	1.384%
19.838	M=220	0.367%
20.022	M=236	0.849%
20.239	M=238	1.239%
20.506	7-isopropenil-1,4-	3.041%
20.659	M=236	0.530%
20.951	M=234	1.300%
21.091	M=218	2.734%
21.352	M=236	0.814%
21.581	M=232	1.528%
21.670	M=234	3.150%
21.886	M=216	2.424%
22.039	M=223	0.765%
22.109	M=234	0.561%
22.211	M=236	1.108%
22.573	M=236	2.401%
22.669	M=236	3.594%
23.070	corimbolona	2.855%
<b>continua</b>		

23.178	M=218	1.150%
23.337	M=234	3.092%
23.649	M=220	4.445%
24.107	M=218	0.284%
24.374	M=216	0.394%
25.220	ácido palmítico	0.396%
26.645	M=239	0.470%
26.849	M=220	0.219%
28.299	M=263	0.233%
28.401	éster etílico do ácido oleico	0.526%
28.821	M=334	0.507%
32.301	M=281	0.928%
34.928	M=368	0.455%
37.499	M=429	0.470%
37.658	M=429	0.328%
38.676	M=423	0.208%
39.375	M=429	0.308%
39.700	M=429	0.380%
40.260	M=405	0.920%
40.552	dodecil palmitato	1.628%
40.851	M=429	0.574%
41.386	M=439	0.571%
41.640	M=429	0.390%
43.364	vitamina E	1.096%
43.453	M=430	1.506%
43.854	éster tetradecil do ácido palmítico	0.851%
45.241	campestanol	1.418%
45.960	estigmasterol	1.354%
47.080	M=424	0.938%
47.353	M=429	1.966%
48.040	M=405	0.452%
48.454	M=424	2.519%
48.702	M=480	1.050%
48.867	M=424	0.684%
49.033	M=429	1.616%
49.357	espinasterona	2.297%
50.674	M=438	7.731%
51.170	M=422	8.388%
53.582	M=414	2.344%
54.759	M=424	2.344%
57.271	M=428	4.162%

A análise de CG-EM, que define as substâncias voláteis presentes na amostra, indica um extrato muito complexo. As substâncias identificadas em comparação com a biblioteca digital NIST e com a bibliografia Adams (2007) são da classe dos sesquiterpenos hidrogenados e oxigenados, os quais também se encontram presentes no óleo essencial, indicando que o método de extração de óleo essencial não apresenta 100% de eficiência, restando muitos sesquiterpenos no PRI-RES. A eficiência do método extrativo depende de muitos fatores, tais como a granulometria do material, o tempo de extração e a pressão na dorna. Sesquiterpenos oxigenados e diterpenos não são extraídos facilmente sem as boas condições do processo.

Além de sesquiterpenos, foram identificados esteroides: espinasterona, estigmasterol e campestanol, e a estrutura da vitamina E, um tocoferol.

Observando o perfil do extrato hexânico, percebe-se que o mesmo é composto por muitas substâncias mas, em porcentagens relativas baixas, são poucas as substâncias consideradas majoritárias. Essa abundância de compostos dificulta a purificação e o isolamento de substâncias biológicas ativas, adicionalmente, a atividade biológica pode estar relacionada ao sinergismo, quando todas os compostos atuam concomitantemente.

A mustacona, como sugere Rukunga (2008), deve ser utilizada como marcador quimiotaxonômico da espécie *C. articulatus* var. *nodosus*, pois é a considerada o princípio ativo do óleo essencial da priprioica, sendo responsável total ou parcialmente pelos efeitos terapêuticos e pelo aroma da planta. A mustacona, sendo um sesquiterpeno oxigenado, poderia-se supor que seria extraída pelo processo de extração de óleo essencial, no entanto, este estudo confirmou a presença de mustacona tanto no resíduo sólido quanto no hidrolato de priprioica.

O extrato hexânico dos rizomas íntegros de *C. articulatus* foi alvo de pesquisas em Camarões para o tratamento de oncocercose humana. A oncocercose (também conhecida como cegueira dos rios) é uma doença parasitária crônica decorrente da infecção produzida pelo nematódeo *Onchocerca volvulus*. Ocorre após a picada de um mosquito preto, encontrado nas proximidades de rios com forte correnteza. Após o verme parasitário se estabelecer, produz milhares de larvas que infectam a pele e os olhos, e quando estes morrem liberam toxinas que causam forte irritação e lesões nos olhos, que, geralmente, levam a cegueiras irreversíveis (METUGE et al, 2014).

Estudos anteriores realizados por Metuge *et al.* (2014) mostraram que o extrato hexânico dos rizomas íntegros de *C. articulatus* foi ativo contra vermes adultos do parasita bovino

*Onchocerca ochengi*, parente próximo do *O. volvulus*. Estudos foram direcionados ao isolamento de mustacona e ácido linoleico presentes no extrato hexânico de pripioca. Concluiu-se que os compostos foram capazes de matar o *O. ochengi* tanto quanto *O. volvulus* dependendo da dose. Sendo assim concluem que esses dois metabólitos podem auxiliar no desenvolvimento de fármacos para tais doenças (METUGE *et al.*, 2014).

O PRI-RES embora tenha passado pelo processo de extração de óleo essencial, ainda conserva grande parte dos sesquiterpenos que estão presentes no óleo essencial, inclusive o marcador químico da espécie: mustacona. Já os ácidos graxos, como o ácido linoleico, não são extraídos no processo de arraste à vapor ou hidrodestilação, assim não estão presentes no óleo essencial mas estão presentes no resíduo sólido. Concluímos que o resíduo sólido também apresenta grande potencial para o desenvolvimento de fármacos ativos para oncocercose. Pesquisas posteriores serão realizadas a fim de verificar a eficácia da utilização do resíduo no tratamento desta enfermidade.

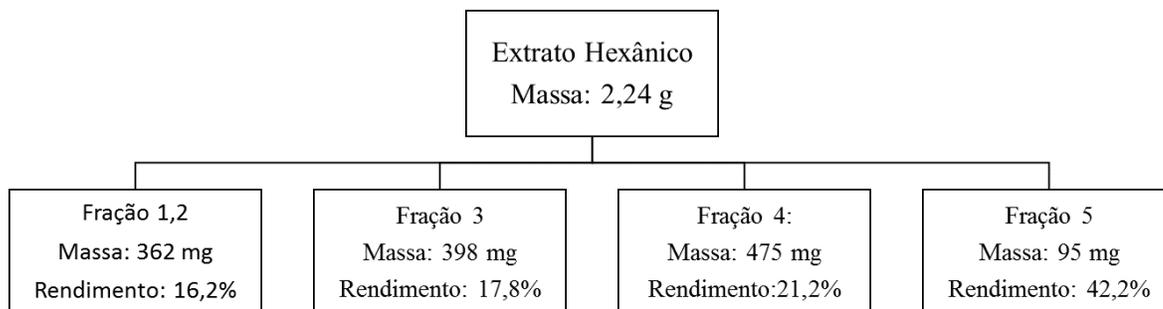
Em Gana na África, a decocção dos rizomas de *C. articulatus* é utilizada com sucesso no tratamento de tuberculose (NGUTA, 2015). Devido ao resultado positivo na inibição do crescimento de células tumorais e no ensaio de citotoxicidade com *Artemia salina*, o extrato **PRIr-S-HEX2** foi selecionado para fracionamento em cromatografia de coluna *flash*.

O fracionamento do PIRIr-S-HEX2 levou a obtenção de 5 frações que foram submetidas a análise em cromatografia de camada delgada (CCD). Após a análise das frações em CCD, optou-se pela reunião das frações 1 e 2, o que totalizou quatro frações. O Fluxograma 2 apresenta o rendimento das frações obtidas após o fracionamento.

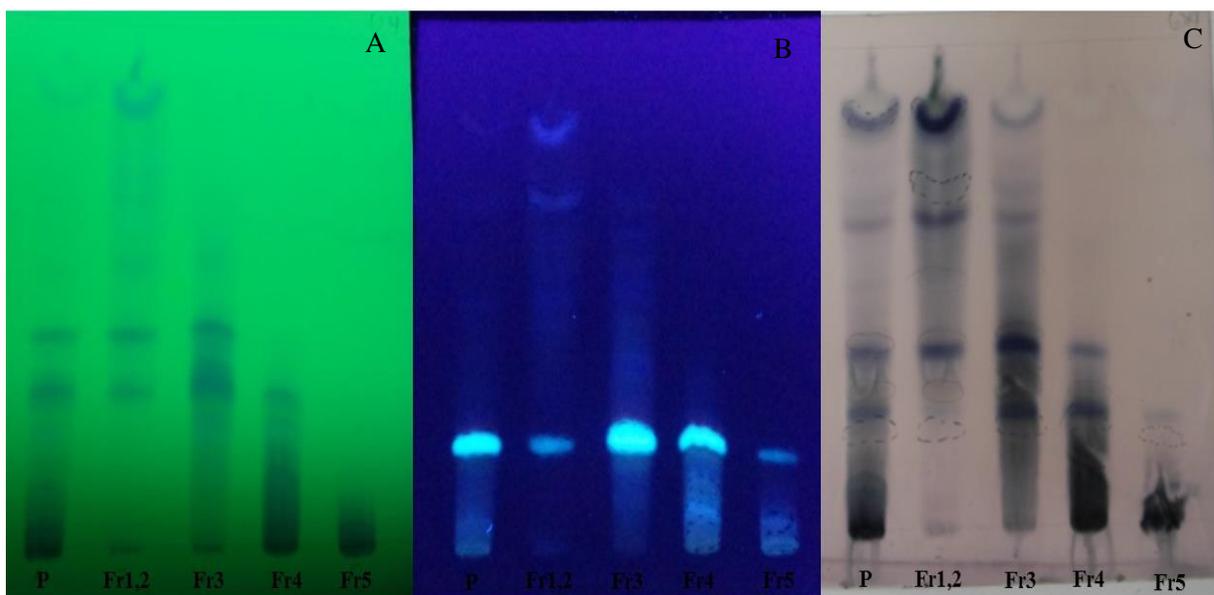
O rendimento das frações aumentou de acordo com o aumento da polaridade da fase móvel. A coluna cromatográfica apresentou uma eficiência de 97,4%. As frações receberam os códigos: PIRIr-S-HEX-Fr1,2; PIRIr-S-HEX-Fr3; PIRIr-S-HEX-Fr4 e PIRIr-S-HEX-Fr5.

As fases móveis utilizadas foram: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 99:1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 98:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 97:3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 95:5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 90:10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 80:20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 70:30, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 50:50, MeOH 100%.

**Fluxograma 2:** Fracionamento do extrato hexânico do resíduo sólido de *priproica* em coluna cromatográfica *flash*



O rendimento das frações aumentou de acordo com o aumento da polaridade da fase móvel. A coluna cromatográfica apresentou uma eficiência de 97%. CCDs (Fig 15) foram eluídas com Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 30%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 2%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 10%. O eluente escolhido para compor a fase móvel foi o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% pois apresentou a melhor resolução da placa e as substâncias presentes no extrato hexânico e em suas frações apresentarem características apolares.



**Figura 15:** CCD do extrato hexânico e suas frações: A: visível (UV-254 nm), B: ultravioleta (366 nm) e C: após a revelação com anisaldeído utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvel.

Análises por CG-EM e comparação com a biblioteca NIST e a bibliografia Adams foram realizadas para identificar os componentes majoritários presentes nas frações.

A fração Fr1,2 (Tab 8) contém muitos dos sesquiterpenos encontrados no óleo essencial. Infelizmente a técnica CG-EM não é a mais indicada para extratos vegetais sendo possível uma identificação apenas parcial dos compostos voláteis presentes. Observou-se a presença de ácidos graxos e esteroides, os quais não são extraídos com as técnicas de extração de óleo essencial como arraste a vapor e hidrodestilação, assim como a Vitamina E.

Na fração Fr3 (Tab 9), os compostos voláteis caracterizados via CG-EM apresentam-se em número reduzido quando comparado a Fração Fr1,2. A maioria dos sesquiterpenos presentes no óleo essencial foram extraídos na primeira fração, com a fase móvel de menor polaridade. A porcentagem relativa da mustacona destaca-se nesta fração. Observou-se a presença de um componente majoritário com porcentagem relativa em destaque (27,962%) e massa molecular elevada (422 g/mol), entretanto, com as ferramentas disponibilizadas não foi possível sua identificação.

Da mesma forma a Fração Fr3, a Fração Fr4 (Tab 10) apresentou um número menor de compostos voláteis em comparação a Fr1,2. Com as ferramentas disponibilizadas, apenas 04 compostos foram identificados. Destaque para mustacona e a corimbolona, ambas características no óleo essencial da espécie.

Não foi possível a identificação de nenhuma substância presente na Fração Fr5, que contém substâncias muito pouco voláteis, e que portanto a técnica de CG-EM não se apresenta como o método mais adequado para este extrato. Entretanto, é possível afirmar que esses compostos são os mais polares encontrados no extrato hexânico do resíduo sólido de *prurioca*, já que a fase móvel utilizada para a extração foi MeOH 100%.

**Tabela 8:** Análise química por CG-EM da PRIr-S-HEX-Fr1,2

T <sub>R</sub> (Tempo de retenção)	FRAÇÃO Fr1,2		% relativa
		Analito	
11,930		$\alpha$ -copaeno	0,761%
12,541		Cypereno	0,507%
14,596		$\delta$ -selineno	1,574%
15,015		$\beta$ -guaiano	0,613%
15,416		trans-calameneno	1,000%
15,893		$\alpha$ -calacoreno	0,904%
16,924		vinil éster do ácido láurico vinilester	0,544%
18,495		M=212	0,797%
18,648		2(1H) naphthalenona- 3,5,6,7,8,8a-hexahidro-4,8a- dimetil-6-(1-metiletetil)	1,235%
18,903		Cadaleno	1,806%
18,960		Mustacona	2,127%
19,501		M=218	0,839%
19,602		aristolona	1,099%
20,245		M=234	1,914%
20,512		M=234	3,675%
23,178		M=230	0,547%
25,233		Éster etílico do Ácido palmítico	4,695%
28,306		Éster etílico do Ácido linoleico	2,565%
28,420		Etil oleato	5,248%
32,225		Ester etílico do Ácido eicosanoico	0,194%
34,636		M=390	1,317%
34,942		M=368	2,224%
34,404		M=400	0,557%
37,499		M=366	1,408%
37,829		M=366	2,492%
38,224		M=396	2,015%
38,676		M=462	0,917%
39,375		M=419	0,915%
40,266		M=394	1,844%
40,559		Dodecil palmitato	2,943%
40,972		M=424	0,813%
43,377		Vitamina E	2,326%
43,460		M=430	2,575%

**continua**

43,861	Éster tetradecil do Ácido palmítico	1,960%
48,740	M=480	3,184%
48,893	M=424	3,481%
50,827	M=438	24,235%
51,234	M=440	8,662%

**Tabela 9:** Análise química por CG-EM da PRIr-S-HEX-Fr3

<b>FRAÇÃO Fr3</b>		
<b>tr (Tempo de retenção)</b>	<b>Analito</b>	<b>% relativa</b>
18,966	mustacona	8,643%
19,354	M=218	3,637%
20,512	7-isopropenil-1,4a- dimetil-4,4a,5, 6,7,8- hexahidro—3H-naftalen-2-ona	5,133%
20,958	M=234	2,402%
21,091	M=234	1,494%
23,706	M=218	1,768%
40,851	M=429	1,028%
45,979	M=429	2,678%
47,385	$\beta$ -estigmasterol	5,051%
48,505	M=430	6,261%
49,065	Ergosta-4,6,8(14)(22)- tetraen-3-one	3,574%
49,396	M=426	6,215%
50,700	M=438	7,142%
51,291	M=422	27,962%
57,329	M=428	8,158%

**Tabela 10:** Análise química por CG-EM da PRIr-S-HEX-Fr4

<b>t<sub>R</sub> (Tempo de retenção)</b>	<b>FRAÇÃO Fr4</b>	
	<b>Analito</b>	<b>% relativa</b>
18,954	mustacona	1,810%
20,023	M=236	3,476%
20,182	M=236	4,079%
21,104	M=234	9,519%
21,588	M=232	7,460%
21,677	M=234	4,768%
21,893	M=234	5,953%
22,217	M=236	3,440%
22,580	M=236	4,849%
22,676	M=236	7,307%
23,064	M=236	1,756%
23,344	Corimbolona	5,524%
23,662	M=236	11,024%
24,381	$\beta$ -rotunol	1,953%
32,301	M=281	2,357%
45,967	M=429	3,809%
47,366	Estigmasterol	4,622%
51,158	M=425	8,954%
57,278	M=428	7,338%

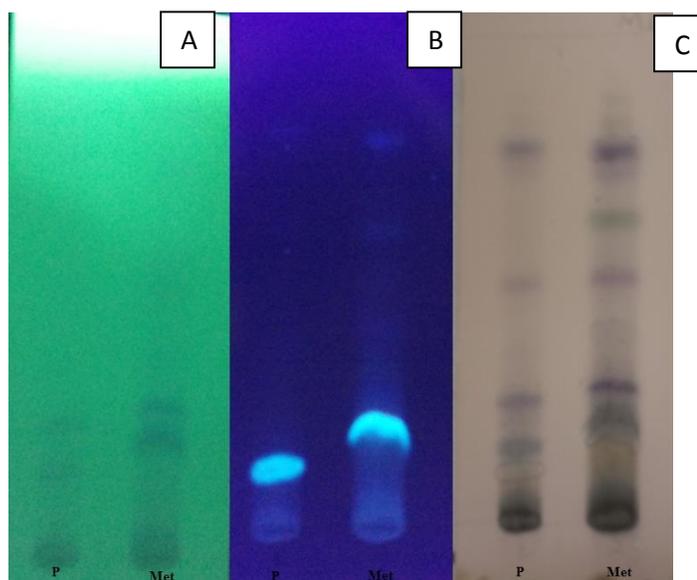
Observa-se que algumas substâncias identificadas nas frações do PRIr-S-HEX2 não foram identificadas no próprio extrato PRIr-S-HEX2. Isso ocorre devido a mistura extremamente complexa que forma o extrato hexânico. Nos cromatogramas de CG-EM geralmente cada pico corresponde a uma substância, mas em alguns casos, dois ou mais picos estão sobrepostos devido a similaridade no tempo de retenção (Tr) das substâncias. Além disso, alguns picos possuem uma porcentagem relativa tão baixa no extrato que são desconsiderados durante a integração do cromatograma. Após o fracionamento, ocorre a purificação da mistura e as substâncias encontram-se mais concentradas em determinados extratos, logo são integradas no cromatograma, podendo ser identificadas.

#### 4.6.1 Derivatização do PRIr-S-HEX2 e análise CG-EM

Na derivatização do extrato hexânico substituiu-se o diazometano por trimetildiazometano (TMSD), devido a toxicidade do reagente diazometano, embora forneça a reação mais rápida. O reagente diazometano possui a capacidade de formar o íon diazônio na presença de prótons relativamente ácidos. O íon diazônio metila hidroxilas alcoólicas, funções amino, tióis e carboxílas de estruturas biológicas (LEGGIO *apud* BOAVENTURA JR., 2015).

O diazometano, além de ser tóxico, é fotossensível, inflamável, termicamente instável e explosivo. O processo de preparo é através do reagente N-metil-N-nitroso uréia, no entanto este composto é altamente cancerígeno, o que dificulta sua manipulação. Na reação de esterificação dos ácidos graxos do extrato hexânico utilizou-se diazometano gerado *in situ* a partir de trimetilsilil-diazometano, um composto disponível comercialmente e seguro. O TMSD reage na presença de um nucleófilo prótico, como no caso o metanol, liberando o diazometano no meio reacional que é convertido em íon metil diazônio. O TMSD pode ser utilizado na medicina e na biologia, já que não oferece riscos para a saúde (LEGGIO *apud* BOAVENTURA JR., 2015).

A reação de esterificação dos ácidos graxos foi acompanhada em placas de CCD (Fig 16):



**Figura 16:** CCD do extrato hexânico e do extrato hexânico metilado: A: visível (UV-254 nm), B: ultravioleta (366 nm) e C: após a revelação com anisaldeído utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como fase móvel.

A tabela 11 mostra o perfil químico do extrato hexânico após a derivatização:

**Tabela 11:** Análise química por CG-EM do PIR-S-HEX derivatizado

<b>t<sub>R</sub> (Tempo de retenção)</b>	<b>Analito</b>	<b>% relativa</b>
<b>3,144</b>	M=159	1,899
<b>5,466</b>	M=218	0,499
<b>6,115</b>	M=230	1,048
<b>7,852</b>	M=258	26,495
<b>9,283</b>	M=227	0,855
<b>9,417</b>	M=258	0,587
<b>15,321</b>	Ácido láurico metil éster	0,905
<b>15,970</b>	M=285	0,763
<b>18,954</b>	Mustacona	2,682
<b>19,602</b>	2(1H) naphthalenona-3,5,6,7,8,8a- hexahidro-4,8a-dimetil-6-(1- metiletenil)	1,035
<b>19,812</b>	Metil tetradecanoate	0,842
<b>20,506</b>	2,2,7,7- tetramethyltricyclo [6.2.1.0(1,6)]-undec-4-en-3- one	2,411
<b>20,767</b>	M=357	2,424
<b>21,091</b>	M=234	1,345
<b>21,664</b>	M=234	1,687
<b>21,874</b>	M=234	1,406
<b>22,567</b>	M=221	1,019
<b>22,663</b>	M=236	1,859
<b>23,337</b>	M=218	1,357
<b>23,642</b>	M=264	2,869
<b>23,929</b>	Éster metílico do Ácido palmítico	8,266
<b>27,110</b>	Éster metílico do 10,13- ácido octadienoico	6,555
<b>27,230</b>	Ácido linoleico	14,579
<b>27,689</b>	Metil éster do Ácido octadecanoico	2,10
<b>34,343</b>	Éster metílico do ácido docosanoico	0,761
<b>37,314</b>	Éster metílico do Ácido tetracosanoico	1,810
<b>40,075</b>	Éster metílico do Ácido hexacosanoico	1,137
		<b>continua</b>

43,237	Éster metílico do Ácido 25-metil- heptacosanoico	1,057
50,668	M=438	4,078
51,151	M=422	4,787

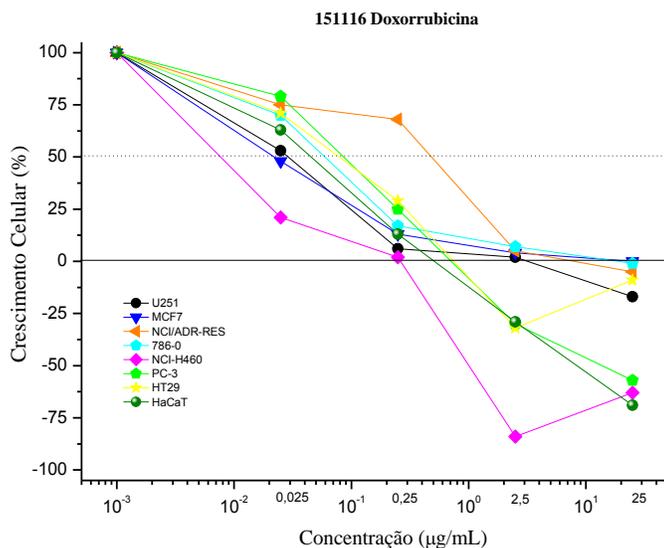
A identificação de muitos ácidos graxos metilados não identificados no PRIr-S-HEX2 comprovaram a eficácia do processo de derivatização.

#### 4.7 ENSAIOS ANTIPROLIFERATIVOS COM AS FRAÇÕES DO PRIr-S-HEX

Devido ao resultado positivo frente a testes antiproliferativos principalmente com PRIr-S-HEX, optou-se pelo fracionamento do extrato PRIr-S-HEX2 em cromatografia de coluna *flash* obtendo-se as seguintes frações: **PRIr-S-HEX-Fr1,2**; **PRIr-S-HEX-Fr3**; **PRIr-S-HEX-Fr4** e **PRIr-S-HEX-Fr5**.

Foram utilizadas neste estudo oito linhagens tumorais humanas de diferentes origens histológicas e genéticas: U251 (glioma - ectoderme), MCF7 (mama - ectoderme), NCI-ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos - mesoderme), 786-0 (rim - mesoderme), NCI-460 (pulmão - endoderme), PC-3 (próstata - mesoderme), HT-29 (cólon - endoderme). Além disso, a atividade antiproliferativa foi avaliada em células com fenótipos não-tumorais (HaCat/queratinócito humano).

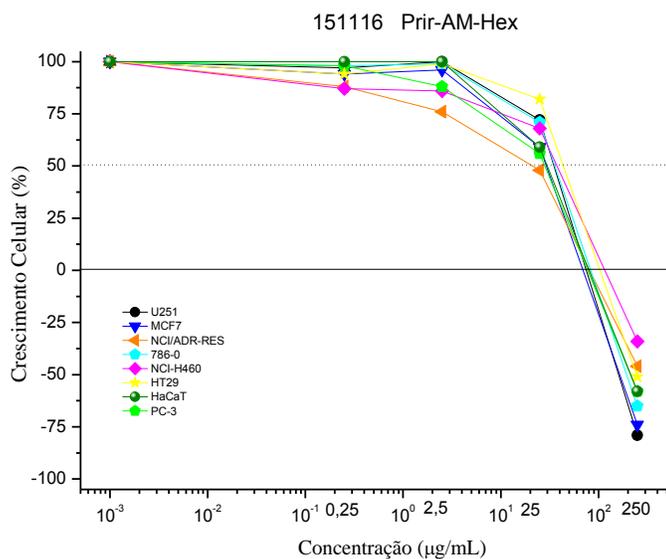
Novamente o quimioterápico doxorrubicina foi utilizado como controle positivo (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Atividade antiproliferativa do quimioterápico Doxorrubicina em painel de 07 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL)

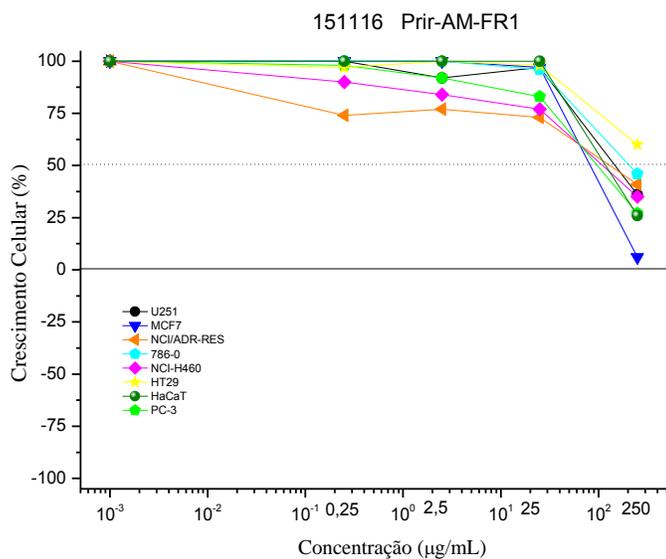
Os gráficos abaixo representam a atividade antiproliferativa oriunda das frações do PRIr-S-HEX.

PRIr-S-HEX2 (Gráfico 11) apresentou atividade antiproliferativa contra todas as linhagens tumorais testadas, sendo mais ativo contra glioma, mama e rim, como verificado em testes anteriores. O objetivo de testar frações do extrato bruto traduz-se em averiguar se a atividade antiproliferativa é resultante da ação do sinergismo, quando a mistura complexa de substâncias presentes em extratos vegetais é a responsável pela atividade biológica, fato muito comum quando se trata de produtos naturais, ou se a ação é proveniente principalmente de um composto presente no extrato bruto.



**Gráfico 11:** Atividade antiproliferativa do **PRir-S-HEX2** em painel de 07 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

O Gráfico 12 relaciona a porcentagem de crescimento celular e o PRir-S-HEX-Fr1,2 nas diferentes concentrações testadas.

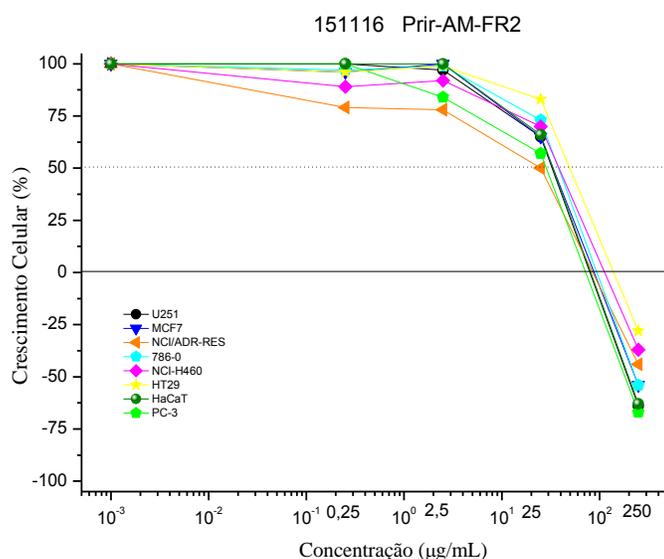


**Gráfico 12:** Atividade antiproliferativa da **PRir-S-HEX-Fr1,2** em painel de 07 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

A PRIr-S-HEX-Fr1,2 apresentou-se inativa frente a todas as linhagens tumorais testadas. A fração reduziu a praticamente 0% o crescimento celular da linhagem tumoral MCF7 (mama) na concentração mais alta, o que significa que a amostra apresenta atividade citostática, entretanto não a caracteriza como citocida.

A composição química dos compostos voláteis presentes na fração e caracterizados via CG-EM indicou a presença de sesquiterpenos também presentes no óleo essencial de *C. articulatus*. No entanto, estudos anteriores avaliando a atividade antiproliferativa do óleo essencial de pripioca indicaram citotoxicidade em concentrações de 250 µg/mL, o que sugere que não são apenas estas substâncias responsáveis pela atividade antiproliferativa, já que os extratos, em especial o extrato hexânico apresentam citotoxicidade em concentrações menores. Portanto, essa fração consiste na fração mais apolar presente no extrato hexânico do resíduo sólido de pripioca, a mais similar em termos de sesquiterpenos com o óleo essencial dos rizomas de pripioca, entretanto, PRIr-S-HEX-Fr1,2 foi considerada inativa frente as linhagens tumorais avaliadas.

O Gráfico 13 relaciona a porcentagem de crescimento celular e a PRIr-S-HEX-Fr3 nas diferentes concentrações testadas:



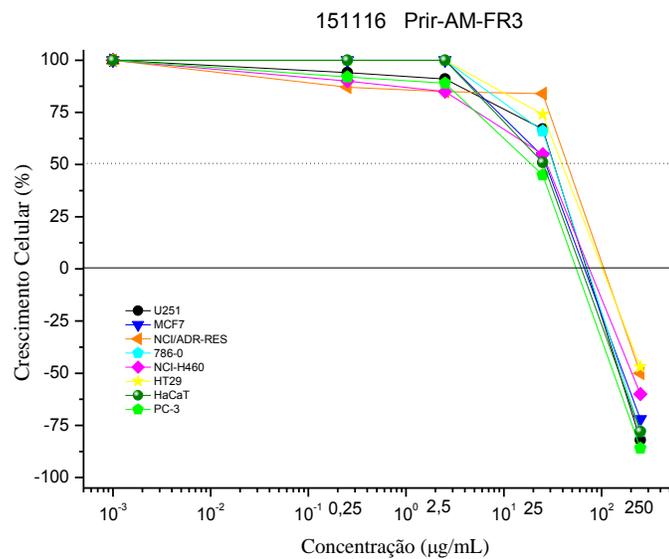
**Gráfico 13:** Atividade antiproliferativa da Fração da PRIr-S-HEX-Fr3 em painel de 07 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

A PRIr-S-HEX-Fr3 apresentou atividade inibitória frente a todas as linhagens celulares testadas, sendo mais ativa contra a linhagem tumoral PC-3 (próstata), 786-0 (rim) e U251 (glioma)

e a linhagem de células com fenótipo não-tumoral (HaCaT/queratinócito humano) entretanto em concentrações elevadas.

Análises de CG-EM identificaram a presença da mustacona como um dos componentes majoritários presentes na fração.

O Gráfico 14 relaciona a porcentagem de crescimento celular e a PRIr-S-HEX-Fr4 nas diferentes concentrações testadas:

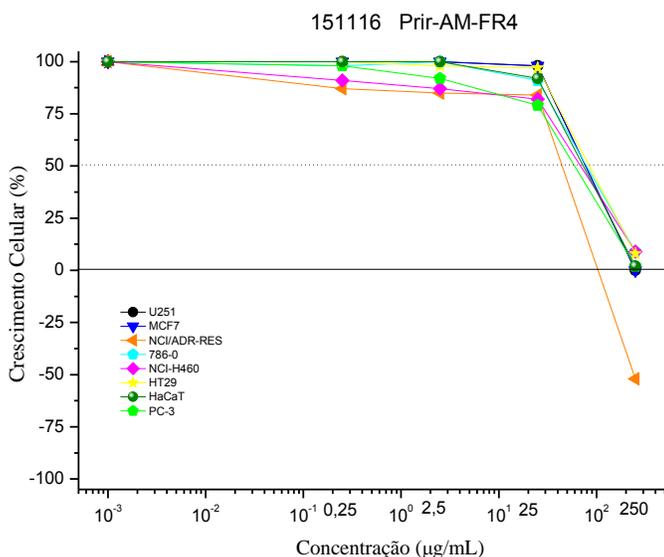


**Gráfico 14:** Atividade antiproliferativa da **PRIr-S-HEX-Fr4** em painel de 07 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

PRIr-S-HEX-Fr4 revelou-se a fração mais ativa atuando na inibição de todas as linhagens tumorais testadas, sendo mais eficiente nas linhagens PC-3 (próstata), MCF7 (mama) e U251 (glioma).

Comparação de espectros de massa por CG-EM revelaram a presença de mustacona e corimbolona na fração. Embora alguns componentes (como, por exemplo, a mustacona) estejam presentes em mais de uma fração, a corimbolona encontra-se presente somente na fração PRIr-S-HEX-Fr4.

O Gráfico 15 relaciona a porcentagem de crescimento celular e a Fração PRIr-S-HEX-Fr5 nas diferentes concentrações testadas:



**Gráfico 15:** Atividade antiproliferativa da **PRIr-S-HEX-Fr5** em painel de 07 linhagens tumorais humanas e 01 linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra em suas diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

A fração PRIr-S-HEX-Fr5 apresentou atividade inibitória frente apenas a uma linhagem tumoral testada NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), o que indica que a fração é seletiva.

Com as ferramentas disponibilizadas não foi possível identificar os componentes presentes na PRIr-S-HEX-Fr5, no entanto, devido a alta polaridade da fase móvel utilizada para extração (MeOH 100%), a fração contém os compostos de maior polaridade presentes no extrato hexânico do resíduo sólido de pripioca.

A Tabela 12 mostra os valores de TGI, os quais representam a concentração de amostra (µg/mL) necessária para inibir completamente a proliferação celular, calculados por meio de regressão linear simples, com o auxílio de software Origin®:

Os resultados da atividade antiproliferativa das frações do extrato hexânico indicaram maior atividade antiproliferativa das frações de polaridade intermediária (PRIr-S-HEX-Fr3 e, principalmente, PRIr-S-HEX-Fr4), enquanto as frações PRIr-S-HEX-Fr1,2 e PRIr-S-HEX-Fr5 foram consideradas inativas. A PRIr-S-HEX-Fr4 obteve valores menores de TGI que o extrato hexânico bruto (com exceção a NCL-ADR/RES).

**Tabela 12:** TGI: concentração de cada amostra ( $\mu\text{g/mL}$ ) necessária para inibir completamente a proliferação celular para cada linhagem testada

	<b>2</b>	<b>M</b>	<b>a</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>P</b>	<b>H</b>	<b>Q</b>
<b>Doxorubicina</b>	2,6	25	10,7	9,1	0,10	0,90	2,2	0,56
PRIr-S-HEX2	71,8	65,1	77,0	85,4	123,1	76,0	117,6	80,4
PRIr-S-HEX-Fr1,2	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
PRIr-S-HEX-Fr3	80,0	91,4	81,9	100,9	121,5	68,5	159,5	82,3
PRIr-S-HEX-Fr4	64,5	62,8	120,8	67,5	72,6	47,1	112,0	55,9
PRIr-S-HEX-Fr5	250	250	118,0	>250	>250	>250	>250	>250

Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (prostata); h = HT29 (cólon).  
Linhagem não tumoral humana: q = HaCat (queratinócitos imortalizados).

Portanto, estudos devem ser direcionados as frações PIRIr-S-HEXFr3 e PIRIr-S-HEX-Fr4, buscando o isolamento de compostos para averiguar se há apenas uma substância atuando biologicamente, ou se há sinergismo, já que as frações ainda apresentam uma composição química complexa.

#### 4.8 EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE COM SOLVENTES REATIVOS

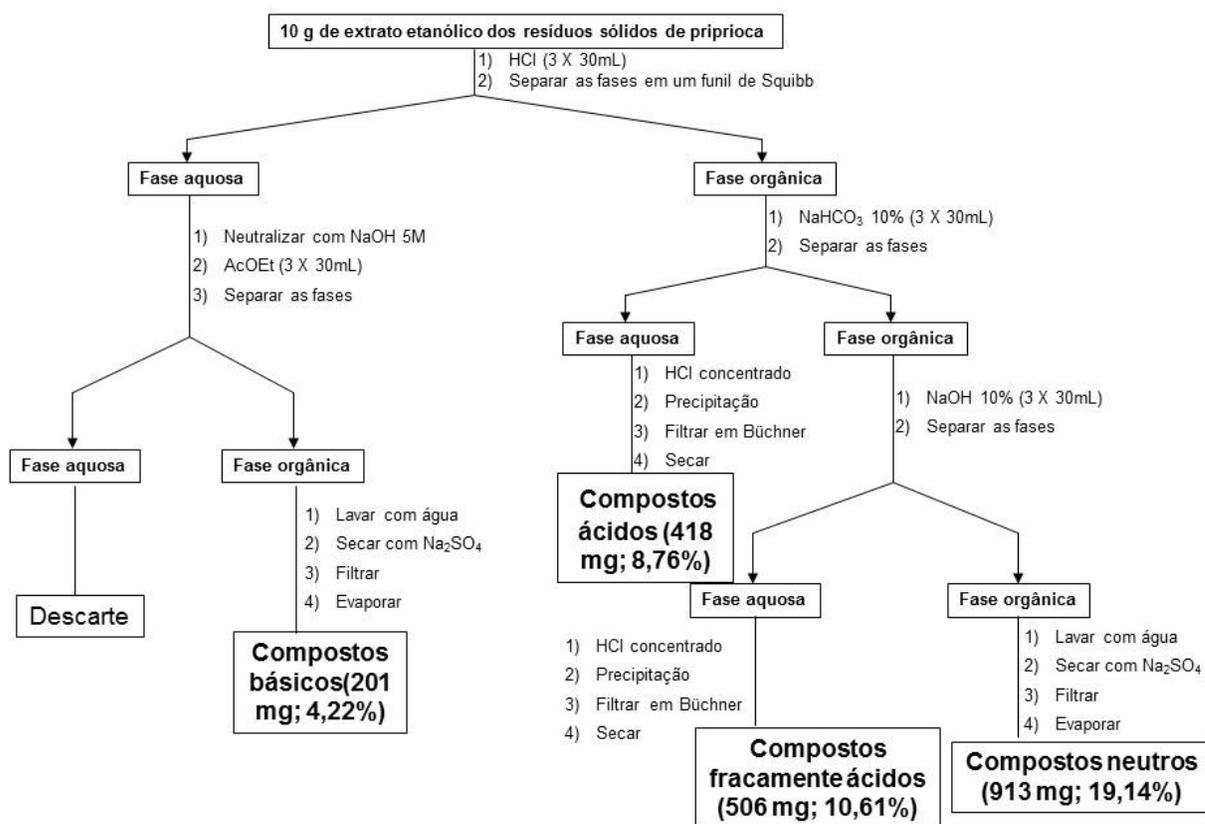
A técnica de extração por solventes reativos necessita a utilização de um reagente (solvente) que reaja quimicamente com o composto a ser extraído. Essa técnica pode ser utilizada para remoção de impurezas assim como para a separação de componentes de uma mistura. Entre as soluções mais utilizadas estão: soluções aquosas de NaOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , HCl, ou outras que possuam características ácidas ou básicas (BARATA, CASTRO e TAÚBE JR., 2014).

A técnica baseia-se nas reações do tipo ácido-base, utilizando-se solução aquosa básica para remover ácidos orgânicos e fenóis em solução, baseando-se no princípio de que o sal sódico do ácido e do fenol são solúveis em solução aquosa básica. Da mesma maneira, um composto básico (como um alcaloide) pode ser removido de uma solução de um solvente orgânico, pelo tratamento com a solução aquosa ácida reativa.

Tendo por princípio que solventes ácidos extraem substâncias básicas e inversamente solventes básicos extraem substâncias básicas, utilizou-se do ácido clorídrico (HCl) para a extração de substâncias básicas eventualmente presentes no extrato etanólico e a utilização de bases ( $\text{NaHCO}_3$  e NaOH) visou a extração de substâncias ácidas. As substâncias presentes no extrato as

quais não reagiram nem com ácidos e nem com bases são consideradas substâncias neutras como se vê no fluxograma 3.

**Fluxograma 3:** Fracionamento do extrato etanólico dos resíduos sólido de priprioca por meio de solventes reativos

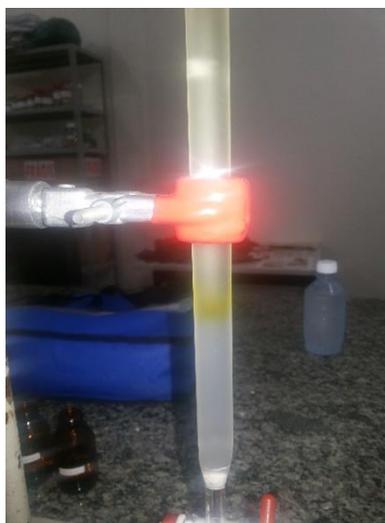


Os rendimentos de cada fração indicam que compostos neutros são predominantes no PRIRES.

Uma avaliação utilizando CCDs indicou os compostos básicos mais propícios para um fracionamento em coluna cromatográfica. Teste com reagente de Dragendorff foi realizado para detectar a presença de **alcaloides**, entretanto, não houve a precipitação de cristais laranja, portanto o resultado foi considerado **negativo**. Na literatura não há registro de alcaloides para a espécie *C. articulatus*.

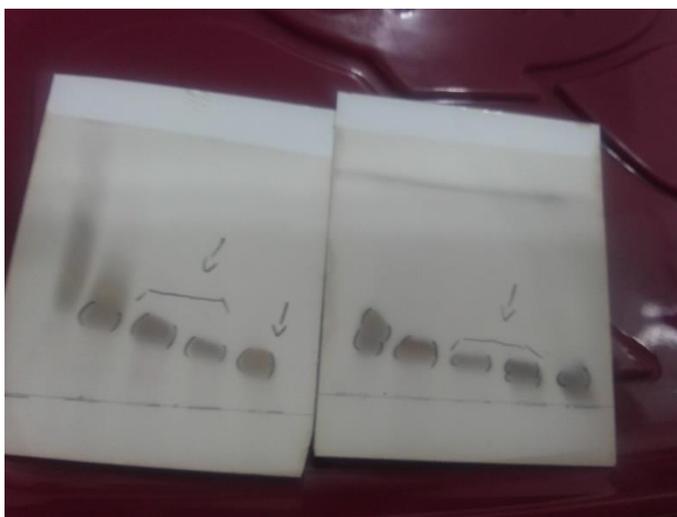
#### 4.8.1 Cromatografia em coluna

Os compostos básicos (PRIr-Bases) extraídos com HCl no processo de extração com solventes reativos foram fracionados em cromatografia de coluna utilizando-se 142,5 mg da amostra. A coluna cromatográfica (Fig 17) foi preparada em coluna de vidro com sílica 60 mesh e as fases móveis utilizadas foram: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 1%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 2%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 97:3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 95:5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 90:10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 80:20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 70:30, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 50:50, MeOH 100%.



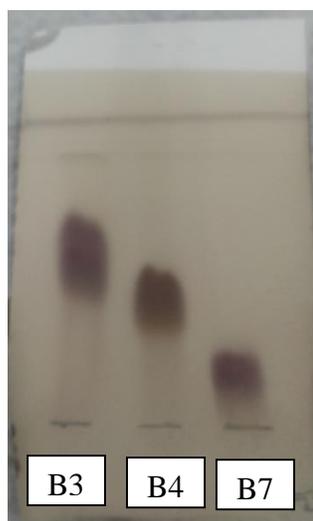
**Figura 17:** Coluna cromatográfica feita com sílica-gel 60 mesh para o fracionamento do PIR-Bases.

Análises com CCD permitiram o agrupamento das frações obtidas totalizando 08 frações (Fig 18):



**Figura 18:** CCDs das frações de PRIr-Bases obtidas por fracionamento em coluna cromatográfica

Foi observado apenas uma mancha nas análises por CCD em três frações utilizando diferentes fases móveis:



**Figura 19:** CCD das 03 frações de PRIr-Bases priprioica consideradas purificadas e enviadas para análise em *UPLC*

Para a fração PRIr-Bases-B3 obteve-se 7,9 mg e rendimento de 5,5%. Já para a fração PRIr-Bases-B4 obteve-se 4,4 mg e rendimento de 3,1% e para a fração PRIr-Bases-B7 obteve-se 8,6 mg e rendimento de 6%. Embora seja observado apenas uma mancha em cada fração na CCD, é possível que essas amostras ainda sejam misturas de várias substâncias sobrepostas.

#### 4.8.2 Análises em *UPLC*

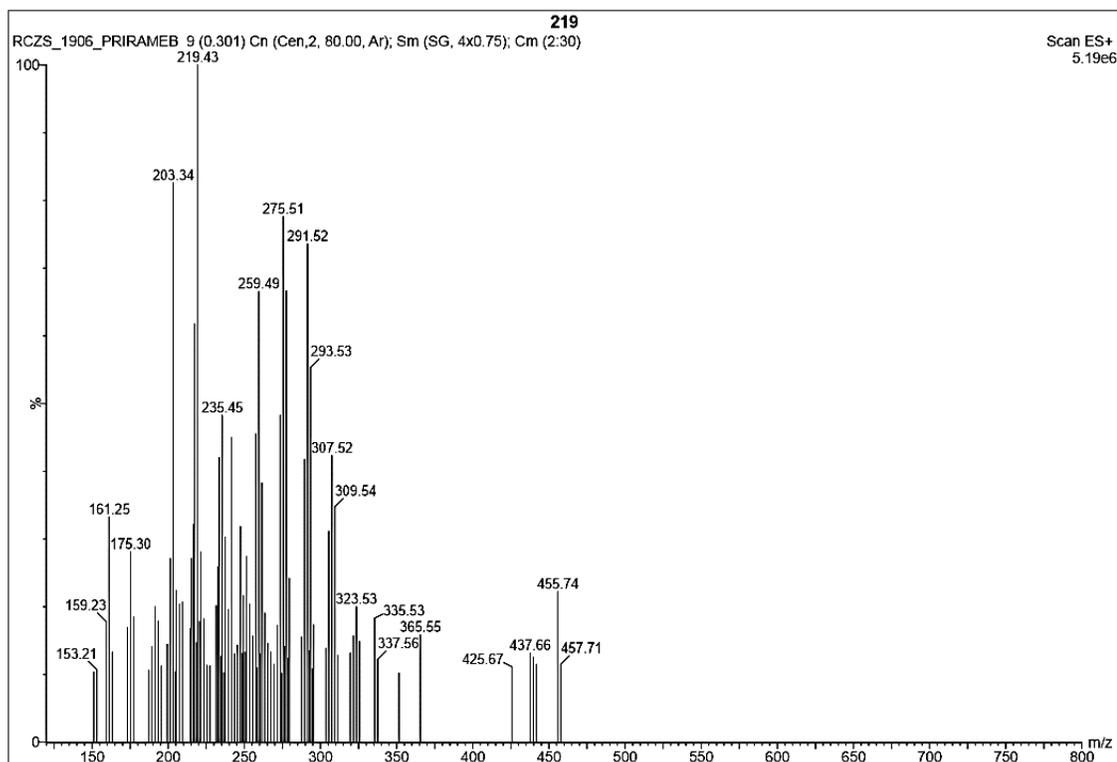
As análises *UPLC* foram realizadas para as amostras: PRIr-S-ET, PRIr-Bases, PRIr-Ácidos, PRIr-Fenóis, PRIr-Bases-B3, PRIr-Bases-B4 e PRIr-Bases-B7. Foram considerados os arquivos ESI (EletoSpray Ionization) dos extratos, espectros de massa que são obtidos pela infusão direta do extrato. Essas análises fornecem o “*fingerprint*”, ou seja, a impressão digital do extrato, indicando os íons presentes na amostra.

As siglas *UPLC* correspondem ao termo em inglês (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), ou Cromatografia Líquida de Ultra Performance, consiste numa técnica cromatográfica que melhorou três áreas relacionadas a cromatografia líquida: resolução cromatográfica, velocidade e sensibilidade das análises. *UPLC* consiste no aprimoramento da técnica HPLC (*Hight Performance Liquid Chormatography*) (SRIVASTAVA *et al*, 2010).

A técnica de Ionização por EletoSpray (ESI) é uma técnica de ionização amplamente utilizada para a produção de íons em fase gasosa (sem a fragmentação), as moléculas podem produzir íons positivos (quando são protonadas), ou íons negativos, quando são desprotonadas. É possível selecionar qual tipo de ionização pretende-se obter (BANERJEE e MAZUMDA, 2012).

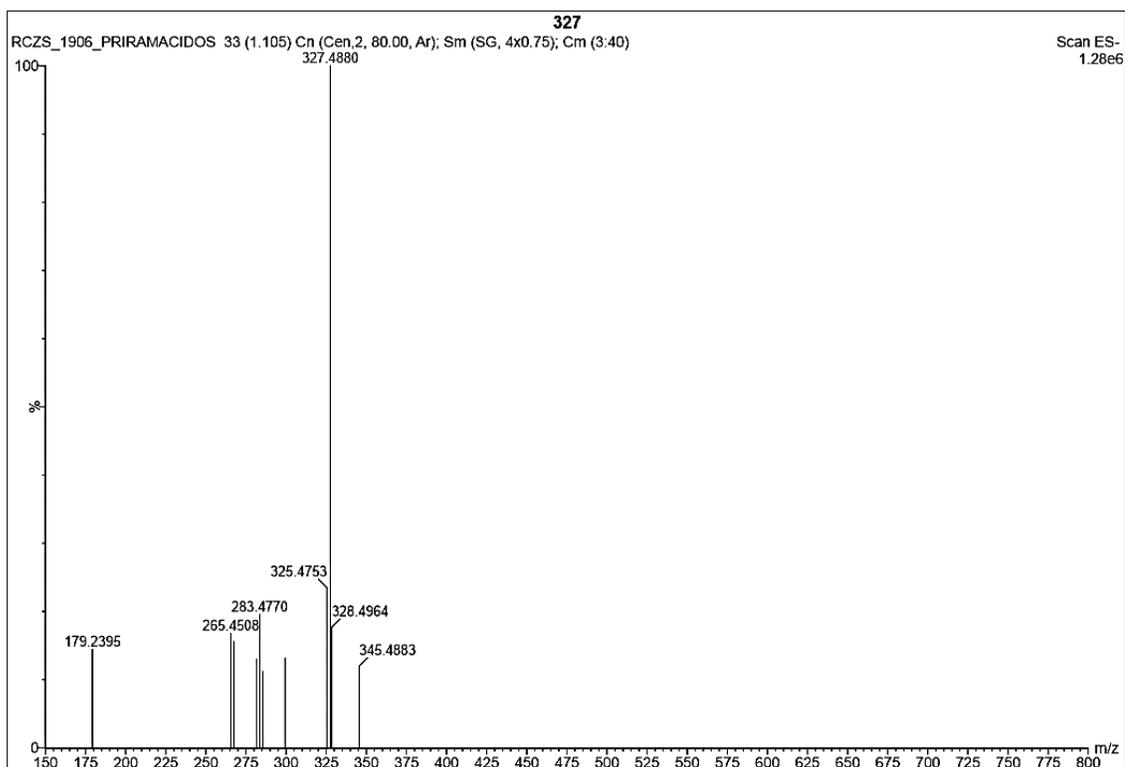
O extrato PRIr-S-ET é o resultado da extração do resíduo de priprioca com EtOH. PRIr-S-ET foi analisado no detector de massas pelo modo positivo. Através de seu espectro de massas (Espectro 1) observa-se inúmeros picos, que correspondem á ions de massa molecular+1 de uma ampla variedade de substâncias químicas. Existe a possibilidade de alguns desses íons serem fragmentos de íons de outras massas, resultado da colisão entre moléculas levando à fragmentação. Outra possibilidade menos comum é a fragmentação de moléculas pelo gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) utilizado para evaporar o solvente, para que o mesmo não interfira nas leituras. Portanto, as substâncias visualizadas no espectro positivo encontram-se ionizadas positivamente (protonadas), logo sua massa molecular estará acrescida de massa 1. Por exemplo: o pico de maior intensidade representa o ion de massa molecular 219m/z, portanto, sua massa molecular é 218 m/z. Por meio dos cromatogramas de CG-EM sabe-se que 218 m/z é massa molecular comum de sesquiterpenos característicos dos rizomas de priprioca, como a mustacona. Entretanto, nessa técnica o fato do pico ser mais intenso não significa necessariamente que a substância (íon) é a mais abundante, a mais provável significação é que á substância é facilmente ionizável. Neste caso, sabe-se que a

massa molecular 218 m/z é característica da espécie, então pode-se considerar que seja a substância mais abundante, e portanto a substância “marcadora” do extrato da *C. articulatus*.



**Figura 20-** Espectro de massas ESI de PRir-S-ET no modo positivo

As análises do extrato **PRir-Ácidos** foram realizadas em modo negativo e portanto não podem ser comparado diretamente com o PRir-S-ET, já que o último foi executado em modo positivo. Optou-se pelo modo negativo pois quimicamente, os ácidos tendem a desprotonar. No modo negativo as moléculas perdem um próton, obtendo uma carga negativa, logo a massa será M-1. O espectro negativo dos compostos ácidos apresentou 10 picos, correspondendo aos ions e destacando-se o de maior intensidade de massa molecular 327 m/z. Como provavelmente esta molécula perdeu um próton, sua real massa molecular é 328 m/z.



**Figura 21-** Espectro de massas ESI de PRIR-Ácidos no modo positivo

As análises do extrato **PRIR-Fenóis** foram realizadas no modo positivo e no modo negativo (Espectro 2 e 3 já que as substâncias fenólicas apresentam características fracamente ácidas. Comparando o modo negativo com PRIR-Ácidos, observa-se que espectro de PRIR-Fenóis apresenta uma composição rica muito mais variada. O espectro no modo positivo apresenta menor número de substâncias o que indica que PRIR-Fenóis é composto majoritariamente por substâncias com a tendência a desprotonar, como esperado.

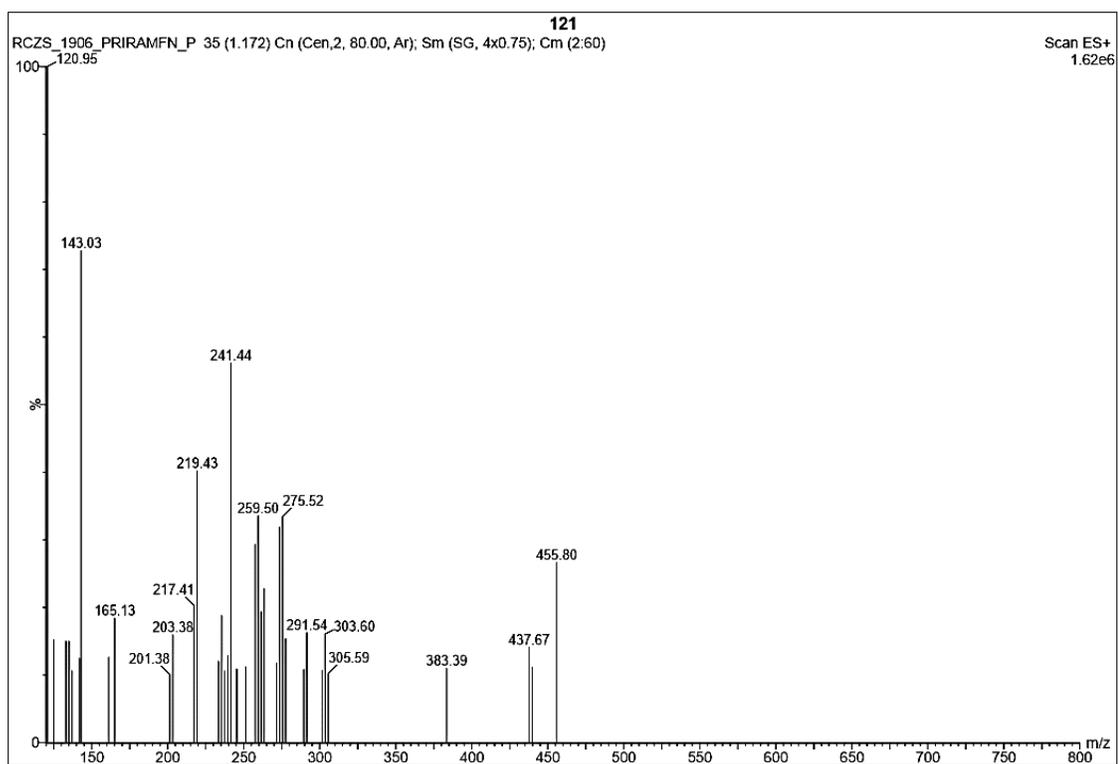


Figura 22: ESI do PRIR-Fenóis no modo positivo

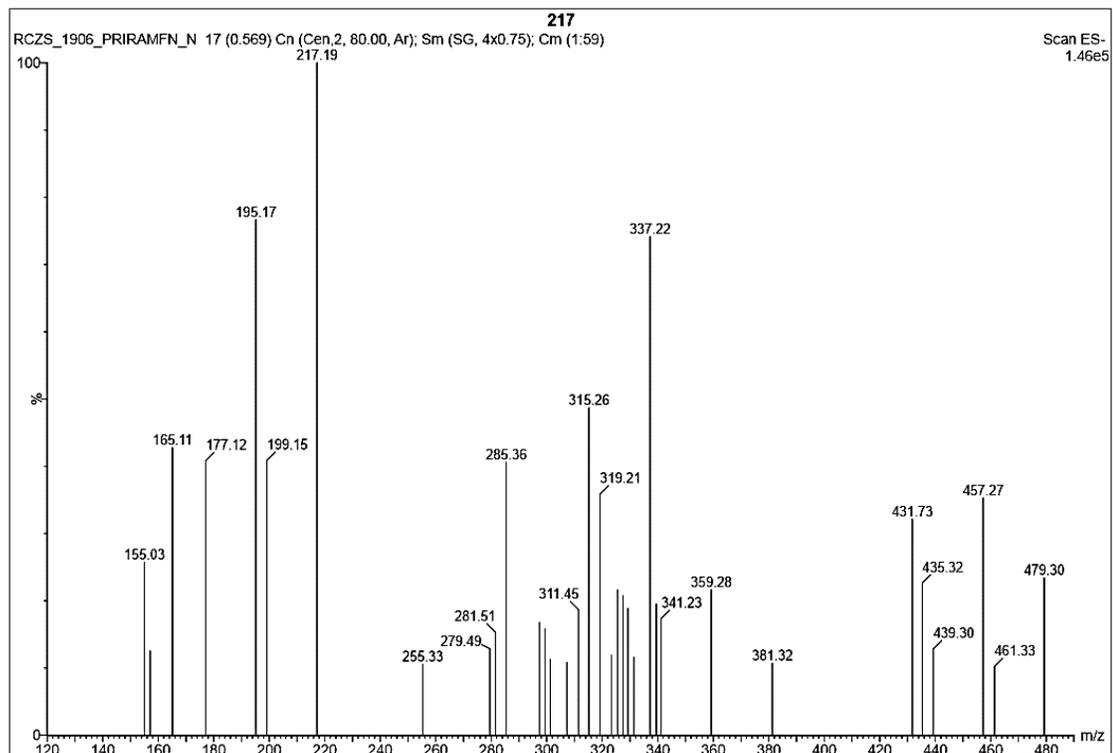


Figura 23: ESI do PRIR-Fenóis no modo negativo

Já as amostras do PRIr-Bases foram realizadas no modo positivo, pois compostos básicos tendem a receber prótons. O espectro revelou uma composição química rica, embora não tanto quanto o extrato etanólico bruto inicial PRIr-S-ET. As frações de PRIr-Bases foram avaliadas em seguida. O objetivo da realização da cromatografia em coluna era a purificação e o isolamento de substâncias, entretanto, o espectro positivo das frações mostrou que estas não estão puras, ainda apresentam mistura de uma grande variedade de compostos. Certamente a fração mais purificada foi a PRIr-Bases-B4, que apresentou o pico majoritário 277m/z, correspondendo à uma substância com a massa molecular 276m/z.

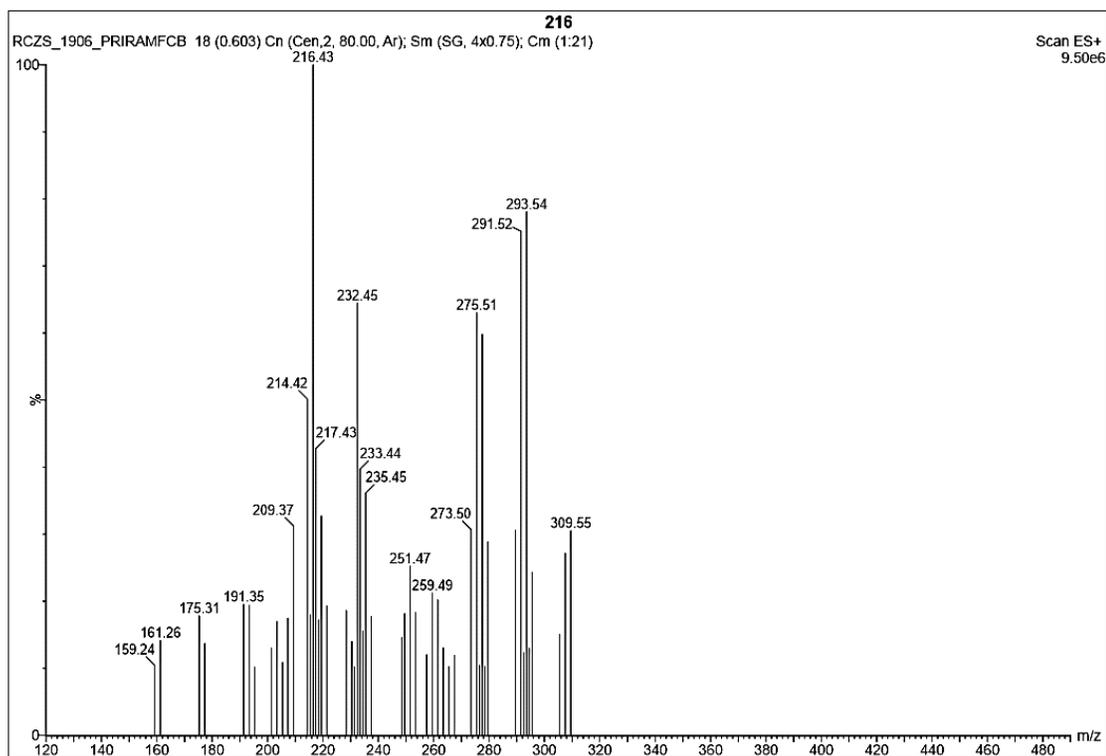


Figura 24: ESI do PRIr-Bases no modo positivo

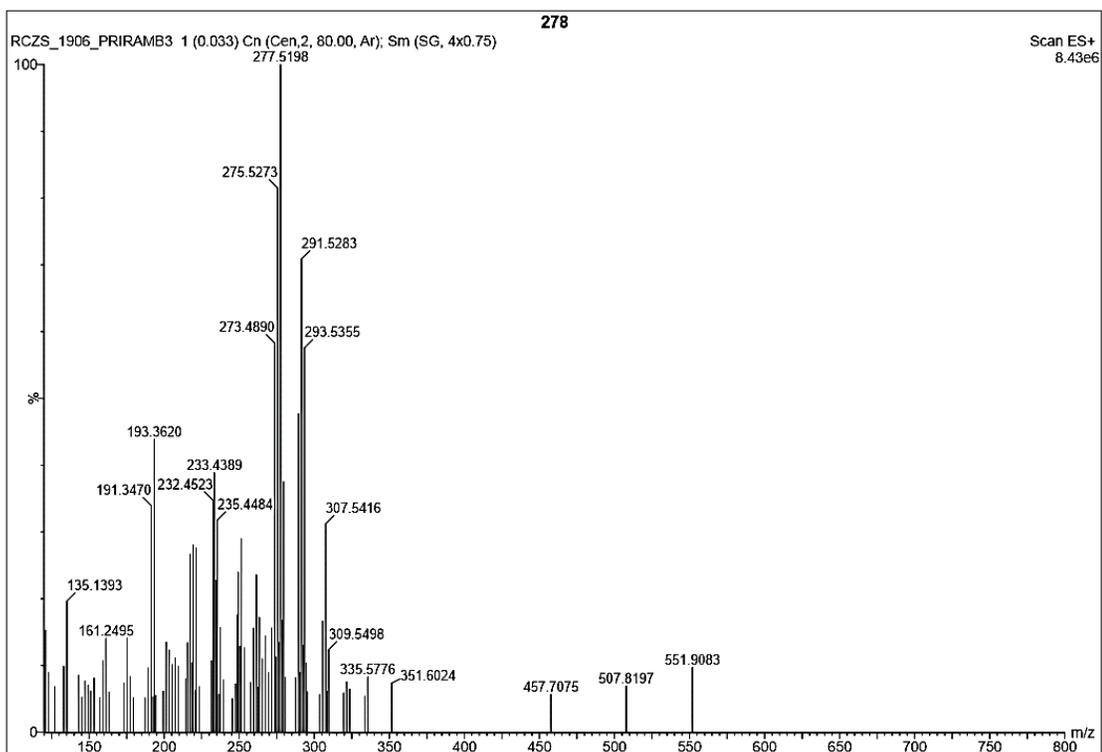


Figura 25: ESI do PRIR-Bases-B3 no modo positivo

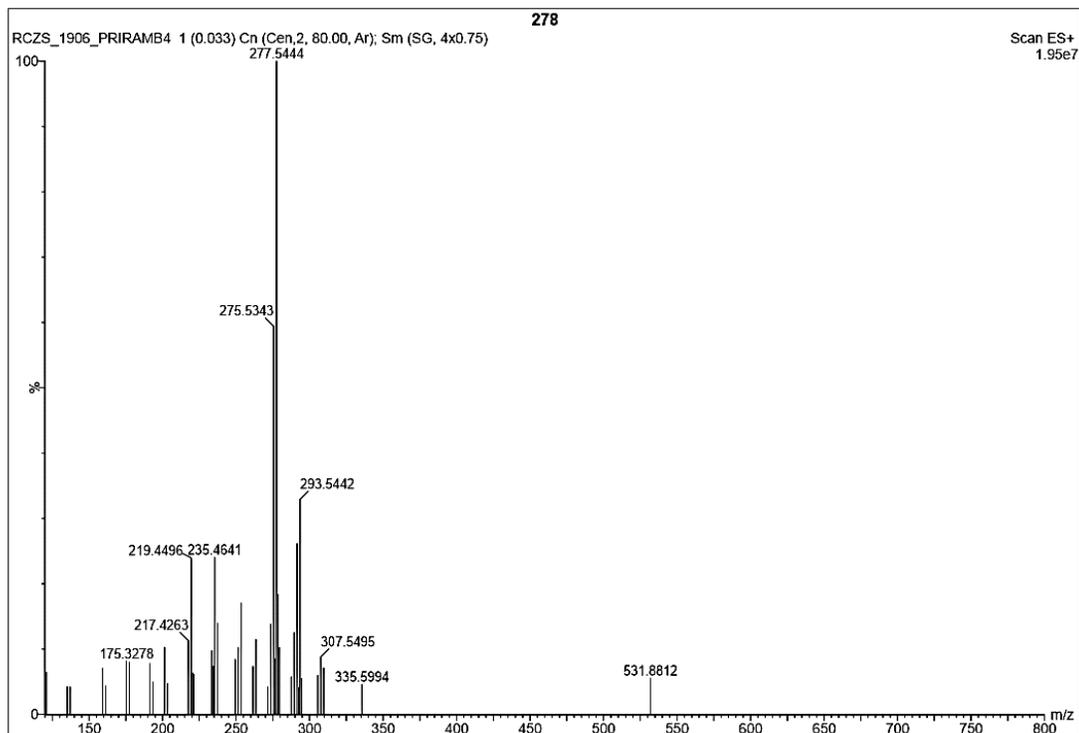


Figura 26: ESI de PRIR-Bases-B4 no modo positivo

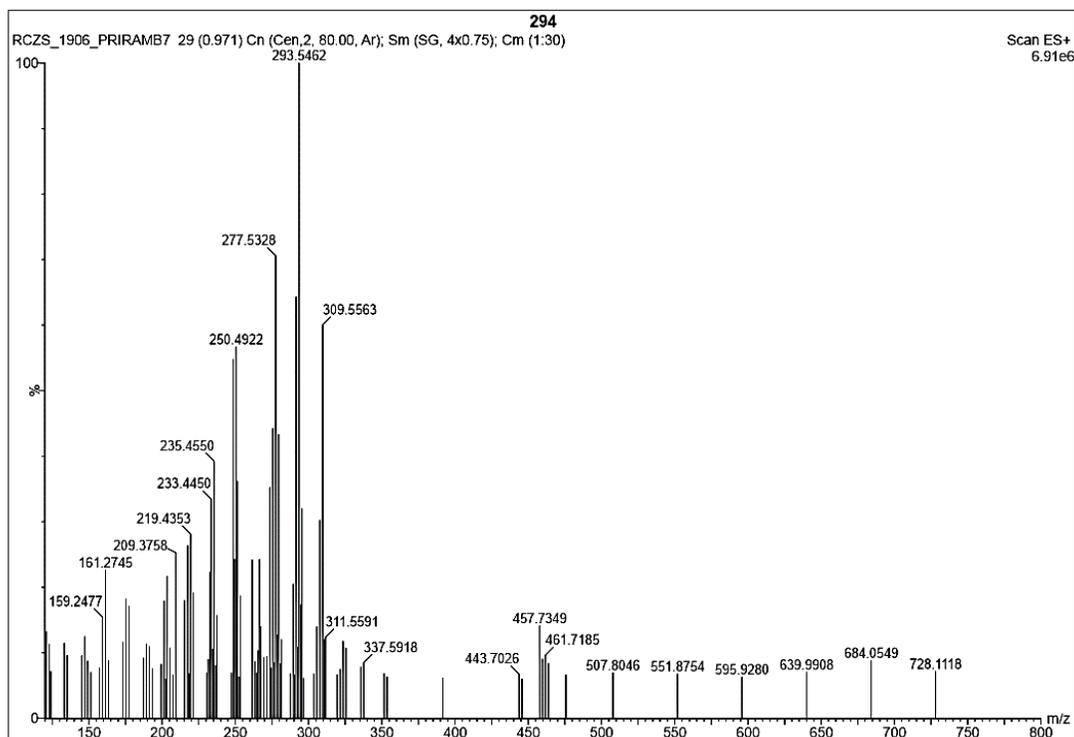


Figura 27: ESI do PRIr-Bases-B7 no modo positivo

Moléculas neutras não ionizam, portanto não são detectadas pela técnica ESI. Neste caso, futuramente poderiam ser avaliadas por HPLC ou outras técnicas de espectrometria de massas.

Em conclusão, pode-se afirmar pela análise dos espectros de massa, que os extratos Ácidos e Fenólicos (**PRIr-Ácidos e PRIr-Fenóis**) são compostos por um perfil rico de substâncias, principalmente sesqui e diterpenos, tendo grupamentos ácidos (Ar-CO<sub>2</sub>H) e fenólicos (Ar-OH)

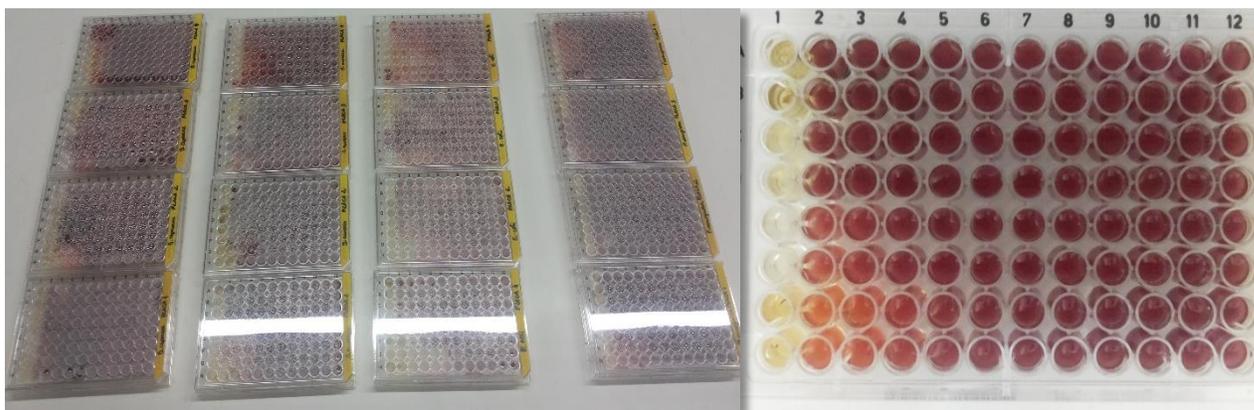
#### 4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRI-RES E DO HIDROLATO DE PRIPRIOCA

As cepas utilizadas para os ensaios antimicrobianos estão assim referenciadas: *Aspergillus niger* – ATCC 16404; *Candida albicans* - ATCC 10231; *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 13388; *Escherichia coli* - ATCC 11775; *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538; *Burkholderia cepacea* – ATCC 25416.

PRIr-S-HEX, as frações (PRIr-S-HEX-Fr1,2; PIRIr-S-HEX-Fr3; PIRIr-S-HEX-Fr4; PIRIr-S-HEX-Fr5) e o hidrolato de priprioça foram testados frente a quatro linhagens bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia cepacea*,

contra a levedura *Candida albicans* e o fungo filamentososo *Aspergillus niger* nas concentrações 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95  $\mu\text{g/mL}$ .

Para a leitura dos resultados para bactérias: após o período de incubação, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de CTT (cloreto de trifenil tetrazólio) e as placas foram reincubadas por 3 h. O CTT é um corante de oxirredução utilizado para detectar o crescimento microbiano. Para o preparo de 100 mL de solução aquosa são necessários 1 mg de CTT (sólido branco). Em solução o CTT apresenta-se como um líquido incolor pois está em sua forma oxidada. Na presença de  $\text{H}^+$  sofre redução e forma o trifenilformazan, que possui coloração avermelhada. Logo, o aparecimento da coloração vermelha indica atividade celular bacteriana (Fig 28).



**Figura 28:** Placas de 96 poços utilizadas para testes com linhagens bacterianas

Para a leitura dos resultados de levedura e fungos filamentosos: os resultados foram avaliados de acordo com o método CIM, Concentração Inibitória Mínima, ou seja, a concentração mínima exigida da substância em questão para obter efeito bacteriostático/fungistático ou bactericida/fungicida. Após o período de incubação a verificação da mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano (Fig 29).



**Figura 29:** Placas de 96 poços utilizada nos testes com linhagens fúngicas

Os valores de CIM para os extratos e as frações dos extratos de resíduo sólido e para o hidrolato de priprioica para as linhagens microbianas testadas estão listadas na Tabela 13:

**Tabela 13:** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do PRIr-S-HEX e suas frações e do hidrolato de priprioica para as linhagens microbianas testadas

Microrganismo	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )						Antibiótico
	PRIr-S-HEX	PRIr-S-HEX Fr1,2	PRIr-S-HEX-Fr3	PRIr-S-HEX-Fr4	PRIr-S-HEX-Fr5	Hidrolato	
<i>P.aeruginosa</i>	*	*	*	*	*	*	0,062
<i>B. cepaceae</i>	*	*	*	*	*	*	0,015
<i>S. aureus</i>	*	*	*	*	*	*	0,007
<i>E. coli</i>	*	*	1,0	*	*	*	0,004
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	0,002
<i>A. niger</i>	*	*	*	*	*	*	0,002

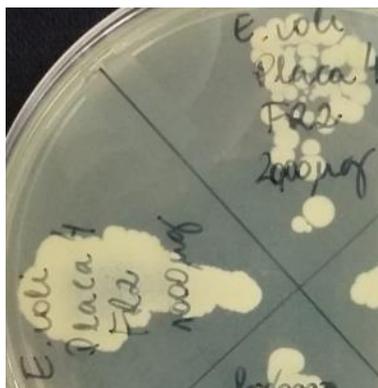
\* CIM > 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### Antibióticos utilizados:

Para as bactérias: cloranfenicol – solução 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Para o fungo e levedura: nistatina – solução 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

A PRIr-S-HEX-Fr3 apresentou CIM  $\geq$  1,0  $\mu\text{g/mL}$ , portanto, realizou-se a MBC (Minimum Bactericidal Concentration), que consiste na mais baixa concentração requerida para matar uma bactéria específica (Fig 30).



**Figura 30:** Zoom da placa relativa à MBC da PRIr-S-HEX-Fr3

1

A PRIr-S-HEX-Fr3 foi testada nas concentrações 2,0 e 1,0  $\mu\text{g/mL}$  e em ambas observou-se o crescimento do microrganismo, sendo a amostra considerada bacteriostática.

Também foram testados os compostos ácidos e os compostos fracamente ácidos (fenólicos) do resíduo sólido de pripioca (Tabela 14), oriundos do processo extrativo com solventes reativos, frente aos mesmos microrganismos nas concentrações anteriormente citadas.

**Tabela 14:** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de PRIr-Ácidos e PRIr-Fenóis para as linhagens microbianas testadas

Microrganismos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	PRIr-Ácidos	PRIr-Fenóis	Antibióticos
<i>P. aeruginosa</i>	*	*	0,062
<i>B. cepaceae</i>	*	*	0,015
<i>S. aureus</i>	1,0	2,0	0,007
<i>E. coli</i>	*	*	0,004
<i>C. albicans</i>	*	*	0,002
<i>A. niger</i>	*	*	0,002

\* CIM >2,0 $\mu\text{g/mL}$

É conhecido o fato que óleos essenciais apresentam uma atividade antimicrobiana mais abrangente quando comparados aos extratos etanólicos, uma vez que as classes das substâncias obtidas durante as extrações são distintas (DUARTE, 2006). Entretanto, Duarte (2006) observou em seus estudos que a maioria dos óleos essenciais e os extratos etanólicos correspondentes

(originado das mesmas plantas) apresentam atividade microbiológica contra as mesmas linhagens bacterianas.

Diversos estudos têm demonstrado a ausência de atividade inibitória do óleo essencial e do extrato etanólico dos rizomas íntegros de pripioca frente a testes com a levedura *Candida albicans*. Almeida (2011) reportou a ausência de atividade inibitória do óleo essencial de pripioca (*C. articulatus*) sobre o crescimento de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos.

A atividade anti-cândida de plantas brasileiras foi constatada nos estudos de Duarte *et al.* (2005) sendo uma destas plantas a pripioca. Foram testados o óleo essencial e o extrato etanólico dos rizomas íntegros da espécie. O óleo essencial foi considerado moderadamente inibitório, enquanto que o extrato etanólico foi considerado fracamente inibitório. Os autores concluíram que para se atingir a concentração inibitória mínima seriam necessárias altas concentrações do óleo essencial e do extrato.

As frações provenientes de PRI-RES também **não** apresentaram atividade inibitória frente a *Candida albicans*.

Ensaio antibacterianos têm sido realizados em diferentes regiões da África, onde os rizomas de *C. articulatus* apresentam grande destaque na medicina tradicional. Ensaio realizados por Oladosu *et al.* (2011) buscavam comparar as ações inibitórias dos óleos essenciais de duas espécies de *C. articulatus* cultivados na Nigéria: a espécie vermelha e a espécie preta. Estudos demonstraram grandes diferenças na composição química das espécies, sendo que o óleo proveniente do tipo vermelho mostrou-se abundante em ciperotundona, piperitona, maaline, germacrona, alfa-pineno e cipereno, enquanto o óleo do tipo preto apresentou os constituintes cedro, guaia-5-en-11-ol, ciperotundona, sabineno, alfa-pineno e trans-pinocarveol (OLADOSU *et al.*, 2011).

As bactérias testadas no estudo de Oladosu *et al.*, (2011) foram: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo do tipo vermelho apresentou atividade inibitória contra *B. cereus*, *S. epidermidis* e *S. aureus*. Três bactérias gram-negativas foram sensíveis ao óleo do tipo vermelho: *P. mirabilis*, *K. pneumonia* e *S. marcescens*. O óleo apresentou atividade moderada contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. Já o tipo preto apresentou atividade inibitória contra quatro bactérias gram-positivas: *B. megaterium*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis* e *B. cereus*.

Desmarchelier (1996) estudou a decocção de rizomas de *C. articulatus* coletados na área do rio Tambopata, em Madre de Dios, Peru, durante o mês de Janeiro de 1994. Testes antimicrobianos revelaram que *Staphylococcus aureus* foi totalmente inibida pela decocção de *C. articulatus*, no entanto não apresentaram efeito inibitório contra *E. coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*.

Neste estudo, PRIr-Fenóis e PRIr-Ácidos apresentaram atividade inibitória frente a *S. aureus*. A fração PRIr-S-HEX-Fr3 pode ser considerada moderadamente inibitória para *E. coli*, entretanto não apresentou atividade inibitória contra *P. aeruginosa*.

Devido a inexistência de um padrão de valores de CIM que classifiquem a atividade antimicrobiana de materiais vegetais, alguns autores tendem a propor valores classificatórios. Aligianis *et al.* (2001) propôs a seguinte classificação: CIM até 500 µg/mL: forte inibição; CIM entre 600-1500 µg/mL: inibição moderada e CIM acima de 1600 µg/mL: fraca inibição (Duarte, 2006).

Com base na afirmação anterior, a fração PRIr-S-HEX-Fr3 pode ser considerada moderadamente inibitória para *E. coli*, enquanto PRIr-Fenóis podem ser considerados apenas fracamente inibitórios frente a *S. aureus* e PRIr-Ácidos moderadamente inibitório frente a *S. aureus*. Um estudo realizado por Duarte (2006) revelou que o óleo essencial de pripioca inibiu também na concentração de 1,0 µg/mL a bactéria *Staphylococcus epidermidis*.

O hidrolato de pripioca não apresentou atividade microbiológica frente às linhagens testadas.

Os dados obtidos nas pesquisas são de difícil comparação devido a diferença com respeito as técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e a grande variação encontrada na composição química dessas (FANTI, 2008).

## 5. CONCLUSÃO

✓ O resíduo sólido (PRI-RES) e o hidrolato de pripioca, rejeitos da indústria de extração de óleo essencial, apresentam um grande potencial do ponto de vista biológico, químico, econômico e tecnológico.

✓ Para o estudo fitoquímico obteve-se extratos e frações purificadas com diferentes graus de polaridade, sendo para isso utilizadas diferentes metodologias.

✓ O estudo fitoquímico por CG-EM do PRI-RES e do hidrolato indicaram a presença de alguns sesquiterpenos presentes no óleo essencial de pripioca, moléculas com atividade biológica comprovada tais como **mustacona** e **corimbolona**. Também foram identificados ácidos graxos, esteroides e a vitamina E, um tocoferol. Esses resultados sugerem potencial atividade antiplasmódica (presença de mustacona e corimbolona) e anti-oncocercose (mustacona e ácido linoleico) do PRI-RES.

✓ A análise feita por *UPLC* mostrou extratos e frações com composição química complexa.

✓ Ensaios com *Artemia salina* mostraram toxicidade dos extratos de PRI-RES. Constatou-se que o extrato mais tóxico frente ao microcrustáceo foi o **PRIr-P-HEX**, seguido do **PRIr-P-ACOET** e por fim **PRIr-P-DIC**.

✓ A atividade antiproliferativa foi constatada sendo o extrato mais ativo o **PRIr-S-HEX**. Os extratos de PIRIr-S-DIC e PIRIr-S-ACOET foram ativos porém em concentrações mais elevadas. O extrato **PRIr-S-ET** foi inativo frente a todas as linhagens celulares, o que sugere que as substâncias mais apolares presentes no PRI-RES são as responsáveis pela atividade antiproliferativa e não as substâncias e de maior polaridade.

✓ O extrato **PRIr-S-HEX** demonstrou atividade antiproliferativa superior à apresentada pelo óleo essencial de pripioca. Sendo assim, os sesquiterpenos presentes em alta concentração no óleo essencial provavelmente não são os únicos responsáveis pela atividade biológica.

✓ PIRIr-S-HEX foi fracionado em cromatografia de coluna *flash* resultado em quatro frações avaliadas em novos testes antiproliferativos. A fração mais apolar PIRIr-S-HEX-Fr1,2 e a fração mais polar PIRIr-S-HEX-Fr5 foram consideradas inativas e as frações de polaridade

intermediária **PRIr-S-HEX-Fr3** e **PRIr-S-HEX-Fr4** foram consideradas ativas, com ênfase para a fração **PRIr-S-HEX-Fr4**, a qual apresentou os menores valores de TGI.

✓ Foram, ainda, realizados testes antimicrobianos os extratos **PRIr-S-HEX**, **PRIr-S-HEX-Fr1,2**; **PRIr-S-HEX-Fr3**; **PRIr-S-HEX-Fr4**, **PRIr-S-HEX-Fr5**, **PRIr-Ácidos** e **PRIr-Fenóis**.

✓ Apenas a fração **PRIr-S-HEX-Fr3** apresentou inibição frente a *E. coli* na concentração de 1,0 µg/mL e pode ser considerada moderadamente inibitória. Realizou-se MBC da mesma fração e foi determinado que a mesma é bacteriostática, não bactericida. **PRIr-Ácidos** foi considerada fracamente inibitória frente a *S. aureus* e **PRIr-Fenóis** foi considerada moderadamente inibitória frente a *S. aureus*.

✓ Para demonstrar a potencialidade do hidrolato, resíduo industrial líquido cujo descarte em rios da região podem afetar a biofauna, desenvolveu-se neste trabalho um protótipo de hidratante aromatizado com hidrolato de priprioca. A composição química do hidrolato de priprioca e o odor agradável do mesmo indicam possibilidades de utilização para fins de aromatização de ambientes e formulação de cosméticos.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ABIHPEC: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética, **Panorama do Setor HPPC**, v.11-08-15, 2015. Disponível em <<https://www.abihpec.org.br/publicacoes/>>. Acesso em set 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of the essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, 4 ed., Illinois/USA: Allured Publish Corporation, 2007, 798 p.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAQUI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p. 678-689, 2006.

ALIGIANIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALMEIDA, L. F. D. **Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos** João Pessoa, PB. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Paraíba, 2011.

ALMEIDA, L. V.; LEITÃO, A.; REINA, B.; DEL CARMEN, L. MONTANARI, C. A.; LOPES, P. T. M. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem com o DNA: uma introdução, **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**, 1 ed., Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

BALUNAS, M.J.; JONES, W.P.; CHIN, Y.W.; MI, Q.; FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D.; CORDELL, G.A.; SWANSON, S.M.; PEZZUTO, J.M.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project, **Chem Biodivers**, v. 3, p. 897-915, 2006.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-40, 2012.

BARATA, L. E. S.; VILHA, A. M.; CARVALHO, R. Mercado de perfumes e cosméticos no Brasil, In: **III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais**, Campinas-SP, 2005.

BARATA, L. E. S.; CASTRO, K. C. F; TAÚBE JR., P. S. **Experimentos de Química** 1 ed., Santarém: UFOPA, 2014.

BERG, M. E. V. D. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático** 2 ed., Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993, 84 p.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M. C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, p. 588-594, 2009.

BOAVENTURA JR.; S. **Síntese de derivados da artemisinina e estudos da atividade *is vitro* contra *Schistosoma mansoni***, Campinas, SP. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, 2015.

BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A peregrinação de um pacatubano, **Química Nova**, v. 17, n.5, p. 405-445, 1994.

CASTELLANI, D.C.; DOMENICO, C.I.; RONCOLETTA, L.M.A.; SILVA, A.C.; TOZAKI R.M.1; OLIVEIRA, D.H. Coeficientes técnicos de produção da priprioca (*Cyperus articulatus* L.) em sistema orgânico, na região de Belém (PA), **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.1, p.606-611, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (Orgs) **Fundamentos de Cromatografia** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006, 453 p.

CORUMBÁ, L. G. **Otimização do processo de extração de óleo essencial de priprioca (*Cyperus articulatus* L.) por arraste com vapor**. Belém, PA. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal do Pará, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 91-96, 1996.

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

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA C. Anti-*candida* activity of Brazilian medicinal plants **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, 2006.

FANTI, F. P. **Aplicação de extratos de folhas e tubérculos de *Cyperus rotundus* L. (*Cyperaceae*) e de auxinas sintéticas na estaquia caular de *Duranta repens* L. (*Verbenaceae*)**, Curitiba, PR. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2008.

GLOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow, **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, **Cell** **144**, p. 646-674, 2011.

Huffman, MA. Current evidence for self-medication in primates: a multidisciplinary perspective, **American Journal of Physical Anthropology**, v.104, n.25, p. 171-200, 1997.

Instituto Nacional do Câncer (INCA), (2015). Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em nov. 2015.

LUPE, F. A. **Estudo da Composição Química de Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas da Amazônia**, Campinas, SP, 2011. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Unicamp.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C., VEIGA JR. V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares, **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MAIA, G. S; ANDRADE, E. H. E. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils, **Química Nova**, v.32, n.3, p. 595-622, 2009.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, **Drug Information Journal** v. 32, p. 513-524, 1998.

MEIRELLES FILHO, J. C. **Livro de ouro da Amazônia** 5ª ed., Rio de Janeiro: Ediouro, 2006, 480 p.

METUGE, J. A.; BABIAKA, S. B.; MBAH, J. A.; NTIE-KANG, F.; AYIMELE, G. A.; CHONGWA, F. Anti-onchocerca Metabolites from *Cyperus articulatus*: Isolation, In Vitro Activity and In Silico 'Drug-Likeness', **Nat. Prod. Bioprospect**, v. 04, p. 243-249, 2014.

MIGUEL, L. M. **Uso Sustentável da Biodiversidade na Amazônia Brasileira: experiências atuais e perspectivas das bioindústrias e fitoterápicos**. São Paulo, SP, 2007. (Dissertação de Mestrado) Universidade de São Paulo, USP.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines, **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 83, p. 757-766, 1991.

NGUTA, J. M.; OPONG, R.; NYARKO, A. K.; MANU, D.; ADDO, P. Medicinal plants uses to treat TB in Gana, **International Journal of Mycobacteriology**, v. 4, p. 116-123, 2015.

NCLSI, **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica**, 2a. ed., M27-A2, v. 22, n. 15, 2002a.

NCLSI, **Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos**, M38A, v. 22, n. 16, 2002b.

NCLSI, **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**, 6a ed., M7-A6, v. 23, n. 2, 2005.

NGO BUM, E.; C.L. MEIER A., URWYLER, A. S.; WANG, Y. P. L. Herrling Extracts from rhizomes of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae) displace [3H]CGP39653 and [3H]glycine binding from cortical membranes and selectively inhibit NMDA receptor-mediated neurotransmission, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, p. 103-111, 1996.

NGO BUM, E.; SCHMUTZ, M.; MEYER, C.; RAKATONIRINA, A.; BOPELET, M.; PORTET, C.; JEKER, A.; RAKOTONIRINA, S. V.; OLPE, H. R.; HERRLING, P. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae), **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 145-150, 2001.

NGO BUM, E.; SCHMUTZ, M.; MEYER, C.; RAKATONIRINA, A.; RAKOTONIRINA, S. V.; OLPE, H. R.; LINGENHOEHL, K. Ions and amino acid analysis of *Cyperus articulatus* L (Cyperaceae) extracts and the effects of the latter on oocytes expressing some receptors, **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 303-309, 2004.

OLADOSU, I. A; USMAN, L. A.; OLAWORE, N. O.; ATATA, R. F. Antibacterial Activity of Rhizomes Essential Oils of Two Types of *Cyperus articulatus* Growing in Nigeria, **Advances in Biological Research**, p. 179-183, 2011.

OLIVEIRA, J.; ZOGHBI, M. G. B. Usos e importância econômica da Priprioca no Pará, In: POTIGUARA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B. (Orgs) **Priprioca um recurso aromático do Pará** Belém: MPEG, UEPA, 2008.

PRATIMA, N. A.; SHRADDHA, B.; ZIBRAN, S. Review of Ultra Performance Liquid Chromatography and Its Applications, **IJRPS**, v. 3, n. 1, p. 19-40, 2013.

PEREIRA, I. C. **Fitoquímica e aspectos morfofisiológicos de *Aniba parviflora* (Lauraceae) cultivadas no município de Santarém-PA** (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA, 2012.

PINHEIRO, M.; KASPER, A. A. M.; LOPES, R. B.; ARÉVALO, M.; RIBEIRO, I.; SILVA, H, BARATTO, L. C.; SARTORATTO, A., BARATA, L. E. S.; SILVA, L. F. EVALUATION OF the reduction of acute toxicity of “priprioca” hydrolate (*Cyperus articulatus* L. var. nodosus - CYPERACEAE) in young tambaqui fish (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) as a function of storage time of the product, **Anais do 8<sup>th</sup> SBOE**, Rio de Janeiro-RJ, p. 125, 2015.

PINTO, M. A. S. **Técnicas de separação e identificação aplicadas a produtos naturais**, Florianópolis, SC (Trabalho de Conclusão de Curso) Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.

PROBST, I. S. **Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Avaliação de Potencial Sinérgico**, (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Unesp, 2012.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. Estudo químico de *Sinningia allagophyla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, 974-977, 2012.

ROBLES, R. C.; DIAS-TAGLIACOZZO, G. M.; MATTHES, L. A. F.; MAY, A. Avaliação pós-colheita de priprioca (*Cyperus articulatus* L.), **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v. 14, n.1, p. 67 - 76, 2008.

ROCHA, A. E. S. As espécies de *Cyperaceae* Juss. conhecidas como Priprioca In: POTIGUARA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B. (Org) **Priprioca um recurso aromático do Pará** Belém: MPEG, UEPA, 2008.

RUKUNGA, G. M.; MUREGI, F. W.; OMAR, S. A., GATHIRWA, J. W., MUTHAURA, C. N.; PETER, M. G.; HEYDENREICH, M.; MUNGAI, G. M. Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*, **Fitoterapia**, p. 188-190, 2008.

SANTOS, P. P., POTIGUARA, R. C. V., LINSI, A. L. F. A., MACEDO, E. G. Caracterização morfoanatómica dos caules de *Cyperus articulatus* L. e *C. prolixus* H.B.K. (Cyperaceae) **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 7, n. 1, p. 47-55, 2012.

SANTOS, E. R. M. **Extração, caracterização e avaliação biotiva do extrato de *Rumex acetosa*** Rio Grande do Norte, RN (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. **Chemistry for pharmacy students: general, organic and natural product chemistry** Ed. Wiley, 2007, 398 p.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 813-823, 2006.

SILVA, A. B.; MOTA, M. G. C.; CONCEIÇÃO, C. C. C. Sistema de produção de priprioca (*Cyperus articulatus* L. var. *nodosus*) desenvolvido por pequenos produtores no estado do Pará. In: POTIGUARA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B. (Org) **Priprioca um recurso aromático do Pará** Belém: MPEG, UEPA, 2008.

SIMÕES, C.M.O., SCHEKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5a edição, Porto Alegre, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia **Rev. Bras de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.; BOKESCH, H., KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 82, N. 13, 1990.

SMITH, J.A.; NGO, H.; MARTIN, M.C.; WOLF, J.K. An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines, **Gynecologic Oncology**, v. 98, p. 141-145, 2005.

SOUSA, P. J. C.; BRAVIM, L. S.; OLIVEIRA, J. P. T.; ZOGHBI, M. G. B. Efeito do óleo essencial de *Cyperus articulatus* L. na contratibilidade do músculo liso do íleo isolado de cobaia In: POTIGUARA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B. (Org) **Priprioca um recurso aromático do Pará** Belém: MPEG, UEPA, 2008.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. G. B.; VILHENA, M. S. S. Atividade alelopática do óleo essencial e extratos dos tubérculos de *Cyperus articulatus* L. In: POTIGUARA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B. (Org) **Priprioca um recurso aromático do Pará** Belém: MPEG, UEPA, 2008.

SRIVASTAVA, B., SHARMA, B. K.; BAGHEL, S.; YASHWANT, SETHI, N. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): a Chromatography Technique. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**, v. 2, n.1, p. 19-25, 2010.

THEBTARANONTH, C.; THEBTARANONTH, Y; WANAUPPATHAMKUL, S.; YUTHAVONG, Y Antimalarial Sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10,12-peroxycalamenene, a sesquiterpene endoperoxide **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 1995.

VIEGAS JR., C.; BOLSANI, V. Z.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a Química Medicinal moderna **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

ZOGHBI, M. G. B.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A.; VILHENA, K. S. S. Química das espécies de *Cyperus* conhecidas por Priprioca In: POTIGUARA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B. (Org) **Priprioca um recurso aromático do Pará** Belém: MPEG, UEPA, 2008.

ZOGHBI, M. G. B.; OLIVEIRA, J.; ANDRADE, E. H. A.; TRIGO, J. R.; FONSECA, R. C. M. **Varição na composição química dos óleos essenciais de *Ocimum campechianum* Mill e *O. gratissimum* L. comercializados no Pará** III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, p. 47, 8 a 10 de novembro, Capinas-SP, 2005.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida, **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

## ANEXOS

ANEXO A - Cromatograma do óleo essencial dos rizomas de piperioca extraído pela Empresa Beraca-OE1

ANEXO B - Cromatograma óleo essencial dos rizomas de piperioca extraído no laboratório P&DBIO-OE2

ANEXO C - Cromatograma do hidrolato de piperioca

ANEXO D - Cromatograma do HS-SPME do hidrolato de piperioca

ANEXO E - Cromatograma do PIR-S-HEX

ANEXO F - Cromatograma do PIR-S-HEX derivatizado

ANEXO G- Cromatograma do PIR-S-HEX-Fr1,2

ANEXO H - Cromatograma do PIR-S-HEX-Fr3

ANEXO I - Cromatograma do PIR-S-HEX-Fr4

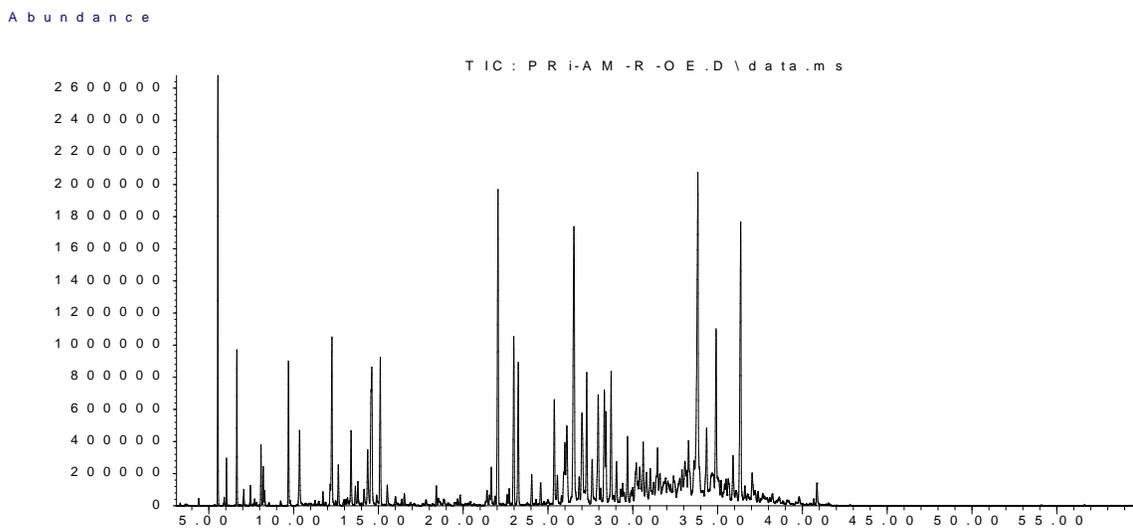
ANEXO J - Cromatograma do PIR-S-HEX-Fr5

ANEXO K: Sobreposição dos cromatogramas obtidos por meio de CG-EM e HS-SPME do hidrolato de piperioca

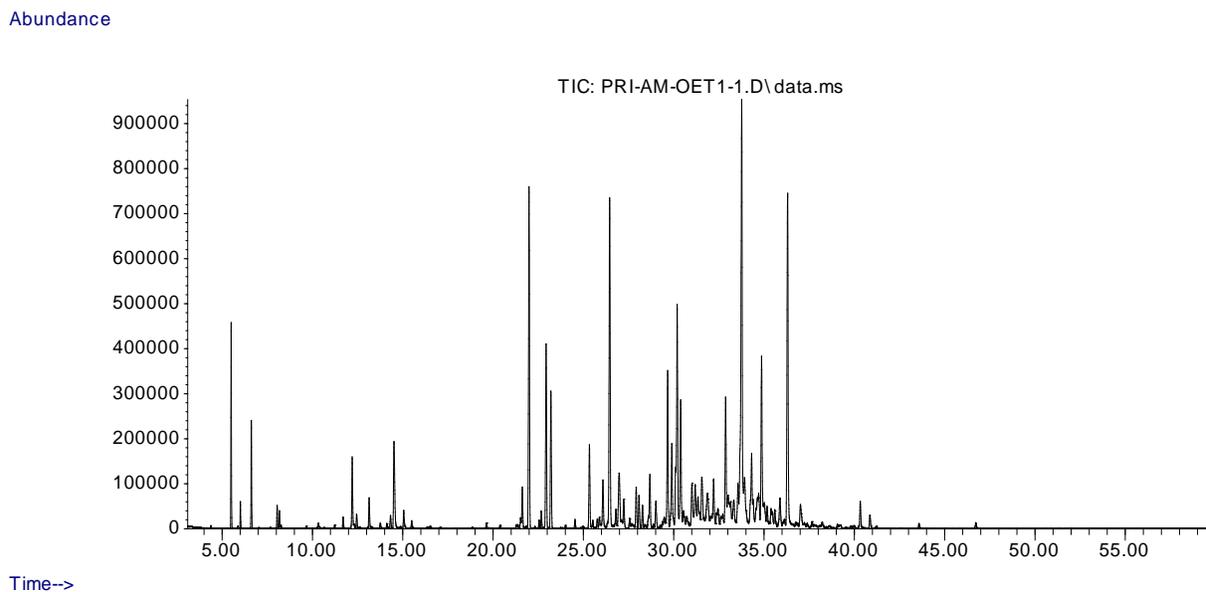
(Em preto o cromatograma obtido via CG-EM, em azul o cromatograma obtido via HS-SPME).

ANEXO L: Estruturas químicas das substâncias presentes no OE, PRI-RES e hidrolato de piperioca citadas ao longo do texto.

ANEXO M: Relatório técnico do solo da área de cultivo de piperioca em Santarém-PA

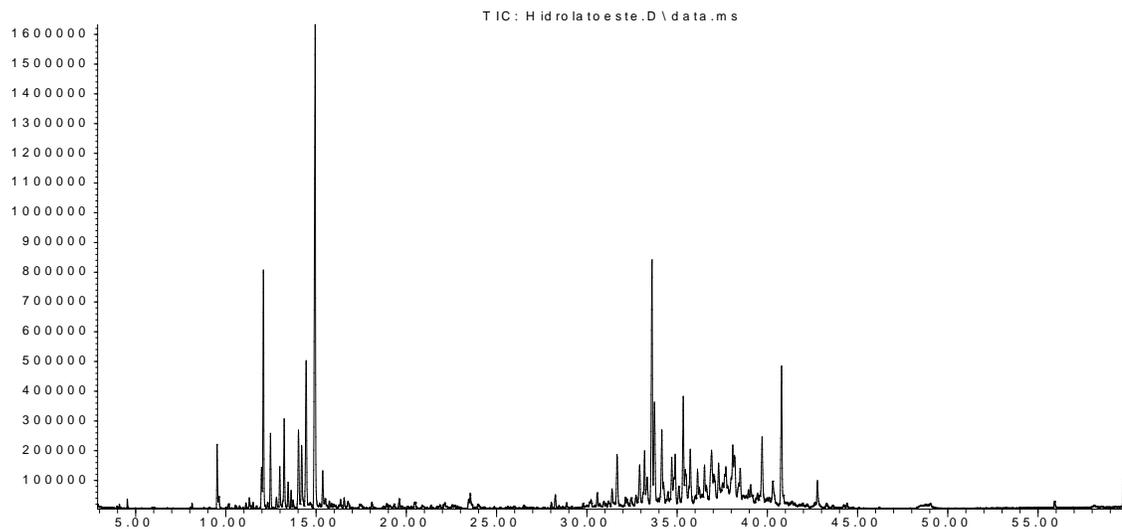


**ANEXO A:** Cromatograma do óleo essencial dos rizomas de pripiroca extraído pela Empresa Beraca-OE1

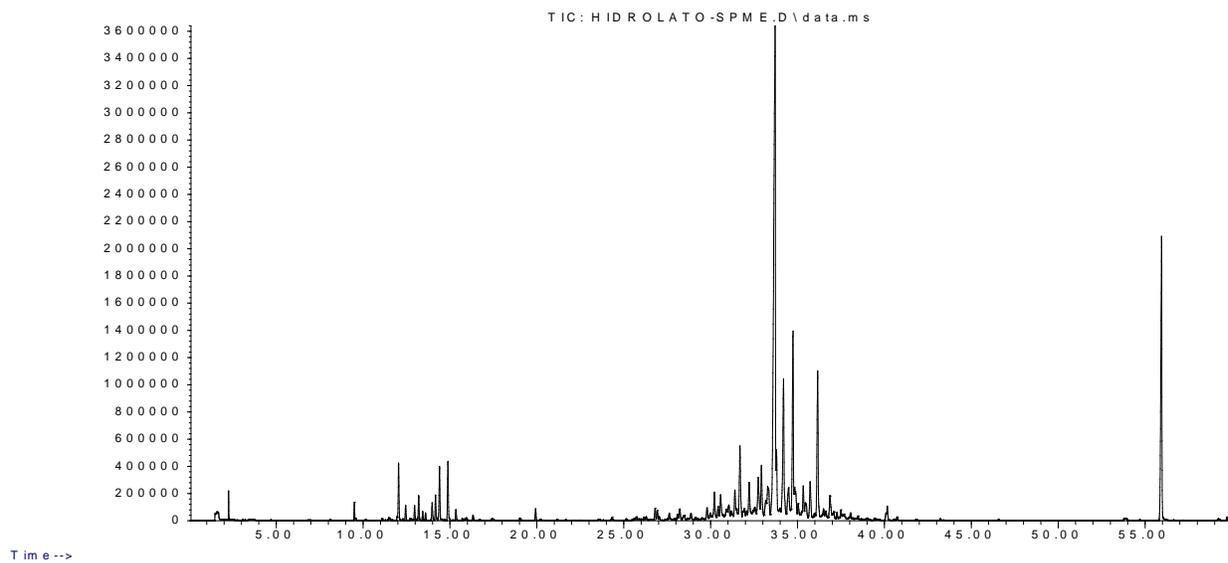


**ANEXO B:** Cromatograma óleo essencial dos rizomas de pripiroca extraído no laboratório P&DBIO – OE2

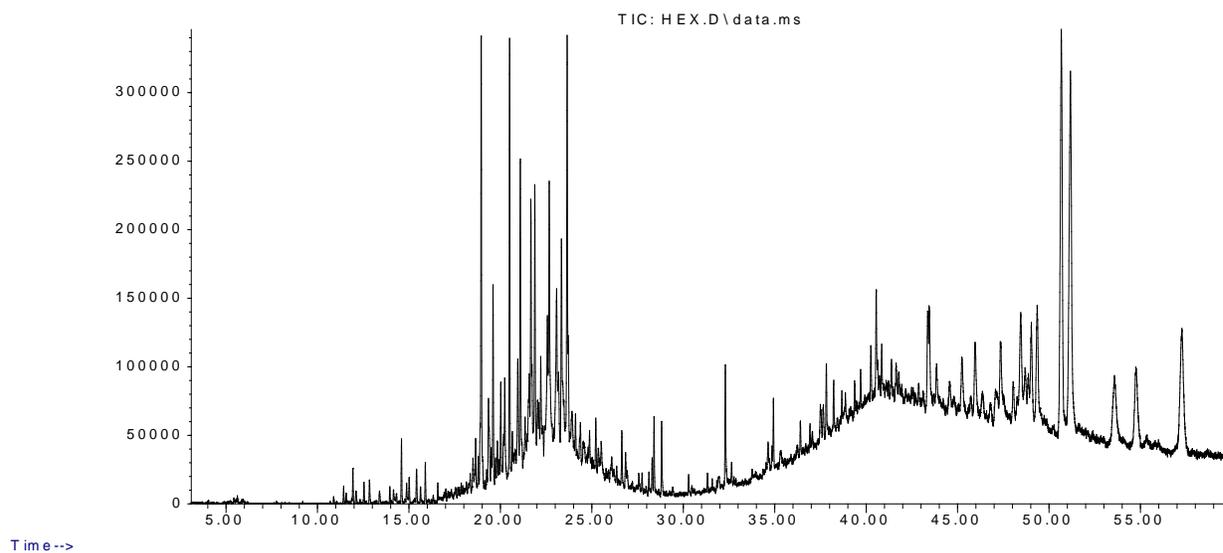
Abundance

**ANEXO C: Cromatograma do hidrolato de pripioca**

Abundance

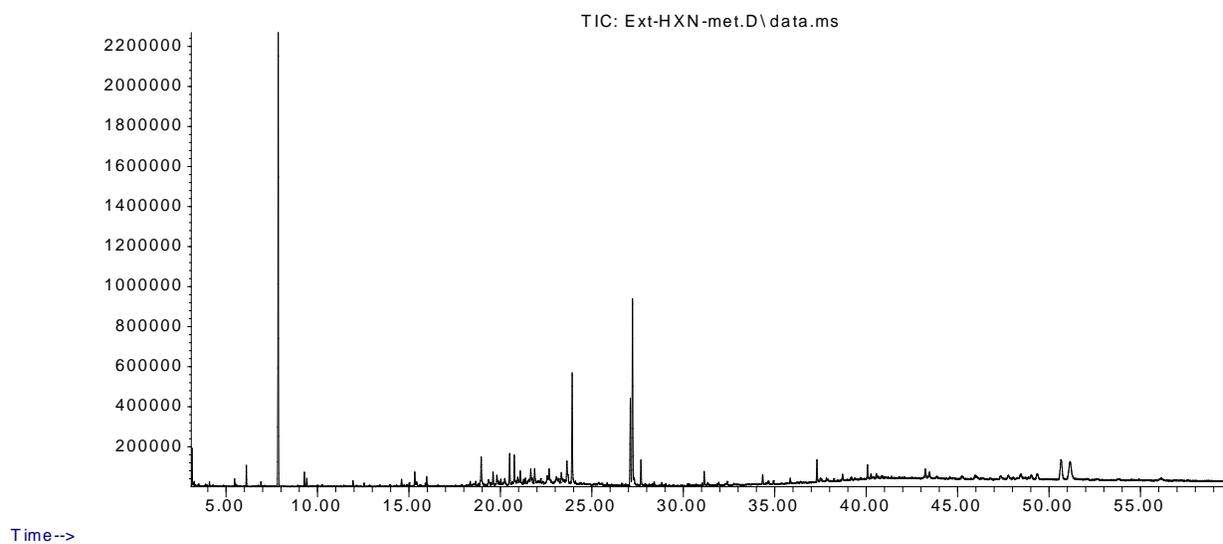
**ANEXO D: Cromatograma do HS-SPME do hidrolato de pripioca**

Abundance



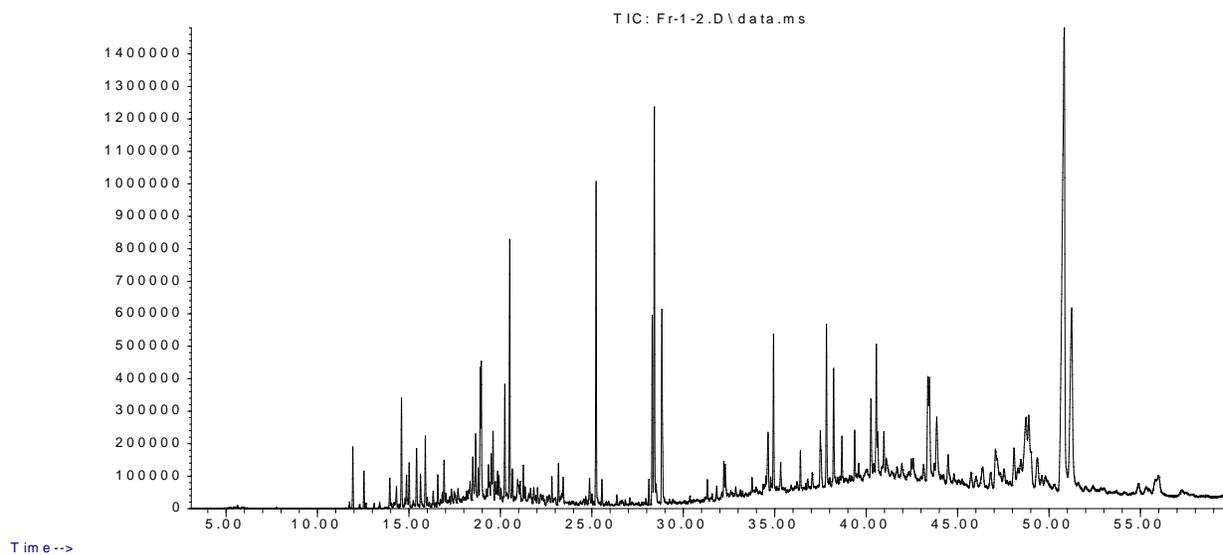
ANEXO E: Cromatograma do PIR-S-HEX

Abundance



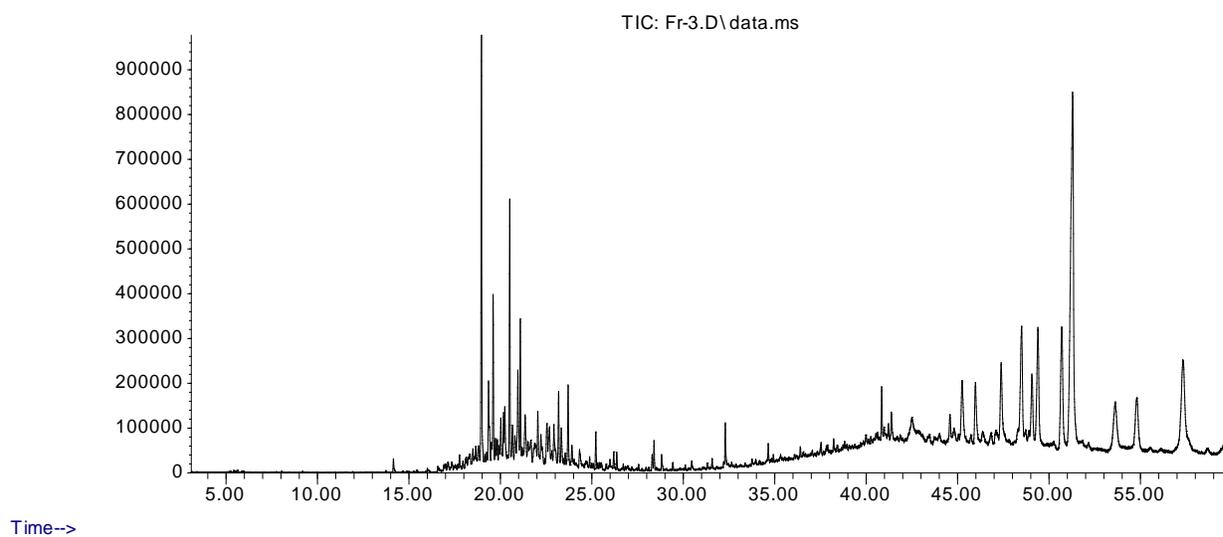
ANEXO F: Cromatograma do PIR-S-HEX derivatizado

Abundance

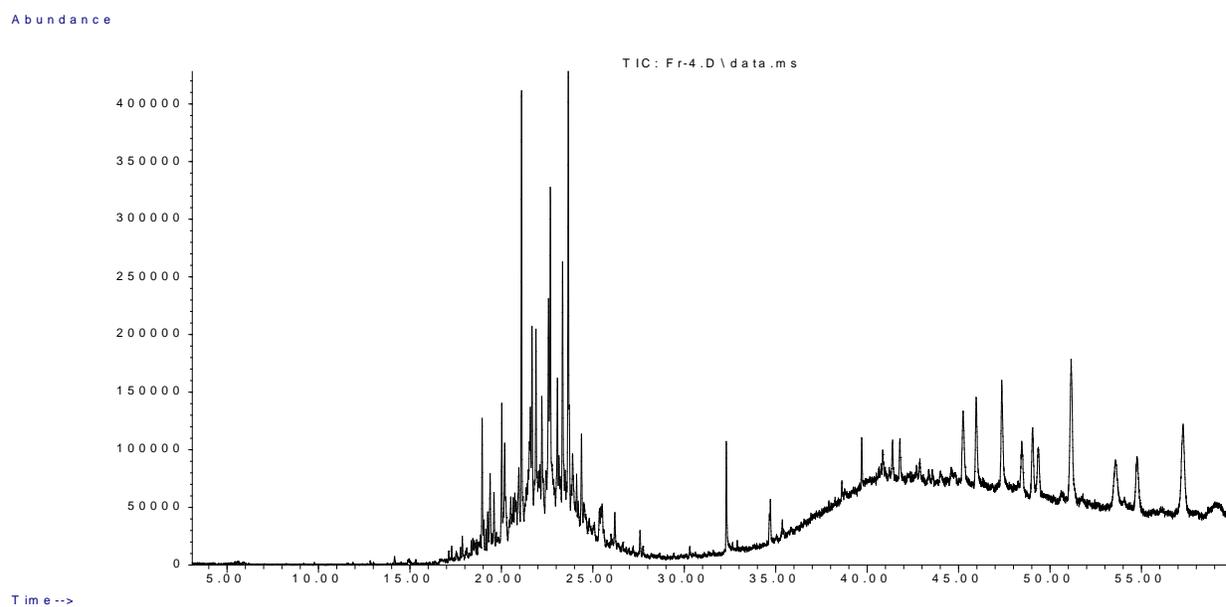
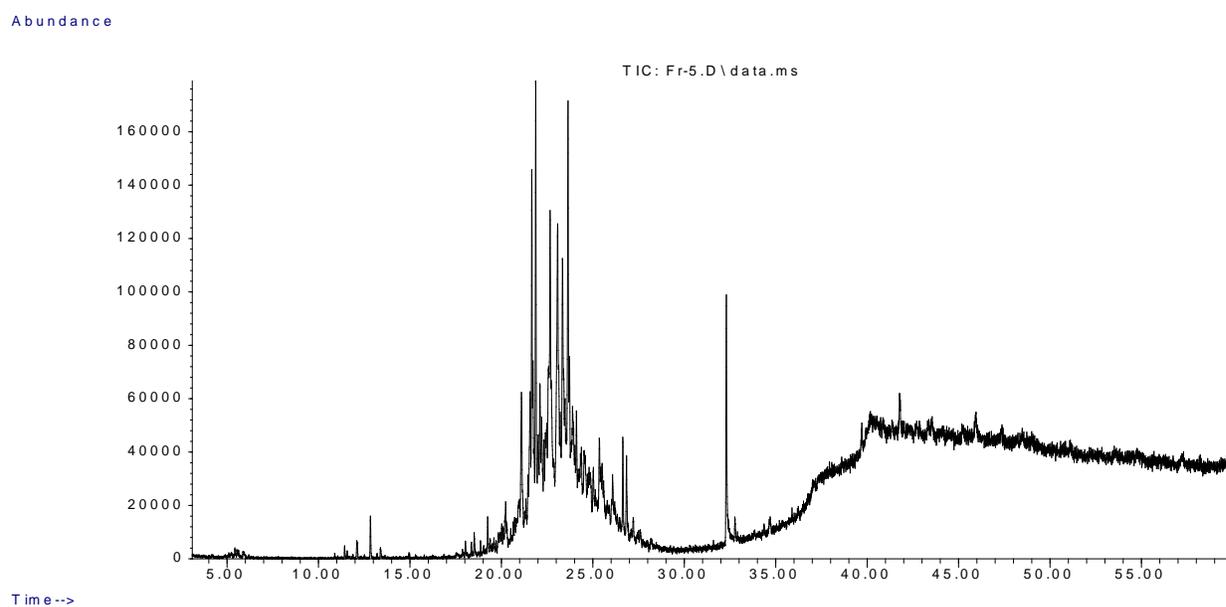


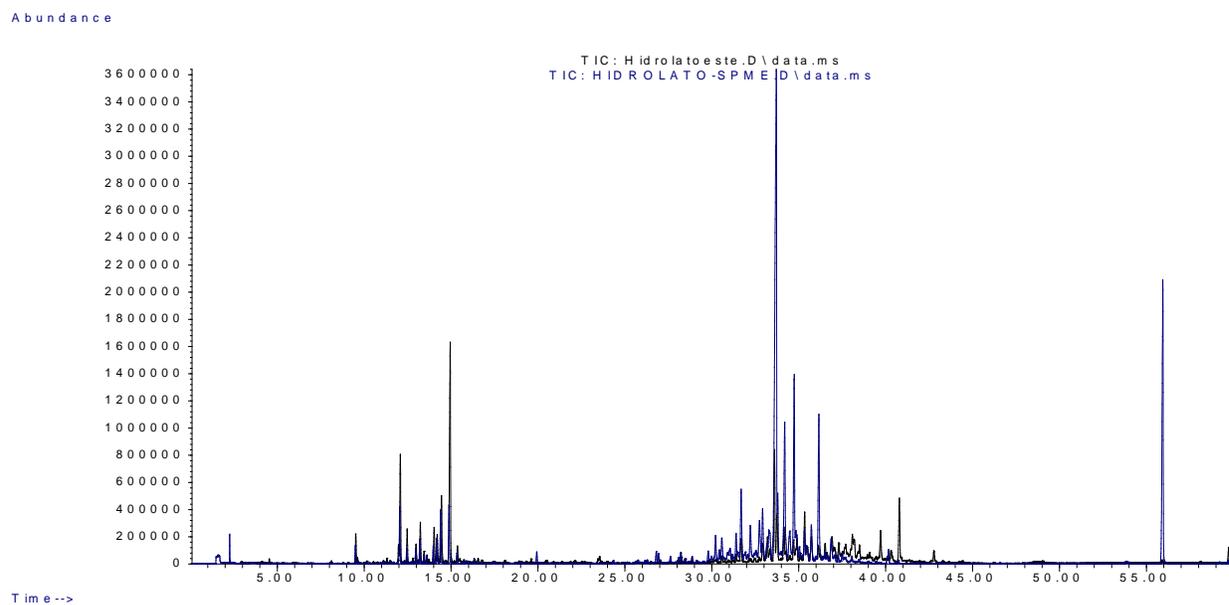
ANEXO G: Cromatograma do PIR-S-HEX-Fr1,2

Abundance



ANEXO H: Cromatograma do PIR-S-HEX-Fr3

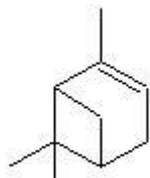
**ANEXO I: Cromatograma do PRIr-S-HEX-Fr4****ANEXO J: Cromatograma do PRIr-S-HEX-Fr5**



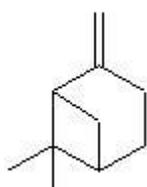
**ANEXO K:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por meio de CG-EM e HS-SPME do hidrolato de priprioica (Em preto o cromatograma obtido via CG-EM, em azul o cromatograma obtido via HS-SPME).

**ANEXO L:** Estruturas químicas das substâncias presentes no OE, PRI-RES e hidrolato de priproica citadas ao longo do texto.

### Monoterpenos



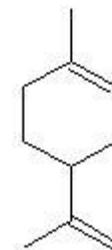
$\alpha$ -pineno



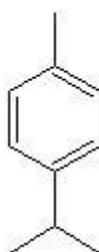
$\beta$ -pineno



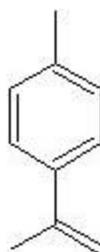
tuja-2,4(10)-dieno



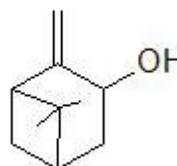
limoneno



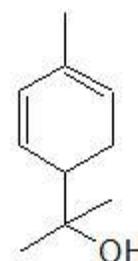
$\rho$ -cimeno



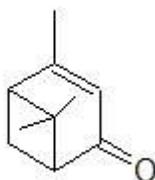
$\rho$ -cimeneno



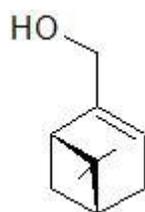
*trans*-pinocarveol



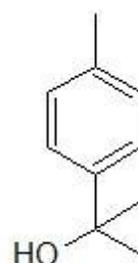
$\rho$ -menta-1,5-dien-8-ol



verbenona

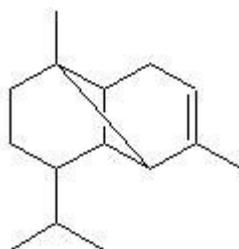


mirtenol

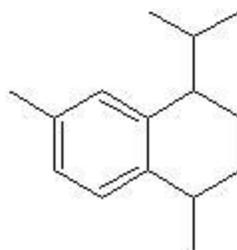


$\rho$ -cinem-8-ol

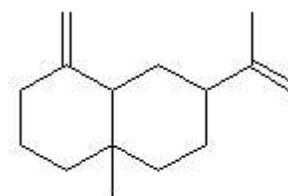
### Sesquiterpenos



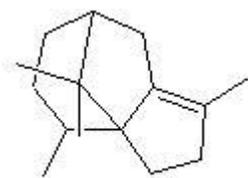
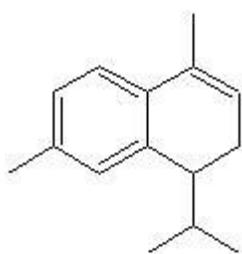
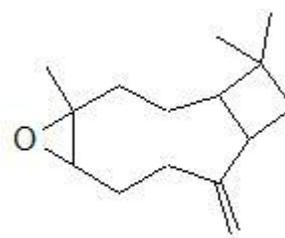
$\alpha$ -copaeno



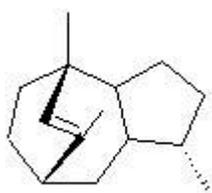
*trans*-calameneno



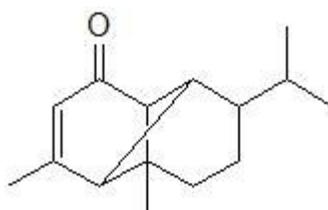
$\beta$ -selineno

 $\alpha$ -copaeno $\alpha$ -calacoreno

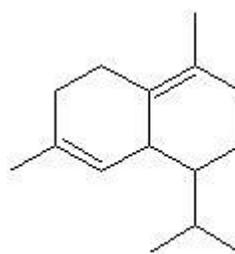
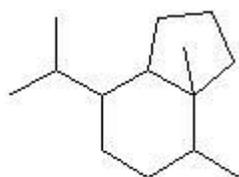
óxido de cariofileno



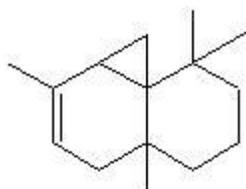
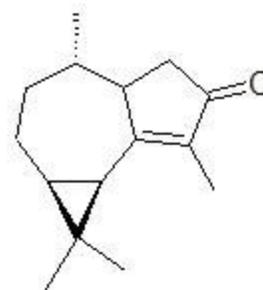
rotundeno



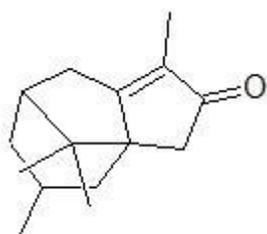
mustacona

 $\delta$ -cadineno

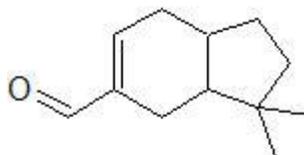
ciclosativeno

*cis*-tujopseno

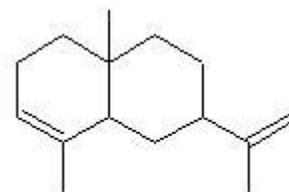
ciccolorenona

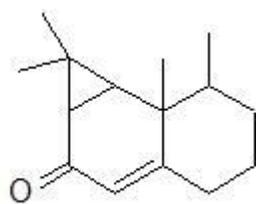


ciperotundona

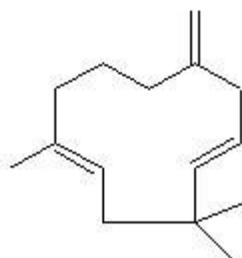
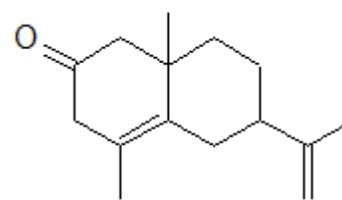


mirtenal

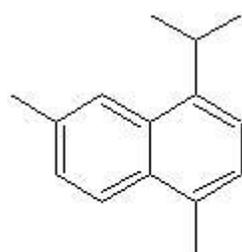
 $\alpha$ -selineno



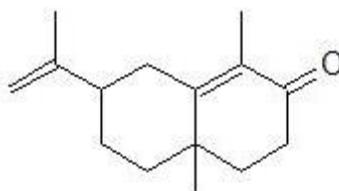
aristolona

 $\beta$ -humuleno

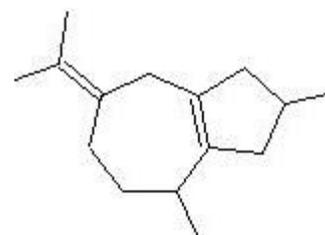
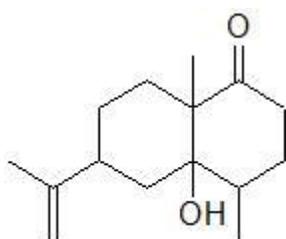
naftalenona



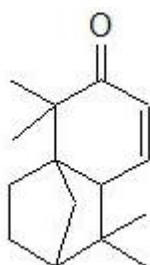
cadaleno



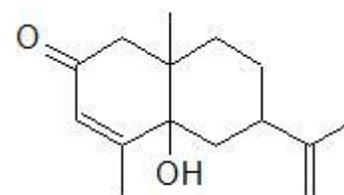
isoprenil naftalenona

 $\beta$ -guaieno

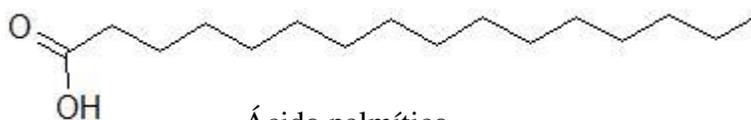
corimbolona



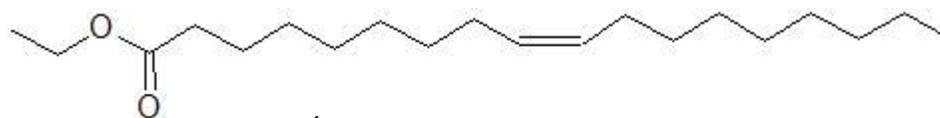
tetrametiltricicoundecenona

 $\beta$ -rotunol

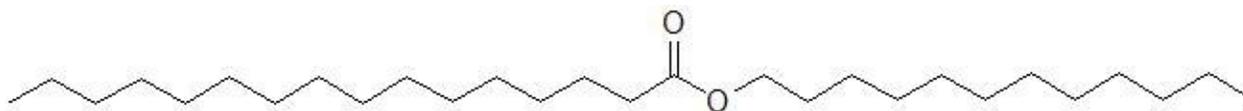
## Ácidos Graxos



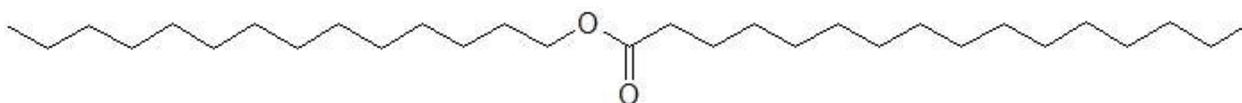
Ácido palmítico



Éster etílico do ácido oleico



Dodecil palmitato



éster tetradecil do ácido palmítico



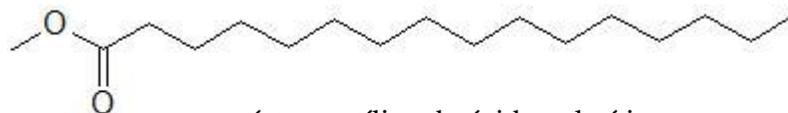
éster etílico do ácido eicosanoico



éster metílico do ácido láurico



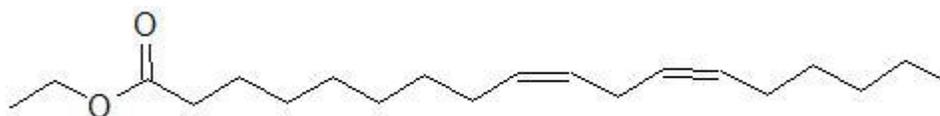
metil tetradecanoato



éster metílico do ácido palmítico



éster metílico do ácido octadienoico



éster etílico do ácido linoleico



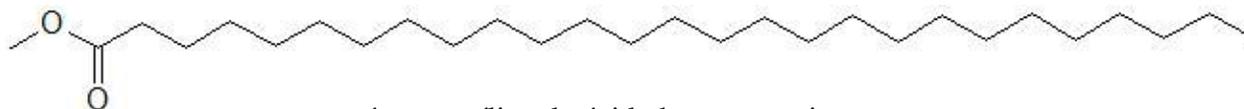
metil eicosanoato



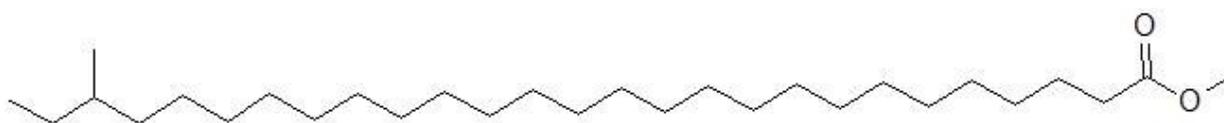
éster metílico do ácido docosanoico



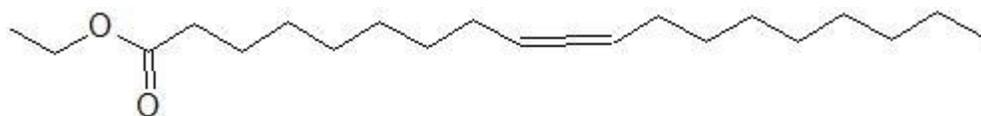
éster metílico do ácido tetracosanoico



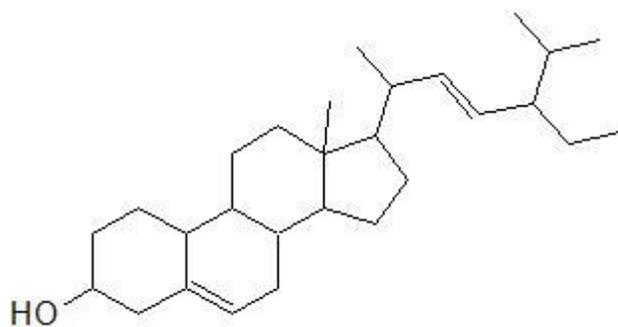
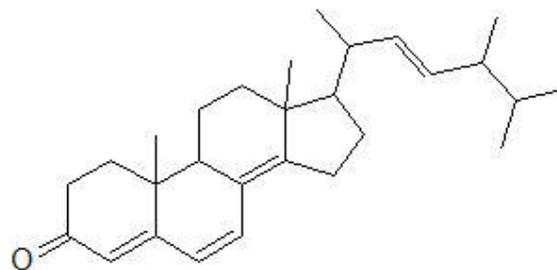
éster metílico do ácido hexacosanoico



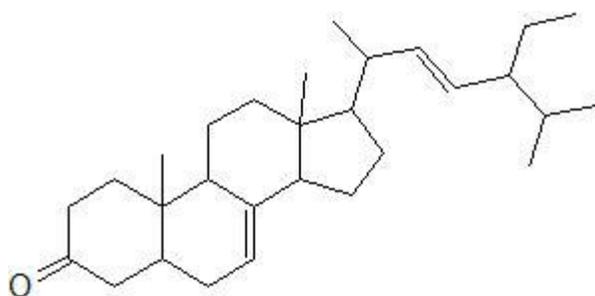
éster metílico do ácido 25-metil-heptacosanoico



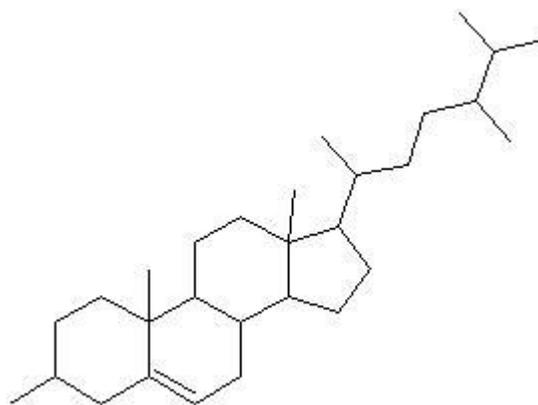
éster etílico do ácido oleico

**Esteroides** $\beta$ -estigmasterol

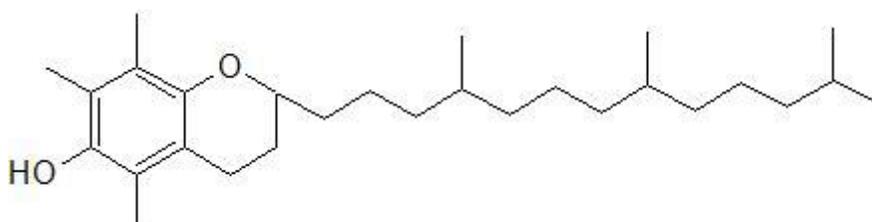
ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one



espinasterona



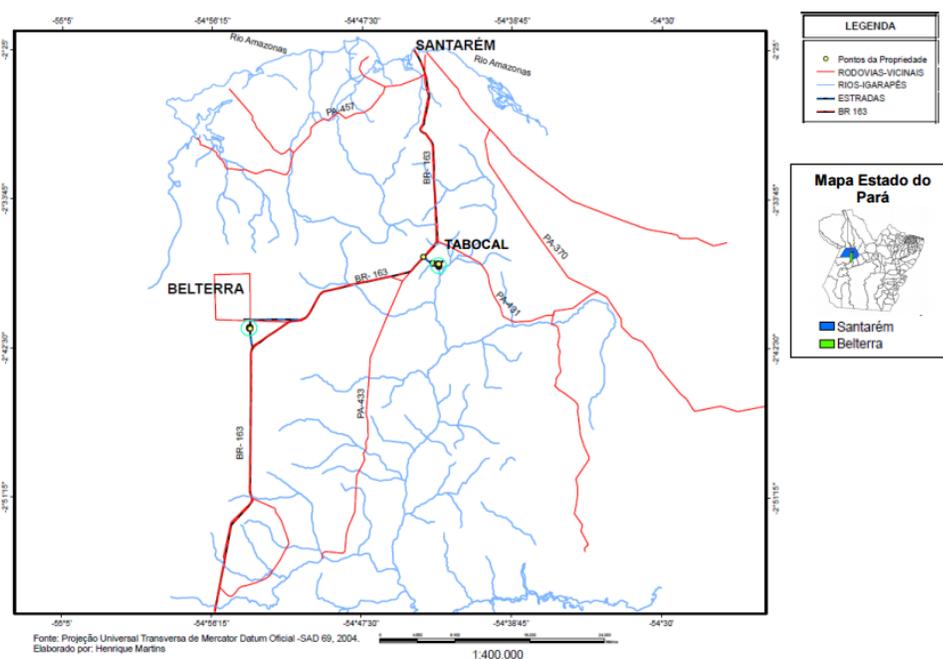
campestanol

**Tocoferol**

vitamina E

**ANEXO M: Relatório técnico do solo da área de cultivo de pripioca em Santarém-PA realizado pelo Pos-doutorando Michelly Rios Arévalo**

A coleta dos rizomas de pripioca (*Cyperus articulatus* var. *nodosus*) utilizadas neste estudo foi realizada na comunidade Tabocal, BR-163, km 23, adentrando cerca de 3 km no ramal da Terra Preta, município de Santarém-PA (-54.71.7102 e -2.62.8533) (Fi. 1).



**Figura 1:** Localização da área de cultivo de pripioca Tabocal 01, localizada em Santarém-PA.

**Fonte:** Arquivos pessoais de Michelli Rios Arévalo.

Foram realizadas a análise granulométrica (Tab 1) análise da composição química e de macro e micronutrientes (Tab 2 e Tab 3).

**Tabela 1:** Análise granulométrica do solo da área experimental Tabocal 01

Identificação	Prof. cm	Granulometria (g/kg)				Determinação da Umidade %
		Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila total	
Solo arenoso 1	0-20	110	359	332	200	5,1

**Tabela 2:** Análise de solo da área experimental Tabocal 01 de cultivo de pirioca

<i>Amostras</i>	Prof. (cm)	pH	N	MO	P	K	Na	Ca	Ca+Mg	Al	H+Al
		água	%	g/kg	-----mg/dm <sup>3</sup> -----			----cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> ----			
Solo arenoso 1	0-20	5,0	0,15	4,60	4	31	21	1,7	2,3	0,4	3,14

**Tabela 03:** Disponibilidade de micronutrientes, cátions trocáveis e saturação por bases

<i>Amostras</i>	Cu	Mn	Fe	Zn	C/C TOTAL	CTC EFETIVA	V
	cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup>					cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup>	%
Solo arenoso 1	2,3	10,1	87,2	0,1	5,61	2,87	44,04