



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LUCIANA CHAVES HOLANDA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO VEGETAL
DA SEMENTE DA ESPÉCIE *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.

Boa Vista, RR
2016

LUCIANA CHAVES HOLANDA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO
VEGETAL DA SEMENTE DA ESPÉCIE *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Ambiental.

Orientador: Dr. Antonio Alves de Melo Filho

Boa Vista, RR
2016

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

H722c Holanda, Luciana Chaves.
Caracterização química e atividades biológicas do óleo vegetal da semente da espécie *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. / Luciana Chaves Holanda. – Boa Vista, 2016.
58f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Química.

1 – Ácidos graxos. 2 – Bioensaios. 3 – Murici-rasteiro. 4 – Sementes. 5 – Propriedades físico-químicas. I – Título. II – Melo Filho, Antônio Alves de (orientador).

CDU – 547.913

LUCIANA CHAVES HOLANDA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO VEGETAL
DA SEMENTE DA ESPÉCIE *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.

Dissertação apresentada como pré-requisito para a conclusão do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Química Ambiental. Defendida em 04 de fevereiro de 2016 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Alves de Melo Filho
Orientador / Curso de Química - UFRR

Prof.^a. Dr.^a. Simone Rodrigues Silva
Curso de Química - UFRR

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Curso de Química - UFRR

*Esta dissertação é dedicada à minha família:
À minha mãe Edilva
Ao meu pai Luis
À minha irmã Antonia e meu irmão Wallyson
À minha sobrinha Michelly e meu sobrinho Davi*

AGRADECIMENTOS

A Deus razão de todas as coisas existirem, que nunca deixou com que minha fé nele se findasse, pois sempre é meu socorro presente em todas as adversidades.

A minha família por toda a atenção, apoio e paciência nessa fase da minha vida.

Ao meu orientador por toda orientação, essencial para realização dessa pesquisa.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Aos professores da PPGQ pela colaboração e conhecimento compartilhado.

A professora Jackeline Takahashi pela parceria de ter nos recebido e dado o suporte e orientação necessárias para a realização dos Bioensaios.

A professora Vanny Ferraz pela parceria de ter ajudado na realização da análise de CG-FID.

Ao colegas do Grupo Oleoquímicos: Larissa, Diana Maruja, Diógenes, Dona Cristina, Sirley, Anne, Seu Pedro e Ricardo.

Ao meu colega Thiago por ter ajudado na coleta das amostras de murici-rasteiro (*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.).

A colega de mestrado Welida por ter me ajudado a desenhar as estruturas dos ácidos graxos.

A minha amiga Thalita Lucena e Wesllen Souza pelo apoio e suporte na correção e crítica na escrita da dissertação.

A minha amiga Thaís Smith e ao Teacher Fredy por ter me auxiliado na correção do abstract.

Aos demais que não foram citados, mas que participaram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Mas quanto a mim eu buscarei a Deus, e a ele dirigirei a minha fala.

Ele faz coisas tão grandiosas que, que se não podem esquadrinhar; e tantas maravilhas, que se não podem contar.

Ele dá a chuva sobre a terra, e envia águas sobre os campos.

Para pôr os abatidos num lugar alto, e para que os enlutados se exaltem na salvação.

Ele aniquila as imaginações dos astutos, para que as suas mãos não possam levar coisas alguma a efeito.

Ele apanha o sábio na sua própria sabedoria, e o conselho dos perversos se precipita.

Eles de dia encontram as trevas, e ao meio dia andam como é de noite, às apalpadelas.

Mas ao necessitado livra da espada da sua boca, e da mão forte.

Assim há esperança para o pobre; e a iniquidade tapa a sua própria boca

Eis que bem-aventurado é o homem a quem Deus castiga; não desprezes o castigo do Todo-Poderoso.

Porque ele faz a chaga, e ele mesmo a liga; ele fere, e as suas mãos curam.

O livro de Jó. Cap. 5, v. 8-18

Nada temerei porque Jesus é meu Herói.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies de murici: <i>B. crassifolia</i> (A), <i>B. coccolobifolia</i> (B) e <i>B. verbascifolia</i> (L.) DC. (C).....	15
Figura 2 - Folhas e flores (A) e folhas e fruto (B) do murici-rasteiro (<i>B. verbascifolia</i> (L.) DC)	17
Figura 3 - Formação da molécula de triglicerídeo.....	18
Figura 4 - Estrutura de um ácido graxo saturado (A) e insaturado (B).....	18
Figura 5 - Estrutura dos AGS presentes na alimentação.....	19
Figura 6 - Estrutura dos AGI considerados essenciais.....	19
Figura 7 - Reação de transesterificação de triglicerídeo.....	25
Figura 8 - Fluxograma das atividades experimentais realizadas neste trabalho de pesquisa	27
Figura 9 - Espectro genérico de um óleo vegetal.....	28
Figura 10 - Composição de murici-rasteiro: polpa (A), semente (B) e óleo vegetal (C).....	38
Figura 11 - Estrutura dos AGS presentes no óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro.....	40
Figura 12 - Estrutura dos AGI presentes no óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro.....	41
Figura 13 - Gráfico de comparação das concentrações de AGI presentes em óleo vegetal extraído de sementes.....	42
Figura 14 - Reação de saponificação de triglicerídeos.....	46
Figura 15 - Taxa de mortalidade de <i>Artemia salina</i> em função da concentração do óleo vegetal de murici-rasteiro.....	48

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Energia, macronutrientes e fibras na composição de 100g da parte comestível de murici.....	16
Tabela 2 - Formulações de medicamentos que contém ácidos graxos.....	21
Tabela 3 - Composição dos elementos de 100 frutos de murici-rasteiro.....	38
Tabela 4 - Comparação do rendimento do óleo extraído das sementes de espécies de murici.....	38
Tabela 5 - Composição dos ácidos graxos majoritários presentes no óleo das sementes de murici-rasteiro e outros óleos vegetais da literatura por CG-FID.....	39
Tabela 6 - Composição química dos AGI (linolênico, linoleico e oleico) por CG-FID e RMN ¹ H e outros óleos vegetais da literatura.....	43
Tabela 7 - Características físico-químicas do óleo das sementes de murici-rasteiro por RMN ¹ H e outros óleos vegetais da literatura.....	44
Tabela 8 - Bioensaio de MIC para avaliação da inibição do crescimento de bactérias.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AGE	Ácidos Graxos Essenciais
AGI	Ácidos Graxos Insaturados
AGS	Ácidos Graxos Saturados
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ATChI	Iodeto de Acetilcolina
ATCI	Ácido Tricloroisocianúrico
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grau Celsius
CCl ₄	Tetracloroeto de Carbono (Clorofórmio)
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG-FID	Cromatografia Gasosa por Ionização de Chamas
CL ₅₀	Concentração Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	5',5-dithio-bis-2-nitrobenzoate
δ	Delta (deslocamento químico)
E _{ω3}	Hidrogênios alílicos externo do ácido graxo Linolênico
E _{ω6}	Hidrogênios alílicos externo do ácido graxo Linoleico
E _{ω9}	Hidrogênios alílicos externo do ácido graxo Oleico
g	Grama
G _{ω3}	Hidrogênios alílicos internos do ácido graxo Linolênico
G _{ω6}	Hidrogênios alílicos internos do ácido graxo Linoleico
HCl	Cloroeto de Hidrogênio (Ácido Clorídrico)
Hz	Hertz
I ₂	Iodo
IA	Índice de Acidez
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
II	Índice de Iodo
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
IS	Índice de Saponificação
kcal	Quilocaloria
KOH	Hidróxido de Potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Metro
mcg	macrograma
mg	Miligrama
mm	Milímetro
MM	Massa molecular
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto

mHz	Mega-hertz
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MIC	Concentração Inibitória Mínima
μL	Microlitro
μg	Micrograma
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Magnésio hidratado
nm	Nanometro
NaCl	Cloreto de Sódio
Na_2CO_3	Carbonato de Sódio
ppm	Parte por milhão
pH	Potencial Hidrogeniônico
Q_1	Estimativa de ácidos graxos insaturados
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H Hidrogênio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
$R_{o,a}$	Relação de hidrogênios oleofínicos/alifáticos
$R_{G\omega 3/I+J}$	Relação de hidrogênios metilênicos dos ácidos linolênico
$R_{E\omega 3/I+J}$	Relação de hidrogênios alílicos internos dos ácidos linolênico
$R_{E\omega 6/I+J}$	Relação de hidrogênios alílicos internos dos ácidos linoleico
SNC	Sistema Nervoso Central
TMS	Trimetilsilano
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
W	Volts
ω -3	Ômega 3
ω -6	Ômega 6
ω -9	Ômega 9

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	GÊNERO <i>Byrsonima</i>	15
1.2	MURICI.....	15
1.2.1	<i>Byrsonima verbascifolia</i> (L.) DC.....	17
1.3	SEMENTES.....	18
1.4	ÓLEOS VEGETAIS.....	19
1.4.1	Aplicações dos óleos vegetais.....	21
1.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>in vitro</i>	22
1.5.1	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	22
1.5.2	Inibição da Enzima Acetilcolinesterase.....	23
1.5.3	Ensaio de Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	27
3.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO VEGETAL.....	27
3.2.1	Secagem das amostras.....	27
3.2.2	Extração de óleo vegetal pelo método Soxhlet.....	27
3.3	ANÁLISES ESPECTOMÉTRICAS.....	28
3.3.1	Cromatografia Gasosa.....	28
3.3.2	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	28
3.3.2.1	Análises de óleo vegetal por RMN ¹ H.....	28
3.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	33
3.4.1	Atividade Antibacteriana.....	33
3.4.2	Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	35
3.4.3	Teste de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1	COMPOSIÇÃO DOS ELEMENTOS DOS FRUTOS DE MURICI-RASTEIRO.....	38
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO VEGETAL DAS SEMENTES DE MURICI-RASTEIRO.....	39
4.2.1	Cromatografia Gasosa.....	39
4.2.2	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	42
4.2.3	Composição de ácidos graxos por CG-FID e RMN ¹ H.....	43
4.3	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS POR RMN ¹ H.....	44
4.3.1	Índice de Iodo (II).....	44
4.3.2	Índice de Acidez (IA).....	45
4.3.3	Relação de hidrogênios oleofínicos/alifáticos (R _{o,a}).....	45
4.3.4	Índice de Saponificação (IS) e Massa Molecular Média (MM).....	46
4.3.5	Estimativa do teor de ácidos graxos insaturados (Q ₁).....	46
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	47
4.4.1	Atividade Antibacteriana.....	47
4.4.2	Atividade de Inibição da Enzima acetilcolinesterase.....	48
4.4.3	Ensaio de toxicidade frente á <i>Artemia salina</i>	48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

O murici-rasteiro (*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.) pertence ao gênero *Byrsonima* da família Malpighiaceae. Essa espécie apresenta baixo crescimento vegetativo e é facilmente camuflado por outras espécies de vegetação. Em Roraima pode ser encontrada em regiões de savanas caracterizado pela presença de espécies sub-arbustivas como é o caso do murici-rasteiro.

Em Roraima as espécies de murici são encontradas em diversas áreas por serem plantas facilmente adaptadas a qualquer região de clima tropical, como é o caso de Roraima. Tais espécies são muito apreciadas para consumo *in natura*, e também na fabricação de sucos, sorvetes, picolés, geleias, pavês e pudins (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). O processamento de frutas em indústrias geram resíduos orgânicos que poderiam ser utilizadas como matéria-prima para a obtenção de materiais como elevada aplicação industrial.

As sementes são um dos resíduos mais gerados no processamento de frutas. Segundo Ávila (2012) a extração de óleo vegetal de sementes cabe ao conceito de sustentabilidade, pois diminui o desperdício e pode agregar valor a um subproduto até então descartado, como fonte de óleo vegetal. Entre as principais aplicações dos óleos vegetais estão nas indústrias de alimentícia, cosmética, farmacêutica e produção de biodiesel.

A escolha do tema se deu a partir dos baixos dados científicos sobre a espécie de murici-rasteiro (*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.) e sobre os poucos estudos realizados sobre sementes, pois as sementes podem ser consideradas uma fonte de matéria-prima de baixo custo para a obtenção de óleo vegetal rico em ácidos graxos insaturados essenciais para a dieta humana e com atividade biológica, aumentando as fontes viáveis de matéria prima em benefício à saúde humana.

O óleo vegetal obtido a partir das sementes de murici-rasteiro foi analisado pela técnica de RMN ¹H que qualificou e quantificou ácidos graxos insaturados além de obter as propriedades físico-químicas, e através da técnica realizada por CG-FID foi qualificado e quantificado os ácidos graxos majoritários com maior precisão. Com o óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro foi realizado o bioensaio de MIC para avaliação do seu potencial antibacteriano, o bioensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase pelo método espectrofotométrico de Ellman, além da avaliação da atividade de toxicidade utilizando o método da *Artemia salina*.

1.1 GÊNERO *Byrsonima*

O gênero *Byrsonima* é um dos gêneros da família Malpighiaceae de maior destaque, sendo utilizada como plantas ornamentais e seus frutos comestíveis (JUDD et al., 2002; RIBEIRO, et al., 1999). Podem ser encontradas mais de 150 espécies em um território que se estende desde o México até toda a América do Sul. Sua principal ocorrência de dar nas regiões de savanas, cerrados, florestas e restingas. A distinção das espécies desse gênero ocorre pela cor dos frutos e o local de ocorrência de cada planta (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; MARINHO, 2008).

Segundo Guilhon-Simplicio e Pereira (2011), o gênero *Byrsonima* tem mostrado resultados promissores quanto a sua ação contra microorganismos. Seus constituintes (folhas, caule, frutos) são ricos em compostos antioxidantes e anti-inflamatórios, sendo ainda usados na medicina popular para fins antiasmáticos, febre e infecções da pele (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; SANNOMIYA et al., 2007). São ricos em flavonoides, triterpenos, esteróides e catequinas (SANNOMIYA et al., 2005).

Estudos demonstram que extratos polares das folhas da espécie *Byrsonima crassa* apresentaram resultados relevantes quanto ao efeito farmacológico no sistema gastrointestinal devido à presença de catequinas e flavonóides (FIGUEIREDO et al., 2005). Foram ainda constatada a presença de substâncias com atividade antimicrobianas (MARTINEZ-VÁZQUES et al., 1999), atividade anti-inflamatória (MALDINI et al., 2009) e metabólitos com atividade anti-úlceras (FIGUEIREDO et al., 2005).

Através do estudo dos extratos hexânicos das sementes da espécie *Byrsonima crassifolia* verificou-se a existência de compostos com atividade antimicrobiana (MUÑIZ-RAMIRES et al., 2014). A casca do fruto da espécie *Byrsonima verbascifolia* Rich ex A. Juss é rica em taninos e é muito utilizada popularmente como cicatrizante e anti-inflamatório, devida a sua elevada adstringência e o chá da casca do caule é considerado antifebril (GUSMÃO; VIEIRA; JUNIOR FONSECA, 2006; RODRIGUES; CARVALHO, 2001), o chá da casca do caule apresenta atividade sobre as enfermidades de diarreia e disenterias (GUSMÃO; VIEIRA; JUNIOR FONSECA, 2006).

1.2 MURICI

Denominado popularmente como murici, o muricizeiro é uma planta originária do Brasil e está distribuída geograficamente por toda a região amazônica, estendendo-se pela América Central e Caribe (FERREIRA, 2005). É uma árvore típica de regiões de cerrado,

podendo ser encontrada também na mata atlântica (FERREIRA, 2005; GARRITANO; JORGE; GULIAS, 2006). O murici possui diversas espécies, onde no Brasil as mais comuns são o *Byrsonima crassifolia* que ocorre no perímetro das Guianas até a Bahia; *Byrsonima verbascifolia* que ocorre na região central e amazônica do Brasil; *Byrsonima intermedia* nativo do cerrado do Brasil (LORENZI, 1998; LORENZI; MATOS, 2002).

Os frutos de murici apresentam variedades distintas, pelo fato de ser uma árvore que ocorre em diferentes regiões do país, podendo ser diferenciados de acordo com o solo, umidade, condições climática (GUERREIRO; FURTADO; BELISÁRIO, 2012). As espécies comumente encontradas em Roraima são *B. crassifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. verbascifolia* (L.) DC. As espécies podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 - Espécies de murici: *B. crassifolia* (A), *B. coccolobifolia* (B) e *B. verbascifolia* (L.) DC. (C)



(A)

B. crassifolia



(B)

B. coccolobifolia



(C)

B. verbascifolia (L.) DC.

Segundo os dados de IBGE (2011), o murici está entre as frutas mais consumidas pela população brasileira, seja ele na forma *in natura* ou na forma de sucos, geleias, sorvetes e licores. Esta fruta evidencia ser um alimento rico em fibras e com conteúdo de carboidrato, proteína e lipídios conforme pode ser observada através da Tabela 1.

Tabela 1 - Energia, macronutrientes e fibras na composição de 100g da parte comestível de murici
MURICI

Composição	Valor nutricional
Energia (kcal)	66,00
Proteínas (g)	0,90
Lipídios (g)	1,30
Carboidratos (g)	14,40
Fibra alimentar total (g)	2,20
Retinol (mcg)	7,00
Niacina (mg)	0,40
Cálcio (mg)	33,00
Potássio (mg)	17,00
Ferro (mg)	2,00
Vitamina B1	0,02
Vitamina B2	0,04
Vitamina C	84,00

Fonte: IBGE (2011); MINISTÉRIO DA SAÚDE (2002).

1.2.1 *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC

Dentre varias espécies do gênero *Byrsonima* a espécie *B. verbascifolia* (L.) DC. foi escolhida como objeto de estudo nesse presente trabalho. Conhecida popularmente como murici-rasteiro esta espécie apresenta baixo crescimento vegetativo. Essa espécie pode ser encontrada nas regiões de savanas de “campo limpo”, ou seja, caracterizadas pela presença (ou não) de espécie sub-arbustiva (BARBOSA; MIRANDA, 2004).

Têm-se relatado que a polpa da espécie *B. verbascifolia* (L.) DC. apresenta potente atividade antioxidante (MORAIS et al., 2013). A espécie *Byrsonima verbascifolia* tem como uso etnofarmacológico as folhas, casca do caule e casca da raiz no tratamento antidiarreico, antipirético, cicatrizante, laxativo, tratamento de infecções na pele e mucosas e doença de Chagas (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Segundo Barbosa e Miranda (2005), a espécie *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. é classificada como uma subarbustiva e pode ser comumente encontrada na região de savana de Roraima, como pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 - Folhas e flores (A) e folhas e fruto (B) do murici-rasteiro (*B. verbascifolia* (L.) DC.)



(A)



(B)

Fonte: Autora.

1.3 SEMENTES

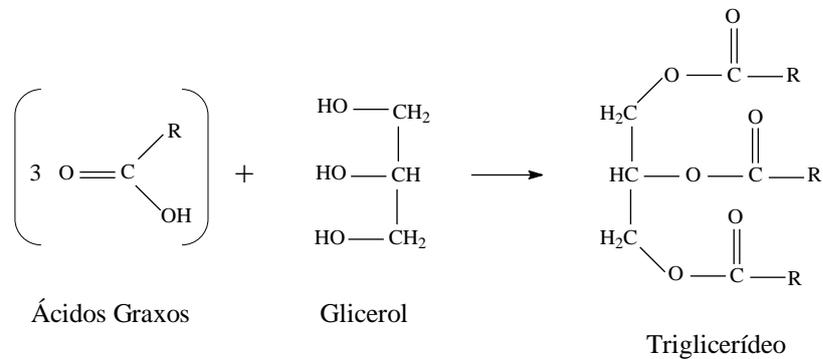
Muitos frutos comestíveis são processados para a fabricação de sucos naturais, sucos concentrados, doces em conserva, polpas e extratos, os quais possuem sementes que são muitas vezes descartadas no meio ambiente (KOBORI, JORGE; 2005). A literatura sugere que as sementes obtidas a partir do processamento industrial devem ser reaproveitadas para a produção de biofertilizantes, biogás ou produção de etanol (PERAZZINI; BITTI, 2010). As sementes podem ter uma finalidade muito benéfica ao homem e ao meio ambiente, sendo o óleo vegetal um dos principais componentes químicos presentes nas sementes (SOUZA et al., 2012). Sendo os óleos vegetais uma importante matéria-prima com amplo emprego em diversas indústrias, possuindo ainda relevantes aplicações nutricionais e farmacêuticas (MALACRIDA, 2009).

Logo, levando-se em consideração as questões ambientais e sendo as sementes uma fonte de matéria-prima de baixo custo e com elevada aplicação industrial para a produção de materiais que podem ser empregados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, produção de biodiesel. O murici-rasteiro é pouco conhecido e consumido, em consequência os estudos sobre suas sementes são inexplorados como fonte alternativa de óleo vegetal.

1.4 ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais são constituídos por 98% de triglicerídeos e 2% de fosfolipídios e outros tipos de hidrocarbonetos (TOSCANO; MALDINI, 2007). Os triglicerídeos são uma das principais gorduras da dieta humana (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007) vistos como a maneira mais eficiente de armazenar energia nos seres vivos, liberados durante o jejum, logo servem como substrato energético para o organismo (MAZZOCO; TORRES, 2010). Os triglicerídeos são produtos da condensação entre uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos como mostra a Figura 3.

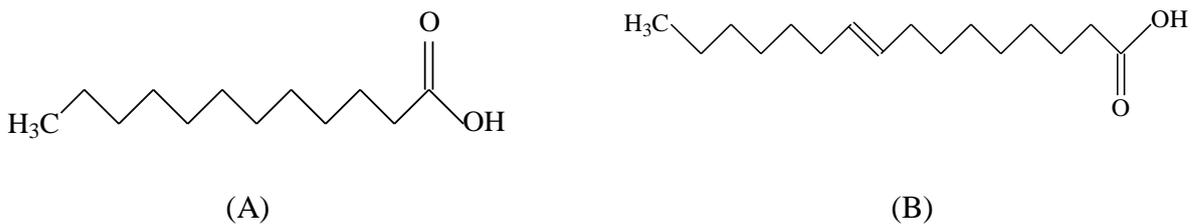
Figura 3 - Formação da molécula de triglicerídeo



Legenda: R são cadeias carbônicas dos ácidos graxos
 Fonte: Autora, desenvolvido em ChemBioDraw 12.0

As características físicas e químicas de um óleo vegetal podem variar de acordo com a composição de ácidos graxos que compõem os triglicerídeos (LIMA, 2011), assim a uma temperatura ambiente os triglicerídeos com predominância de ácidos graxos insaturados são denominados óleos, já em triglicerídeos com predominância de ácidos graxos saturados a uma temperatura ambiente são denominados gorduras por apresentar textura sólida ou pastosa (GARCIA, 2006). Os ácidos graxos podem ser insaturados ou saturados. A Figura 4 mostra a estrutura de uma molécula de ácidos graxos.

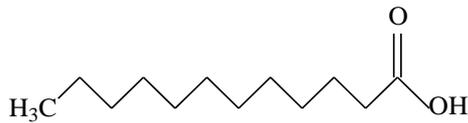
Figura 4 - Estrutura de um ácido graxo saturado (A) e insaturado (B)



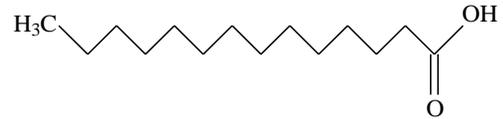
Fonte: Autora, desenvolvido em ChemBioDraw 12.0

Os AGS (ácidos graxos saturados) comumente presentes na nossa alimentação são: láurico, mirístico, palmítico e esteárico (SPOSITO et al., 2007). Na Figura 5 podemos observar as estruturas químicas desses AGS.

Figura 5 - Estrutura dos AGS presentes na alimentação



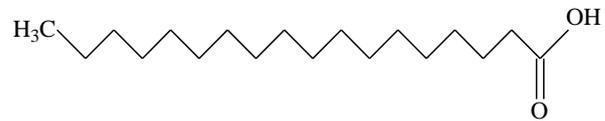
Ácido Láurico (C12:0)



Ácido Mirístico (C14:0)



Ácido Palmítico (C16:0)

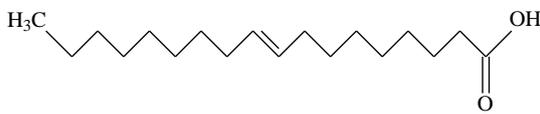


Ácido Esteárico (C18:0)

Fonte: Autora, desenvolvido em ChemBioDraw 12.0

Os ácidos linolênico e linoleico são considerados ácidos graxos essenciais, e devem ser supridos a partir da dieta (ÁVILA, 2012; SÚAREZ-MAHECHA et al., 2002). Os principais AGI (ácidos graxos insaturados) são: linolênico (ω -3), linoleico (ω -6) e oleico (ω -9). Na Figura 6 podemos observar as estruturas químicas desses AGI.

Figura 6 - Estrutura dos AGI considerados essenciais



Ácido Oleico (C18:1)



Ácido Linoleico (C18:2)



Ácido Linolênico (C18:3)

Fonte: Autora, desenvolvido em ChemBioDraw 12.0

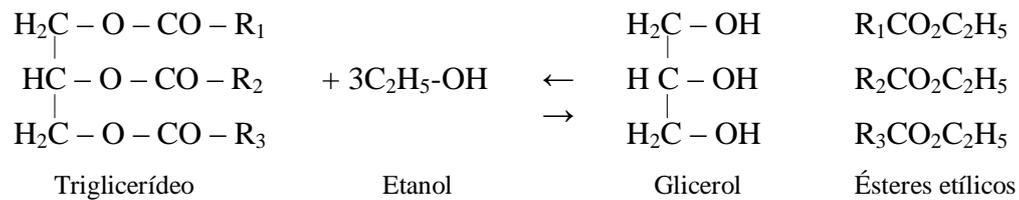
1.4.1 Aplicações dos ácidos óleos vegetais

Os ácidos graxos possuem aplicações na indústria plástica, cosmetologia, borracha, lubrificantes, indústria de couro e papel (CANGEMI; SANTOS; NETO, 2010), além do forte interesse do seu uso como biodiesel alternativo e sustentável (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

✓ Biodiesel sustentável

Muitos pesquisadores têm apostado na transesterificação de óleo vegetal como uma das fontes mais promissoras de um biodiesel renovável (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005). A produção de biodiesel a partir de óleo vegetal se dá pela transesterificação da molécula de triglicerídeo sob a catálise ácida ou básica, originando três moléculas de ésteres e glicerol (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009), como mostra a Figura 7.

Figura 7 - Reação de transesterificação de triglicerídeo



Legenda: R₁, R₂ e R₃ são cadeias carbônicas dos ácidos graxos.

Fonte: Ferrari, Oliveira e Scabio (2005).

A qualidade do biodiesel proveniente de óleo vegetal pode variar conforme a composição de ácidos graxos presentes. Tais variações se dão ao tamanho da cadeia carbônica, quantidade e posição de insaturação (LÔBO; FERREIRA, 2009).

✓ Indústria farmacêutica

Os ácidos graxos linoleico (ω -6) e linolênico (ω -3), são considerados essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano e devem ser adquiridos em dieta. Sendo essenciais, esses ácidos são importantes para funções celulares normais, pois atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (ácido araquidônicos, eicosapentaenoico, docosa-hexaenóico), e são responsáveis pelas funções celulares como fluidez das membranas, atividade enzimática e a síntese de moléculas de

eicosanoide como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002), também atuam no processo de cicatrização de feridas, pois são capazes de modificar as reações inflamatórias e imunológicas do organismo humano (MANHEZI; BACHION; PEREIRA, 2008).

No Brasil há disponível no mercado farmacêutico, medicações (pomadas) utilizadas no tratamento de feridas, genericamente, denominadas como AGE (ácidos graxos essenciais), que em suas composições contém ácidos graxos, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Formulações de medicamentos que contém ácidos graxos

Medicação	Composição
Dersani [®]	Ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido capróico, óleo de girassol (ácido linoleico), lecitina de soja, vitamina A, Vitamina E.
Sommacare [®]	Óleo de soja hidrolisado, óleo de girassol (ácido linoleico), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico.
Dermosan [®]	Ácido cáprico, ácido láurico, ácido linoleico, ácido caprílico, ácido capróico, ácido palmítico, ácido mirístico, lecitina de soja, palmitato de retinol (vitamina A) e acetato de tocoferol (vitamina E).
Curatec [®]	Ácido linoleico, ácido oleico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido esteárico, palmitato de Retinol (vitamina A), acetato de Tocoferol (vitamina E) e lecitina de soja.

Legenda: [®] marca registrada.

Fonte: Manhezi, Bachion e Pereira (2008); Ferreira et al. (2012).

Os AGE são substâncias que apresentam baixo custo para serem obtidos e são amplamente usados como cicatrizantes, pois possibilitam benefícios no processo de cicatrização: 1) O curativo úmido oleoso serve como barreira protetora contra microrganismos, evita a desidratação tecidual, mantém a temperatura corpórea e diminui os traumatismos durante a substituição dos curativos e 2) Estudos envolvendo a função dos ácidos graxos sobre células do sistema imune apresentam o importante caráter imunomodulador (HATANAKA; CURE, 2007).

1.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vitro*

1.5.1 Bactérias gram-positivas e gram-negativas

As bactérias pertencem ao reino Monera. São seres procarióticos, pois sua célula não possui núcleo. Sua reprodução ocorre por divisão binária. Os principais gêneros de bactérias são divididos em gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-positivas e gram-

negativas diferenciam-se pela membrana celular: as bactérias gram-positivas possui uma parede celular espessa, enquanto as bactérias gram-negativas possui uma parede celular mais fina.

As indústrias farmacêuticas tem mostrado interesse em novos fármacos antimicrobianos, especialmente em função da ocorrência de resistência microbiana a alguns medicamentos (SILVA, 2011). As propriedades antimicrobianos de um novo fármaco devem ser avaliadas e confirmadas inicialmente por ensaios biológicos *in vitro*. Com base nos testes *in vitro* os agentes antimicrobianos podem ser classificados como bactericidas ou bacteriostáticos. Os bactericidas matam os microrganismos, enquanto os bacteriostáticos apenas inibem o seu crescimento (VOLPATO, 2005).

As bactérias gram-negativas encontradas na forme de bacilos (em forma de bastão) *Pseudomonas aeruginosa* e *Citrobacter freundii* são bactérias resistentes a antibióticos. A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria muito resistente a muitos antibióticos (FIGUEIREDO et al., 2007), sendo considerada uma das que mais causam infecções em ambientes hospitalares (STEWART; COSTERTON, 2001). A bactéria *Citrobacter freundii* é amplamente difundido na natureza estando na terra, na água e, ocasionalmente, habita no trato gastrointestinal do homem, ou pode causar infecções gastrointestinal relacionados com a contaminação de alimentos (KACLÍKOVÁ et al., 2005).

As bactérias gram-positivas encontram-se na forma cocos (esféricos ou ovoides) *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* são bactérias que apresentam sensibilidade aos antibióticos. O *Bacillus cereus* é uma bactéria aeróbia facultativa, o consumo de alimentos que contenham uma concentração elevada dessa bactéria pode resultar em intoxicação alimentar (GOMES et al., 2004), produzindo enterotoxina, causa da síndrome emética e da síndrome diarreica (MENDES, CRUZ; DAVID, 2011). A bactéria *Listeria monocytogenes* é uma patogênico de origem alimentar que pode causar infecções humanas (JEMMI; STEPHAN, 2006), o solo e os vegetais em decomposição são os principais reservatórios dessa bactéria (BARANCELLI et al., 2011). A intoxicação causada por *Listeria monocytogenes* pode causar infecções no sistema central (SNC) como meningite e encefalite, além de infecções como endocardite, peritonite, pneumonia (FARBER; PETERKIN, 1991).

1.5.2 Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em acetato e colina (MUKHERJEE et al., 2007; MOTA, et al., 2012). Numa condição normal devemos ter uma elevada liberação de neurotransmissor

ACh para compensar a degradação da mesma pela AChE. Podemos aumentar o nível de acetilcolina aumentando a sua síntese ou inibindo a sua degradação, os tratamentos atuais envolvem a inibição da enzima acetilcolinesterase (LÓPEZ et al., 2002; ZAROTSKY; SRAMEK; CUTLER, 2003).

Inibir a enzima AChE é necessário para aumentar a atividade colinérgica do Sistema Nervoso Central, controlando os sintomas das doenças degenerativas que afetam as áreas de memória e aprendizado (FORLENZA, 2005). A doença de Alzheimer está associada com a perda de um sistema colinérgico com níveis diminuídos de acetilcolina no cérebro áreas que tratam com a aprendizagem, memória, comportamento e respostas emocionais (ANAND; SINGH; SINGH, 2012).

As doenças degenerativas causadas pela elevação dos níveis de AChE não tem cura, porém há tratamento. Os fármacos anticolinesterásicos são responsáveis pela elevação no nível de ACh, o que é útil para que haja a normalidade da atividade dos impulsos nervosos, retardando os sinais das doenças degenerativas (MINETT; BERTOLUCCI, 2000), evitando assim outras as doenças degenerativas além de Alzheimer.

1.5.3 Ensaio de Toxicidade frente à *Artemia salina*

O bioensaio envolvendo o microcrustáceo *Artemia salina* consiste em avaliar os efeitos da exposição destes a um determinado composto. A análise consiste em um cálculo da Concentração Letal (CL₅₀) para que se possa determinar e avaliar a atividade de toxica de um determinado composto ou mistura. Muitas plantas possuem em sua composição compostos bioativos que normalmente apresentam-se tóxicos em altas doses e esses compostos tóxicos estão presentes em alimentos, logo estudos sobre avaliação da letalidade devem ser feitos a fim de se obter o grau de toxicidade dessas substâncias maléficas a seres vivos, sejam feitos através de bioensaio (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006; NUNES et al., 2008).

Atualmente o teste de letalidade pelo método da *Artemia salina* é um dos mais eficientes, relativamente rápido e economicamente viável e exige pequenas quantidades de amostras (SANTOS et al., 2010). O bioensaio com *Artemia salina* foi realizado por Amarante et al. (2011) com extratos de plantas e derivados mostrando elevado potencial para atividades biológicas, sendo esta técnica essencial para descobrir a toxicidade desses materiais, visando a descoberta de compostos bioativos e novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização química e atividades biológicas do óleo vegetal extraído das sementes da espécie *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

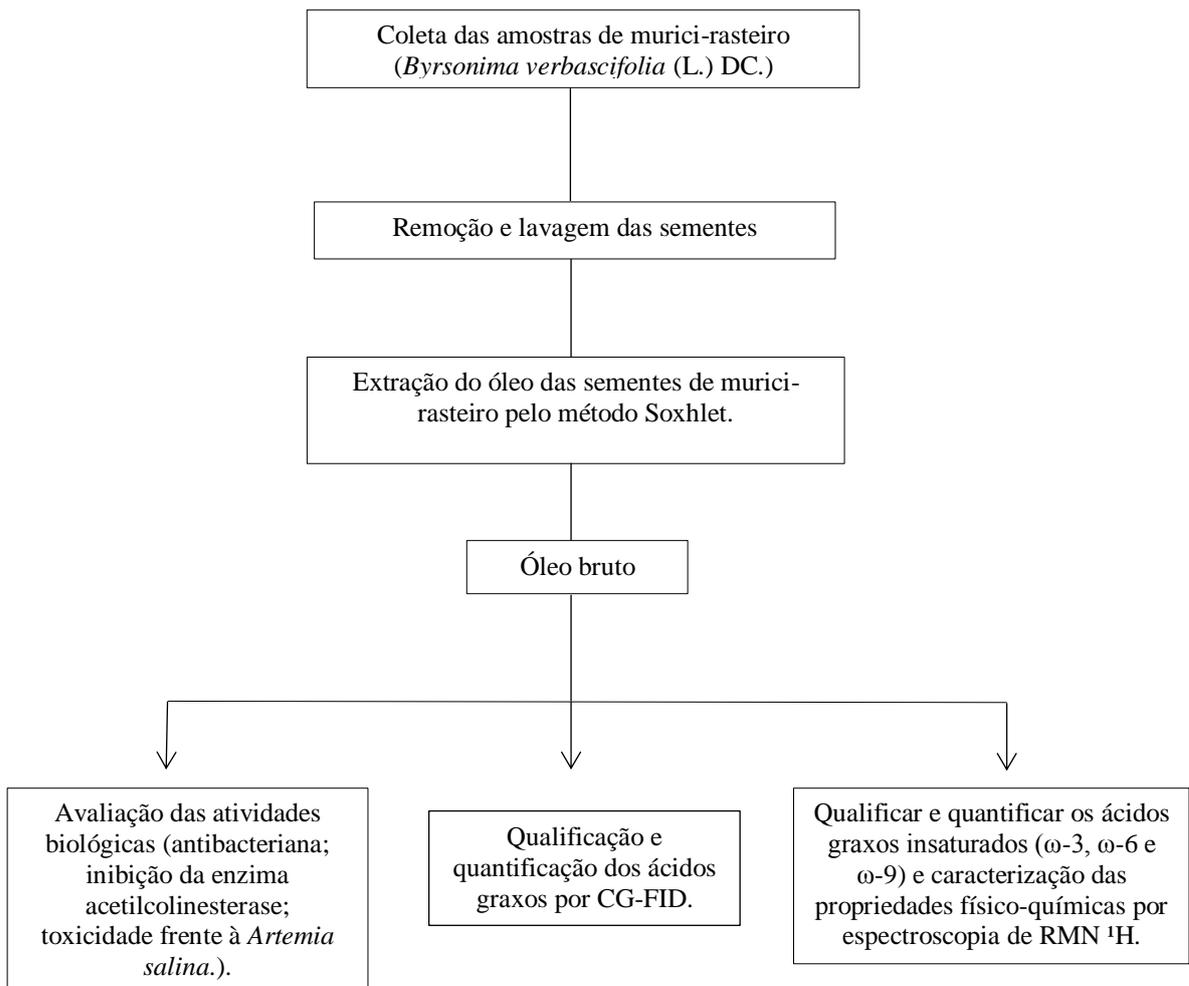
- Extrair o óleo das sementes da espécie *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.
- Qualificar e quantificar a composição química do óleo vegetal extraído.
- Determinar as características físico-químicas (índices de iodo, acidez, saponificação, massa molecular media, relação de hidrogênio oleofínico/alifáticos, estimativa do teor de insaturados).
- Avaliar as atividades biológicas (atividade antibacteriana, potencial inibidor da enzima acetilcolinesterase, toxicidade frente à *Artemia salina*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de murici-rasteiro foram coletadas no município de Boa Vista - RR. A espécie de murici-rasteiro (*Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.) foi identificada com N° 268117 no herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa de Amazônia), Amazonas, Brasil.

O processo de obtenção do óleo das sementes foi realizado no Laboratório de Química Ambiental do Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação do Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Roraima (UFRR). As análises de CG-FID, RMN ¹H e Ensaio Biológicos foram realizados na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Universidade Federal de Roraima (UFRR). A Figura 8 mostra o fluxograma do procedimento experimental realizado nessa pesquisa.

Figura 8 - Fluxograma das atividades experimentais realizadas neste trabalho de pesquisa



3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os frutos foram coletados e escolhidos de acordo com seu estado de maturação. A coleta foi realizada em região de cerrado no município de Boa Vista - RR, nas proximidades da RR 210 no sentido ao município de Alto Alegre de acordo com as coordenadas 30° 2, 82'42'' N e 60° 86'35''W. Segundo a classificação Awi de Köppen, o estado de Roraima apresenta seis meses de chuva (de abril a setembro) e seis meses de seca (de outubro a março) (ARAÚJO et al., 2001). A coleta foi realizada no mês de maio (estação chuvosa).

3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO VEGETAL

3.2.1 Secagem das amostras

As sementes do murici-rasteiro foram removidas, higienizadas em água corrente e levadas para a estufa com circulação de ar para secagem total por 48 horas em uma temperatura de 50°C, sendo verificado a perda de água por pesagem em intervalos de 4 em 4 horas. Após secagem as sementes foram trituradas em moinho e peneiradas até a obtenção de partículas com granulometria de 20-40 Mesh. As amostras foram então pesadas e preparadas para posterior extração do óleo vegetal.

3.2.2 Extração de óleo vegetal pelo método Soxhlet

Utilizou-se um extrator Soxhlet com cartuchos forrados com algodão contendo 5,0 g de semente triturada e 200 mL de solvente n-hexano (JORGE; LUZIA, 2012). A extração foi realizada num período de 8 horas sob o refluxo do solvente (IAL, 2008). A mistura obtida passou por um processo de separação utilizando um rota-evaporador à vácuo, separando o óleo vegetal do solvente. Utilizou-se a equação (1) para calcular o rendimento do óleo de acordo com a norma do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

$$\text{Óleo (\%)} = \frac{100 \times N}{P} \quad (1)$$

Onde: N corresponde ao número de gramas de lipídio;

P corresponde ao número de gramas da amostra.

3.3 ANÁLISES ESPECTOMÉTRICAS

3.3.1 Cromatografia Gasosa

Inicialmente dissolveu-se em tubos criogênicos 10 mg do óleo obtido das sementes de murici-rasteiro, em 100 μL de uma solução de etanólica de KOH (5%) (m/v). Após agitação em vórtex por 10 s, o óleo foi hidrolisado em forno de microondas doméstico, a potência de 80W (Potência 2), durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 400 μL de HCl (20%), 1 mg de NaCl e 600 μL de acetato de etila. Agitou-se em vortex por 10 s, posteriormente foi colocado em repouso por 5 min. Uma alíquota de 300 μL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres.

Os ácidos livres obtidos foram analisados em Cromatógrafo gasoso HP5890 equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna SP2380 (SUPELCO) 30 m x 0,32 mm com gradiente de temperatura: 120°C, 1 min, 7°C/min até 240°C; injetor (Split de 1/50). Hidrogênio como gás de arraste (2 mL/min) e volume de injeção de 1 μL . A identificação dos picos foi realizada através da comparação com tempo de retenção de padrões FAME Mix C14-C22, CRM18917 Supelco e a quantificação dos ácidos graxos por normalização de área.

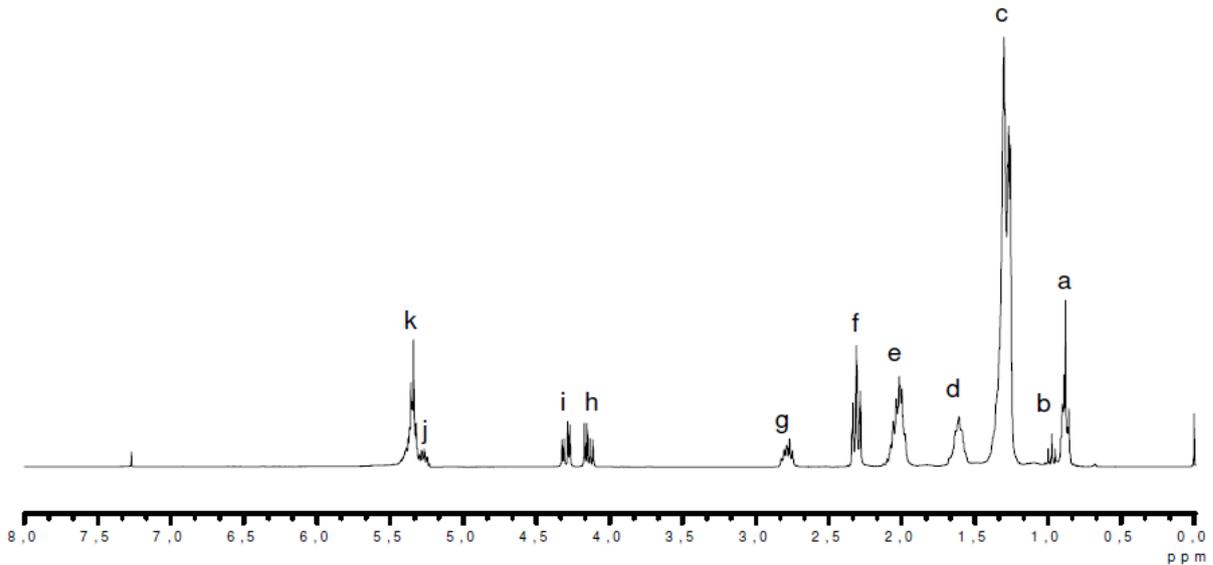
3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

A amostra para análise foi preparada por dissolução de 0,5 mL de óleo vegetal em 0,5 mL de CDCl_3 . Esta então foi analisada por RMN ^1H em espectrofotômetro Bruker Avance 200 DPX, operando em 4,7 Tesla, correspondente a frequência de ressonância de 200,13 MHz para o núcleo de ^1H , utilizando o TMS como padrão interno. As amostras foram analisadas em tubos de 5 mm RMN (Wilmad 507). Para os núcleos de ^1H foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição: pulso: 30°, tempo de aquisição: 4 s, largura de varredura 4,14 Hz, largura da linha: 0,3 Hz. Foram acumuladas 16 scans para cada decaimento livre. Para o processamento dos dados foi aplicado uma transformada de Fourier.

3.3.2.1 Análises de óleo vegetal por RMN ^1H

Segundo Guillén e Ruiz (2003), o espectro de RMN de ^1H apresenta 9 ou 10 sinais com intensidades significante, estando estes sinais de acordo com os hidrogênios dos principais componentes que compõem os óleos vegetais, os triglicerídeos. A Figura 9 mostra o espectro de RMN ^1H genérico de um óleo vegetal.

Figura 9 - Espectro genérico de um óleo vegetal



Fonte: Carneiro P., Reda e Carneiro I. (2005).

O espectro de RMN ^1H fornece picos com deslocamentos específicos de cada hidrogênio. Os **hidrogênios metílicos** ($-\text{CH}_3$) dos ácidos graxos são observados entre δ 0,80-1,00 ppm (**a + b**). Os **hidrogênios metílicos** ($-\text{CH}_3$) do ácido linolênico quando estão presentes são observados em δ 0,98 ppm (**b**). Os **hidrogênios metilênicos** ($-(\text{CH}_2)_n-$) são observados entre δ 1,15-1,40 ppm (**c**). Os **hidrogênios β -carboxílicos** ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$) são observados em δ 1,50-1,70 ppm (**d**). Os **hidrogênios alílicos externos** ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$) presentes nos ácidos linoleico, são observados entre δ 1,90-2,10 ppm (**e**). Os **hidrogênios α -carboxílicos** ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$) podem ser observados em δ 2,22-2,34 ppm (**f**). Os **hidrogênios alílicos internos** ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) do ácido linolênico são observados em δ 2,70-2,80 ppm (**g**). Os **hidrogênios metilênicos** ($-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$) pertencentes aos carbonos 1 e 3 da molécula do glicerol podem ser observados entre δ 4,10-4,32 ppm (**i + h**). Os **hidrogênios oleofínicos** ($-\text{CH}=\text{CH}$) podem ser observados entre δ 5,26-5,40 ppm (**j + k**) (VIGLI et al., 2003; REDA, 2004; CARNEIRO P.; REDA; CARNEIRO E., 2005).

Através dos valores das integrais dos sinais produzidos pelo RMN ^1H podemos fazer substituições em equações e obter valores das propriedades físico-químicas e concentrações de ácidos graxos insaturados. Através do espectro de RMN ^1H podemos obter o índice de iodo (II), índice de saponificação (IS), índice de acidez (IA), relação de hidrogênios oleofínicos/alifáticos ($R_{o,a}$) (REDA, 2004; REDA; CARNEIRO, 2006), massa molecular média (MM) (ANDRADE, 2011; LIMA, 2011; REDA, 2004; REDA; CARNEIRO, 2006), estimativa dos ácidos graxos insaturados totais (Q_1) (ANDRADE, 2011; MORGENSTERN et al. 2006). Abaixo as equações utilizadas neste trabalho conforme a literatura.

Índice de iodo (II)

O II o índice de iodo de um óleo ou gordura é a medida do seu grau de insaturação, sendo expresso em porcentagem de iodo absorvido por grama de amostra. (IAL, 2008). Quanto maior o grau de insaturação de um óleo vegetal, maior será sua capacidade de absorver iodo, e conseqüentemente maior será seu índice (LIMA, 2011). De acordo com o II os óleos vegetais podem ser classificados como: seco >130, semi-seco entre 130-90 e não-seco <90 (ANGENOLI, 2011).

$$II = \frac{126,91 \times 100 \times v}{MM} \quad (2)$$

Onde: V corresponde aos hidrogênios oleofínicos. E pode ser calculado pela equação 3.

MM corresponde a massa molecular média. E pode ser calculado pela equação 6.

$$V = \frac{(J+K)-Ap}{Ap} \quad (3)$$

Onde: Ap corresponde a área de um próton. E pode ser calculado pela equação 4.

$$Ap = \frac{(I+H)}{4} \quad (4)$$

Índice de saponificação (IS)

O IS é a quantidade de álcali necessário para saponificar 1 g de uma quantidade definida de amostra. Este método é aplicável a todos os óleos e gorduras e expressa em mg de hidróxido de potássio necessário para saponificar 1 g de amostra (mg KOH/1g) (IAL, 2008). Quanto menor forem o peso molecular dos ácidos graxos presentes no óleo vegetal, maior será o índice, os ácidos graxos livres aumentam o IS (MOURA, 2010). A reação de saponificação pode estabelecer o grau de deterioração e a estabilidade, além de verificar se as propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e identificar possíveis fraudes e adulterações (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

$$IS = [MM \times (-0,2358)] + 398,42 \quad (5)$$

A massa molecular média é inversamente proporcional ao índice de saponificação, assim se o índice de saponificação for alto menor será sua massa molecular média.

$$MM = 119,7 + (7,036 \times T) + (5,983 \times V) \quad (6)$$

Relação de hidrogênios olefínicos/alifáticos ($R_{o,a}$)

Este parâmetro é calculado a fim de ser obter o índice de acidez de um óleo vegetal. Também pode indicar o grau de insaturação e estado oxidativo de óleo vegetal, sendo mais preciso que o índice de peróxido (CARNEIRO P.; REDA; CARNEIRO E. 2005).

$$R_{o,a} = \frac{V}{A+B} \quad (7)$$

V corresponde aos hidrogênios oleofínicos. E pode ser calculado pela equação 3.

Índice de acidez (IA)

O IA é definido como o número de mg de hidróxido de potássio (KOH) necessários pra neutralizar 1g de amostra de óleo (IAL, 2008). Este índice está intimamente ligado à natureza a qualidade do óleo vegetal, com a sua pureza e principalmente com as condições de armazenamento de óleo (LIMA, 2011). Um alto teor de ácidos graxos livres nos óleos e gorduras é um indicador de sua baixa qualidade (MOURA, 2010).

$$IA = 3,0597 \times (R_{o,a})^2 - 6,3181 \times (R_{o,a}) + 3,3381 \quad (8)$$

Estimativa de ácidos graxos insaturados (Q_1)

A estimativa do teor molar percentual de derivados dos ácidos insaturados totais (Q_1) foi determinada (ANDRADE, 2011). A certeza desta análise pode ser comparada com os dados obtidos pelo método de análise de CG-FID.

$$Q_1 = 100 \times \frac{E}{F} \quad (9)$$

Determinação de ácidos graxos insaturados por RMN 1H

Através dos valores das integrais dos sinais de RMN de 1H podemos calcular a porcentagem de ácidos graxos insaturados (Oleico, Linoleico e Linolênico) presentes em óleos vegetais (GUILLÉN; RUIZ, 2003; GARCIA, 2006; VIGLI et al., 2003).

A porcentagem dos ácidos graxos insaturados foi calculado utilizando as equações previamente estudadas por Garcia (2006). Para calcular a porcentagem de cada ácido graxo insaturado utilizou-se os valores dos sinais dos **hidrogênios metílicos** ($-CH_3$) do ácido linolênico observados em δ 0,98 ppm (**B**); Os **hidrogênios alílicos externos** ($-CH_2-CH=$

CH) observados entre δ 1,90-2,10 ppm (**E**); Os **hidrogênios alílicos internos** ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) observados em δ 2,70-2,80 ppm (**G**) e os **hidrogênios metilênicos** ($-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$) pertencentes aos carbonos 1 e 3 da molécula do glicerol observados entre δ 4,10- 4,32 ppm (**I + J**).

$$\text{Ácido Linolênico (\%)} = 100 \left[\frac{\text{B}/\text{H+I}}{2,25} \right] \quad (10)$$

Os hidrogênios metilênicos **G** pertencem aos ácidos linolênico (ω -3) e linoleico (ω -6), então deve-se determinar a porção de **G** em cada ácido graxo.

$$\text{R}_{\text{G}\omega 3/\text{I+J}} = \left[\frac{(\% \omega 3) \times 3}{100} \right] \quad (11)$$

$$\text{G}_{\omega 3} = [(\text{R}_{\text{G}\omega 3/\text{I+J}}) \times (\text{I} + \text{J})] \quad (12)$$

$$\text{G} = \text{G}_{\omega 3} + \text{G}_{\omega 6} \quad (13)$$

$$\text{Ácido Linoleico (\%)} = 100 \left[\frac{\text{G}_{\omega 6}/(\text{I} + \text{J})}{1,5} \right] \quad (14)$$

Os hidrogênios alílicos internos **E** estão presentes nos ácidos graxos insaturados oleico, linoleico e linolênico, portanto devemos determinar a parte de **E** em cada um deles.

$$\text{R}_{\text{E}\omega 3/\text{I+J}} = \left[\frac{(\% \omega 3) \times 3}{100} \right] \quad (15)$$

$$\text{E}_{\omega 3} = [(\text{R}_{\text{E}\omega 3/\text{I+J}}) \times (\text{I} + \text{J})] \quad (16)$$

$$\text{R}_{\text{E}\omega 6/\text{I+J}} = \left[\frac{(\% \omega 6) \times 3}{100} \right] \quad (17)$$

$$\text{E}_{\omega 6} = [(\text{R}_{\text{E}\omega 6/\text{I+J}}) \times (\text{I} + \text{J})] \quad (18)$$

$$\text{E} = \text{E}_{\omega 3} + \text{E}_{\omega 6} + \text{E}_{\omega 9} \quad (19)$$

$$\text{Ácido Oleico (\%)} = 100 \left[\frac{E_{\omega 9}/(I+J)}{3} \right] \quad (20)$$

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1 Atividade Antibacteriana

Os microrganismos testados foram cepas padrão ATCC (*American Type Culture Colection*) adquiridas e realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Os microrganismos selecionados para esse estudo foram: Bactérias Gram-positivas *L. monocytogenes* (ATCC 15313), *B. cereus* (ATCC 11778) e Gram-negativas *C. freundii* (ATCC 8090), *P. aeruginosa* (ATCC 27853). O antibiótico Ampicilina foi utilizado como controle a uma concentração de 12,5 mg.mL⁻¹. Os procedimentos estabelecidos por Zacchino e Gupta (2007) foram utilizados para a realização do bioensaio.

✓ Preparo do meio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion)

Pesou-se 3,4 g de BHI e dissolve-o em 200 mL de água destilada. Homogeneizou-se a solução e em seguida foi levada para a autoclave por 15 min a 121°C.

✓ Preparo do inóculo

Um pré-inóculo foi preparado em tubos de ensaios adicionando 3,0 mL de solução BHI e 100 µL de bactéria. Os tubos de ensaios contendo as bactérias foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados 500 µL de pré-inóculo bacteriano para um erlenmeyer contendo aproximadamente 40 mL de água destilada esterelizada. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro a 600 nm, no intervalo de transmitância de 74-75% indicado para bactérias.

✓ Preparo das amostras

Aproximadamente 10 mg de óleo foram pesados e em seguida solubilizada em 200 µL de DMSO, resultando em uma solução com concentração de 50 mg.mL⁻¹. Após a solução foi homogeneizado em misturador vortex. Em seguida um volume de 20 µL da solução foi adicionado em *ependorf* contendo 1980 µL de solução BHI, obtendo assim a solução trabalho com concentração final de 250 µL. mL⁻¹.

✓ Teste de atividade antibacteriana

Os ensaios foram realizados em placa ELISA de 96 microcavidades em duplicata. As diluições foram iniciadas adicionando 100 μL de meio BHI e 100 μL de solução-trabalho nos primeiros poços. A solução é então, homogeneizada e 100 μL são transferidos para o próximo poço e assim sucessivamente. Os 100 μL restantes são desprezados. Então ao final da microdiluição são adicionados 100 μL de inóculo em cada um das 96 microcavidades. Ao final teremos oito concentrações: 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. As placas de controle foram realizadas da mesma maneira do ensaio:

- Controle de qualidade do ensaio → substitui a solução-trabalho pelo antibiótico
 - 100 μL de solução Ampicilina (12,5 mg.mL^{-1}).
 - 100 μL de inóculo.

- Branco → não se adiciona o inóculo
 - 100 μL de solução da solução-trabalho (250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).
 - 100 μL de água destilada estéril.

- Controle do crescimento bacteriano → verifica-se a viabilidade celular
 - 100 μL de meio BHI.
 - 100 μL de inóculo.

- Controle de esterilidade do meio de cultura
 - 100 μL de meio BHI.
 - 100 μL de água destilada estéril.

As microplacas foram homogeneizadas por 5 min e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa Elisa em 492nm. Os dados foram processados através do método de Outlier, teste de Grubbs com 95% de confiança.

3.4.2 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A atividade de inibição de AChE foi adaptado seguindo os procedimentos estabelecidos por Ellman et al., (1961). Os testes foram realizados em placas de 96 micropoços, em quintuplicata.

- ✓ Preparo da solução tampão Tris/HCl pH 8 (50 mM)

Para preparar uma solução de 25 mL de Tris/HCl, pesou-se 398,00 mg do sal Utrapure Tris Hydrochloride e adicionar 25 mL de água destilada.

- ✓ Preparo da solução estoque de enzima (1000 U/mL)

Diluiu-se 0,77 mg da enzima no volume de 500 μ L da solução tampão Tris/HCl pH 8,0 no próprio frasco da enzima, para adquirir uma solução de concentração de 1000 U/mL. Deixou-se a enzima em solução por 20 minutos e depois, sobre agitação, por um período de 10 a 15 minutos.

- ✓ Preparo da solução da enzima na concentração 0,222 U/mL

Adicionou-se 1 μ L da solução estoque (1000 U/mL) em 4,5 mL da solução Tris/HCl (50 mM). Depois se agregou albumina sérica bovina 0,1 % (m/v): 4,5 mg.

- ✓ Preparo da solução de trabalho

Preparou-se uma solução do extrato em tampão Tris/HCl, em solvente DMSO, na concentração 10 mg/mL.

- ✓ Preparo dos reagentes

Solução de ATCI (ácido tricloroisocianúrico) (15 mM): Preparou-se 1 mL de solução, pesou-se 4,08 mg de iodeto de acetilcolina e dissolveu-se em 1 mL de água destilada. Solução de DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico tamponado) (3 mM): Pesou-se 2,38 mg de DTNB e dissolveu-se em 2 ml de solução tampão Tris/HCl pH 8. Adicionou-se 11,69 mg de NaCl (0,1M) e 8,132 mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ à solução.

- ✓ Teste de atividade de inibição da enzima anticolinesterase das amostras

Os testes foram realizados em placas de 96 micropoços, em quintuplicata. Adicionaram-se 25 μ L da solução de trabalho (amostra em DMSO 10 mg/mL) aos poços da placa de Elisa do teste e dos controles negativo e positivo. Nos cinco primeiros poços da coluna do controle positivo, adicionaram-se 25 μ L da solução de eserina (10 mg/mL em tampão Tris/HCl pH 8,0). Adicionaram-se, a cada poço, 25 μ L de solução de ATChI (Iodeto de Acetilcolina, Sigma A5751), 125 μ l da solução de DTNB (Sigma D8130) e 50 μ L de Tris/HCl(50 mM) com albumina sérica bovina. A absorbância foi medida a 405 nm a cada 1

min por 8 vezes (8 min no total). Adicionaram-se 25 μL da solução de AChE (0,226 U/mL) em Tris/HCl ao poço. Mediu-se a absorbância a 405 nm por 10 vezes (10 min no total).

A absorbância foi medida a 405 nm a cada 1 min por 8 vezes (8 min no total). Adicionaram-se 25 μL da solução de AChE (0,226 U/mL) em Tris/HCl ao poço. Mediu-se a absorbância a 405 nm por 10 vezes (10 min no total) adaptada por Frank e Gupta (2005).

3.4.3 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

✓ Preparação da Solução Salina

Em um aquário que serviu como incubadora, foi adicionado uma solução salina artificial (40 g de sal grossa em 1 L de água destilada). Ajustou-se o pH entre 8 e 9 com uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 a 10%). A incubadora foi iluminada artificialmente com uma lâmpada fluorescente com aeração. Em um dos lados da incubadora, foram colocados aproximadamente 100 mg de ovos de *Artemia salina*.

Parte do sistema foi coberto com papel alumínio para que os organismos ao nascerem, permanecessem isolados em um dos lados do aquário. Durante a incubação, a temperatura foi mantida em torno de 25°C e a eclosão dos ovos foram monitoradas a cada 12 horas sendo verificada no período de 48 horas.

✓ Preparação de Soluções para o Bioensaio

Partindo de uma solução de 25 mL contendo 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ da amostra, solubilizada em DMSO a 1% e completados com água salina preparou-se a primeira solução. A partir da primeira solução, pipetou-se volumes de 11 mL a tubos contendo 1 mL de uma solução de DMSO (Dimetilsufóxido) a 1% em solução salina e completados com 10 mL de solução salina, para obter a concentração de 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. As demais soluções de concentração inferior (500 a 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram obtidas conforme já descrito, e utilizando a seguinte equação respectivamente:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (23)$$

✓ Realização do teste

Após o período de incubação de 24 horas, 10 náuplios de *Artemia salina*, foram selecionados e expostos nos tubos de ensaios com as diferentes concentrações diluídas. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração. Uma solução salina sem extrato foi

utilizada como controle positivo, que foi submetido ao mesmo procedimento experimental que os grupos tratados com as amostras em estudo para efeitos comparativos da influência do veículo utilizado sobre a resposta das larvas de *Artemia salina*. Este sistema foi incubado em temperatura ambiente por 24 horas, sem aeração sendo os frascos mantidos sob iluminação. Após o período de 24 horas de incubação foram contados o número de náuplios mortos e vivos em cada frasco, através da visualização macroscópica e os valores registrados em formulário.

✓ Avaliação da toxicidade

Decorrido o tempo de 24 e 48 horas realizou-se a contagem do número de náuplios vivos e mortos/imobilizados. A probabilidade de mortalidade foi calculada de acordo com a Equação 24:

$$PM (\%) = \frac{r}{n} \cdot 100 \quad (24)$$

Onde: PM = probabilidade de mortalidade; r = número de artemias mortas; n = número de artemias totais no tubo de ensaio.

Os valores em porcentagem da probabilidade de mortalidade foram corrigidos levando-se em consideração a porcentagem de mortalidade no teste controle negativo de acordo com a Fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925).

$$PM (\%) = 100 \cdot \frac{(\%T - \%C)}{(100\% - \%C)} \quad (25)$$

Onde: %T representa a mortalidade de *artemias* testadas com a amostra de interesse; %C, a mortalidade de *artemias* utilizadas no controle.

Na interpretação dos resultados foi determinada a Concentração Letal (CL₅₀), utilizando-se o programa Microsoft Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COMPOSIÇÃO DOS ELEMENTOS DOS FRUTOS DE MURICI-RASTEIRO

A composição do fruto de murici-rasteiro apresenta-se menor em relação a outras espécies de murici, devido apresentar-se em menor tamanho. O óleo extraído das sementes de murici-rasteiro obteve uma coloração amarelo intenso, como pode ser observado na Figura 10 e o rendimento da extração hexânica está apresentado na Tabela 3.

Figura 10 - Composição de murici-rasteiro: polpa (A), semente (B) e óleo vegetal (C)



Tabela 3 - Composição média dos elementos de 100 frutos de murici-rasteiro

Composição do fruto de murici-rasteiro	
Fruto Inteiro (g)	23,97 ± 0,6
Polpa (g)	15,39 ± 0,2
Sementes (g)	8,23 ± 0,2
Rendimento de óleo vegetal (%)	6,91 ± 0,8

A Tabela 4 mostra o rendimento do óleo extraído das sementes de murici-rasteiro em comparação com outras espécies de murici da literatura.

Tabela 4 - Comparação do rendimento do óleo extraído das sementes de espécies de murici

Rendimento de extração de óleo vegetal (%)	
Murici-rasteiro ¹	6,91
Murici ²	25,6
Murici ³	5,52

Legenda: ¹Esta pesquisa; ²Vandruscolo et al. (2012); ³ Lima L.; Lima I.; Silva (2006).

Através dos valores observados na Tabela 4 podemos observar que o murici-rasteiro obteve rendimento inferior quando comparado ao rendimento encontrado para o murici estudado por Vandruscolo et al. (2012), porém possui rendimento superior quando comparado ao murici estudado por Lima L., Lima I. e Silva (2006).

4.2. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO VEGETAL DAS SEMENTES DE MURICI-RASTEIRO

4.2.1 Cromatografia Gasosa

Neste trabalho foi realizada a quantificação dos ácidos graxos por Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chamas. Sendo esta a técnica a mais utilizada para a identificação dos ácidos graxos presentes em amostras de óleos vegetais por sua capacidade de seleção, identificação e qualificação dos componentes (FARIAS, 2013). A Tabela 5 mostra a composição em ácidos graxos presentes no óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro em comparação com óleos vegetais extraído das sementes de outros frutos.

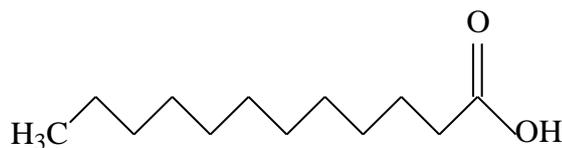
Tabela 5 - Composição dos ácidos graxos majoritários presentes no óleo das sementes de murici-rasteiro e outros óleos vegetais da literatura por CG-FID

Ésteres metílicos de ácidos graxos	Quantificação em %				
	Murici-rasteiro (<i>B. verbascifolia</i>)	Murici (<i>B. crassifolia</i>) ¹	Melancia (Crimson Sweet) ²	Maracujá (<i>P. alata</i>) ³	Andirora (<i>Carapa Guianensis</i>) ⁴
Ácidos graxos saturados					
Láurico (C12:0)	0,23	ND	ND	ND	0,65
Mirístico (C14:0)	0,26	ND	ND	0,22	0,13
Palmítico (C16:0)	16,33	5,5	11,25	10,77	28,29
Esteárico (C18:0)	5,54	6,3	6,42	3,25	8,57
Araquídico (C20:0)	0,57	ND	0,41	0,29	ND
Ácidos graxos mono-insaturados					
Palmitoleico (C16:1)	2,63	ND	ND	0,68	ND
Oleico (ω -9) (C18:1)	32,84	53,3	22,96	20,11	49,74
Ácidos graxos poli-insaturados					
Linoleico (ω -6) (C18:2)	37,49	34,9	58,96	63,42	7,57
Linolênico(ω -3) (C18:3)	0,35	ND	ND	0,55	1,49
AGI	72,61	88,2	81,92	84,76	58,8
AGS	22,93	11,8	18,08	14,53	37,64
Não determinados	3,76	-	0,41	0,71	3,56

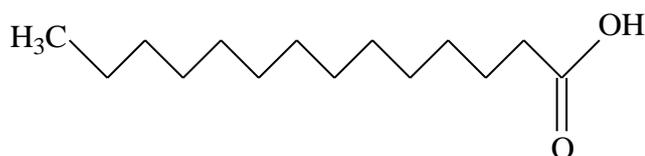
Legenda: ND- Não detectado. ¹Rezende; Fraga (2003); ²Ávila (2012); ³ Silva (2011); ⁴ Farias (2013).

As Figuras 11 e 12 apresentam as estruturas dos ácidos graxos insaturados (AGI) e ácidos graxos saturados (AGS) identificados no óleo extraído das sementes de murici, respectivamente encontrados no óleo das sementes de murici-rasteiro.

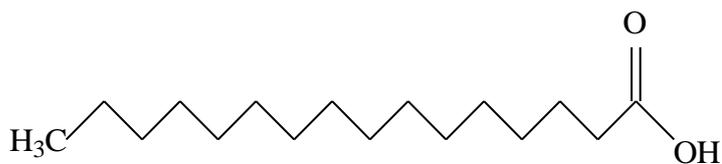
Figura 11 - Estrutura dos AGS presentes no óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro



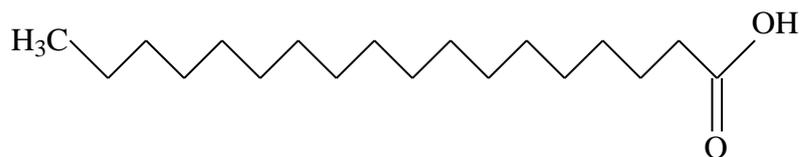
Ácido Láurico (C12:0)



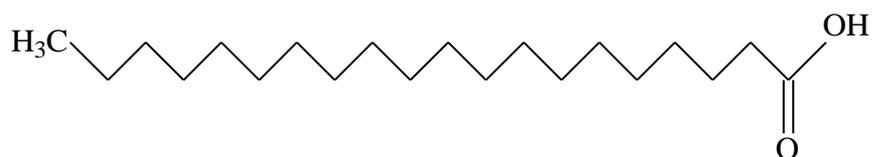
Ácido Mirístico (C14:0)



Ácido Palmítico (C16:0)

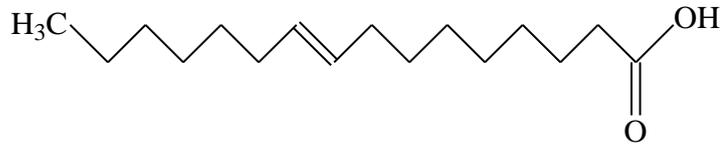


Ácido Esteárico (C18:0)



Ácido Araquídico (C20:0)

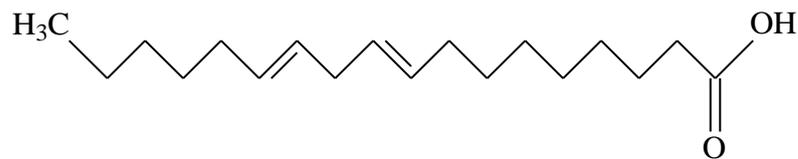
Figura 12 - Estrutura dos AGI presentes no óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro



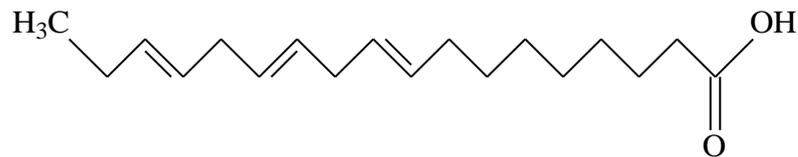
Ácido Palmitoleico (C16:1)



Ácido Oleico (C18:1)



Ácido Linoleico (C18:2)



Ácido Linolênico (C18:3)

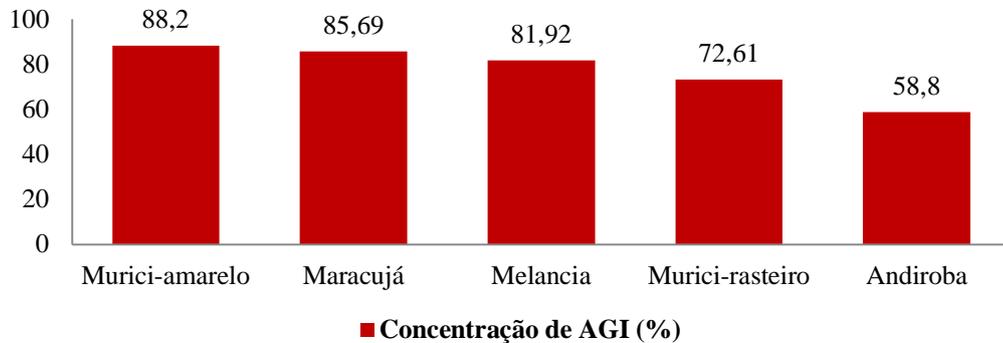
Fonte: Autora, desenvolvido em ChemBioDraw 12.0

Há poucos trabalhos divulgados sobre qualificação e quantificação de ácidos graxos obtidos a partir de sementes de frutas do gênero *Byrsonima*, sendo assim houve a necessidade da comparação com frutas pertencentes à outros gêneros e famílias, como mostra a Tabela 5.

O óleo das sementes de murici apresentou 72,61% de ácidos graxos insaturados, dos quais estão presentes os ácidos linolênico (ω -3) e oleico (ω -6), considerados essenciais ao nosso organismo. A Figura 13 mostra a composição em ácidos graxos presentes no óleo

vegetal das sementes de murici-rasteiro em comparação com óleos vegetais extraído das sementes de outros frutos.

Figura 13 - Gráfico de comparação das concentrações de AGI presentes em óleo vegetal extraído de sementes



O óleo das sementes de murici-rasteiro apresentou insaturação inferior aos óleos das sementes de melancia (81,92%) e maracujá (85,9%) e ainda da espécie de murici-amarelo (88,2%), porém apresentou insaturação superior quando comparado com o óleo das sementes de andiroba (58,8%).

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Através dos valores das integrais do espectro de RMN ^1H para o óleo das sementes de murici-rasteiro foi possível calcular a percentagem dos AGI essenciais à saúde humana. A composição dos ácidos graxos insaturados por RMN ^1H apresentou oleico (31,72%), linoleico (36,85%), linolênico (0,34%) e AGS (31,09%).

Os AGI desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Os ácidos graxos linoleico (ω -6) e linolênico (ω -9) são necessários para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos (MARTIN et al., 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados linoleico (ω -6) e linolênico (ω -3) estão relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares, através da redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol sanguíneo, aumentando a fluidez sanguínea e reduzindo a pressão artéria (ANJO, 2004). O ácido linolênico (ω -3) quando adicionado na dieta podem ajudar a prevenir ou tratar doenças como as cardiovasculares, câncer, artrite, depressão, mal de Alzheimer (MORAES; COLLA, 2006). O ácido linoleico (ω -6) e seus derivados exercem papéis fisiológicos no organismo participando da estrutura das membranas celulares, viscosidade sanguínea, pressão

arterial, reação anti-inflamatória e funções plaquetárias (MORAES; COLLA, 2006; MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002).

O ácido oleico encontrado é a segunda maior concentração no óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro. Segundo Salgado et al. (2008) é o principal ácido graxo do grupo dos ácidos graxos monoinsaturados, uma vez que ajuda a diminuir a concentração plasmática de lipoproteína de baixa densidade (LDL), o que promove uma redução no risco de doenças cardiovasculares.

Enquanto que estudos apontam que uma dieta rica em AGI ajuda a manter-se com saúde, os AGS prejudica consideravelmente a saúde. Dentre os danos causados pelos AGS está o aumento das concentrações de colesterol. Os AGS aumentam os níveis de LDL-colesterol (“colesterol ruim”) por meio de sua depuração a circulação, aumentando assim, as chances de doenças cardiovasculares (CASTRO et al., 2004). Apenas o ácido graxo saturado esteárico não representa risco à saúde, pois dentro do organismo, é rapidamente convertido em ácido linoleico (MUSTAD et al., 1997).

4.2.3 Composição de ácidos graxos por CG-FID e RMN ¹H

Para a quantificação dos ácidos graxos nesta pesquisa foram realizadas duas técnicas, buscando maior precisão dos resultados. A técnica de RMN ¹H é limitada pois qualifica e quantifica somente os ácidos graxos insaturados, enquanto que a técnica de CG-FID qualifica e quantifica tanto ácidos graxos insaturados quanto os saturados. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição química dos AGI (linolênico, linoleico e oleico) por CG-FID e RMN ¹H e outros óleos vegetais da literatura

Ésteres metílicos de ácidos graxos	Técnica	Murici-rasteiro (<i>B. verbascifolia</i> (L.) DC.)	¹ Andirora (<i>Carapa Guianensis</i>)	² Melancia (<i>Crimson Sweet</i>)
Ácido Oleico (C18:1)	CG-FID	32,84	49,74	22,96
	RMN ¹ H	31,72	47,32	24,7
Ácido Linoleico (C18:2)	CG-FID	37,49	7,57	58,96
	RMN ¹ H	36,85	13,14	53,4
Ácido Linolênico (C18:3)	CG-FID	0,35	1,49	ND
	RMN ¹ H	0,34	9,99	ND
Ácidos Graxos Saturados	CG-FID	29,32	41,2	18,08
	RMN ¹ H	31,09	29,55	21,9

Legenda: ¹ Farias (2013); ²Ávila (2012).

As concentrações dos ácidos graxos insaturados determinados pela técnica de RMN ¹H estão próximos aos resultados obtidos por CG-FID, indicando assim, ser uma excelente

técnica (rápida e não é destrutiva) para a determinação desses ácidos graxos, porém por ser um equipamento de alto valor, o mesmo é encontrado em poucas Universidades.

A concentração do ácido oleico (ω -9) foi superior para os óleos vegetais murici-rasteiro e andiroba (FARIAS, 2013) utilizando a técnica de CG-FID como mostra a Tabela 6. A concentração do ácido linoleico (ω -6) foi superior para os óleos vegetais de murici-rasteiro e melancia (ÁVILA, 2012) utilizando a técnica de CG-FID, porém foi inferior para o óleo vegetal da andiroba (FARIAS, 2013). A concentração de ácido linolênico (ω -3) não teve diferença significativa para o óleo vegetal de murici-rasteiro utilizando as duas técnicas (CG-FID e RMN ^1H), porém para o óleo de andiroba (FARIAS, 2013), a concentração desse ácido graxo foi superior usando a técnica de RMN ^1H . Para o óleo de melancia (ÁVILA, 2012) não foi encontrado esse ácido graxo em nenhuma das técnicas.

4.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS POR RMN ^1H

Utilizando os valores das integrais do espectro de RMN ^1H , obtemos a medida direta das características físico-químicas, tais como: índice de iodo (II), índice de acidez (IA), índice de saponificação (IS), peso molecular médio (MM), relação de hidrogênios oleofínicos/alifáticos ($R_{o,a}$), número médio de instauração por triglicerídeo (INS), estimativa percentual de derivados dos ácidos graxos insaturados totais (Q_1) e grau de instauração (G_i). A Tabela 7 mostra os resultados das propriedades físico-químicas do óleo extraído das sementes de murici-rasteiro.

Tabela 7 - Características físico-químicas do óleo das sementes de murici-rasteiro por RMN ^1H e outros óleos vegetais da literatura

Propriedades	Murici-rasteiro (<i>B. verbascifolia</i> (L.) DC.)	Melancia (<i>Crimson Sweet</i>) ¹	Andiroba (<i>Carapa Guianensis</i>) ²	“ Sicilian” Lemon (<i>Citrus limon</i>) ³
II (mg I₂/g)	93,08	114,9	48,41	107,83
IA(mg KOH/g)	0,10	0,26	2,13	0,43
IS (mg KOH/g)	237,61	174	161,67	193,89
MM (g/mol⁻¹)	681,97	951,5	1004, 02	867,40
R_{o,a}	0,94	1,3	0,27	0,69
Q₁ (%)	71,88	-	-	-

Legenda: II = índice de iodo; IA = índice de acidez; IS = índice de saponificação; MM = peso molecular média, g/mol; $R_{o,a}$ = relação de hidrogênios oleofínicos/alifáticos; Q_1 = Estimativa do teor ácidos graxos insaturados totais; ¹ Ávila (2012); ² Farias (2013); ³ Carneiro P., Reda e Carneiro I. (2005).

4.3.1 Índice de Iodo (II)

Um alto valor de II indica que o óleo possui um alto valor de insaturação, portanto maior será sua capacidade de absorver Iodo. De acordo com Angenoli (2011), o II para óleos

vegetais podem ser classificados como: secos > 130 , semi-seco entre 130-90 e não-seco < 90 . O óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro apresentou II de 93,08 mg I₂/g. O óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro é classificado como semi-seco, caracterizando-se como um óleo resistente à oxidações.

O índice de insaturação do óleo das sementes de murici-rasteiro foi inferior ao encontrado para os óleos de sementes de melancia (ÁVILA, 2012) e limão (CARNEIRO P.; REDA; CARNEIRO E., 2005) porém apresentou maior índice quando comparado com o valor encontrado para o óleo extraído das sementes de andiroba (FARIAS, 2013), sendo quase o dobro.

4.3.2 Índice de Acidez (IA)

O IA de um óleo vegetal pode fornecer informações a cerca do estado de conservação do óleo. O valor encontrado para o óleo extraído das sementes de murici-rasteiro foi de 0,10 mg KOH/g, conforme observado na Tabela 7. Segundo a resolução RDC nº 270 da ANVISA (2006) óleos e gorduras refinados devem no máximo absorver 0,6 mg KOH/g. Quando analisado o óleo extraído das sementes de murici-rasteiro estava *in natura*, e apresentou um valor de acidez inferior ao estipulado para óleos e gorduras refinados segundo a ANVISA (2006), logo podemos afirmar que o óleo estudado foi bem armazenado e conservado após extração, não sofrendo hidrólises, ou oxidações.

O valor encontrado foi inferior ao encontrado para o óleo de limão estudado por Carneiro P., Reda e Carneiro I. (2005), ao óleo de melancia estudado por Ávila (2012), e para o óleo de andiroba estudado por Farias (2013).

4.3.3 Relação de hidrogênios oleofínicos/alifáticos ($R_{o,a}$)

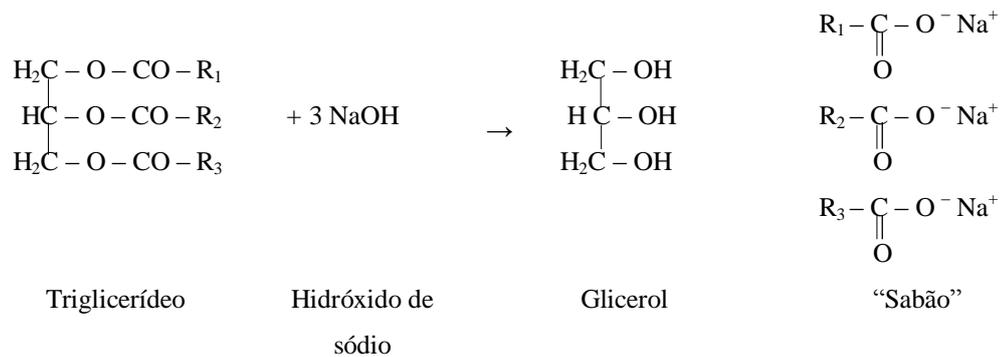
A $R_{o,a}$ é um parâmetro que indica o grau de insaturação e o estado de oxidação de um óleo vegetal, sendo mais preciso que o índice de peróxido. Um valor de $R_{o,a} \geq 0,66$ indica que o óleo pode ser considerado apropriado para o consumo humano (CARNEIRO P.; REDA; CARNEIRO I., 2005), logo o óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro apresentou $R_{o,a}$ igual a 0,94 indicando que é apropriado para o consumo humano.

O valor de $R_{o,a}$ foi inferior ao encontrado para o óleo da melancia estudado por Ávila (2012) e superior ao encontrado para o óleo de limão estudado por Carneiro P., Reda e Carneiro I. (2005) e ao óleo de andiroba estudado por Farias (2013).

4.3.4 Índice de Saponificação (IS) e Massa Molecular Média (MM)

A saponificação é a hidrólise alcalina de triglicerídeos, que resulta em uma molécula de glicerol e a mistura de ácidos carboxílicos de cadeia longa (SOLOMOS; FRYHLE, 2012), como mostra a Figura 14. Essa reação é a maneira pela qual a maioria dos sabões é fabricada.

Figura 14 - Reação de saponificação de triglicerídeos



Legenda: R₁, R₂ e R₃ são cadeias carbônicas dos ácidos graxos.

Fonte: Solomos; Fryhle (2012).

A reação de saponificação de um óleo vegetal pode estabelecer o grau de deterioração e estabilidade, além de identificar possíveis fraudes e adulterações (RIBEIRO; SEVERALLI, 2004). Podemos observar na Tabela 6 que o óleo extraído das sementes de murici-rasteiro apresentou índice de saponificação de 237,61 mg KOH/g. O valor encontrado é superior ao encontrado pra o óleo das sementes de melancia estudadas por Ávila (2012) e da andiroba estudado por Farias (2013) e do limão estudados por Carneiro P., Reda e Carneiro I. (2005).

O IS está intimamente ligado à massa molecular média de triglicerídeos, quanto maior for o índice de saponificação menor será sua massa molecular média. O valor encontrado para a MM para o óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro foi de 681,97 g.mol⁻¹. O valor encontrado foi inferior ao valor encontrado para o óleo de melancia estudado por Ávila (2012) e de andiroba estudado por Farias (2013) e do limão, estudado por Carneiro et al. (2005).

4.3.5 Estimativa do teor de insaturados (Q₁)

A estimativa do teor molar percentual de derivados dos ácidos insaturados totais (Q₁) encontrado para o óleo das sementes de murici-rasteiro foi de 71,88%. Este valor é inferior ao percentual de ácidos graxos insaturados obtidos pela técnica de CG-FID que foi de 72,61%. A diferença entre as duas técnicas pode ser justificada pelo fato de que a técnica de RMN ¹H

prevê o grau de insaturação apenas dos ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico, enquanto que a técnica de CG-FID prevê o grau de insaturação de outros ácidos graxos insaturados, como é o caso do ácido graxo palmitoleico presente no óleo vegetal de murici-rasteiro.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Atividade Antibacteriana

Para o teste da atividade antimicrobiana preparou-se uma solução trabalho com concentração 50 mg.mL⁻¹ e uma padrão para controle com o antibiótico Ampicilina com concentração 12,5 mg.mL⁻¹. O óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro apresentou melhor inibição com MIC (Concentração Inibitória Mínima) 250 µg.mL⁻¹. A precisão do ensaio foi verificada em relação ao antibiótico Ampicilina. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para esse bioensaio.

Tabela 8 - Bioensaio de MIC para avaliação da inibição do crescimento de bactérias.

Microrganismos testados	Inibição na Concentração de 250 µg.mL ⁻¹	
	Óleo das sementes de murici-rasteiro (%)	Ampicilina (%)
Gram - negativas		
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	39,43 ± 1,21	40,62 ± 1,20
<i>Citrobacter freundii</i>	31,87 ± 3,54	57,12 ± 1,43
Gram - positivas		
<i>Bacillus cereus</i>	31,87 ± 2,23	95,35 ± 3,23
<i>Listeria monocytogenes</i>	49,40 ± 3,04	92,70 ± 2,67

As sementes da espécie *B. crassifolia* pertencente ao mesmo gênero da espécie *B. verbascifolia* (L.) DC. foram estudadas e apresentaram em suas sementes compostos antimicrobianos (MUÑIS-RAMIRES et al., 2014). Todas as bactérias testadas apresentaram sensibilidade frente ao óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro apresentando inibição para as bactérias *Pseudomonas auruginosa* (39,43%), *Citrobacter freundii* e *Bacillus cereus* (31,87%), e para a bactéria *Listeria monocytogenes* (49,40%).

As bactérias gram-positivas *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* são bactérias que apresentam sensibilidade aos antibióticos. Segundo os dados apresentados na Tabela 7 o óleo das sementes de *B. verbascifolia* (L.) DC apresentou inibição inferior em relação à inibição do padrão ampicilina. O Padrão ampicilina é considerado um antibiótico bactericida contra muitos microorganismos gram-positivos, porém apenas detém o crescimento de bactérias gram-negativas como a *Listeria monocytogenes* (NOJIMOTO et al., 1994), apesar do óleo das sementes murici não apresentar uma eficiência ao inibir essas bactérias, o óleo em

estudo pode ser considerado um bacteriostático, pois apresentou inibição do crescimento dessas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Alguns estudos relatam que o ácido linoleico (ω -6) apresenta a capacidade de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, pois altera a síntese de proteínas, parede celular, ácidos nucleicos e membrana celular durante a divisão (GREENWAY; DIKE, 1979; MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003; FERREIRA et al, 2012). Os ácidos graxos ácidos linolênico (ω -3) e linoleico (ω -6) juntos compõem 37,84% da composição graxa do óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro, possivelmente sejam responsáveis pela inibição apresentada para as bactérias estudadas.

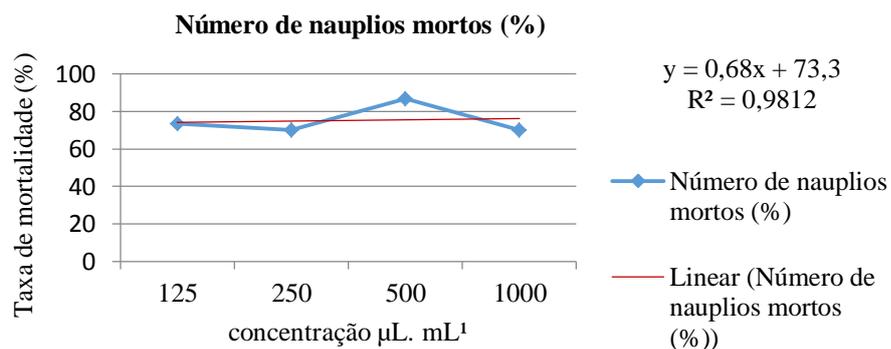
4.4.2 Atividade de Inibição da Enzima acetilcolinesterase

O óleo extraído das sementes de murici-rasteiro mostrou ser capaz de inibir 39,23% de AChE. Em estudos realizados por Santos et al. (2015), o óleo das sementes de *Annona hypoglauca* que mostrou inibição 79,55% sobre a AChE. O valor encontrado nesta pesquisa mostra-se inferior diante da inibição do óleo das sementes de *A. hypoglauca*. De acordo com os estudos de Vinutha et al., (2007), os inibidores de AChE podem ser classificados como: inibidores potentes ($> 50\%$), inibidores moderados (30-50%) e inibidores fracos ($< 30\%$). O óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro apresentou inibição 39,23%, classificando-se como moderado.

4.4.3 Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*

O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral de uma planta e é considerado o ensaio preliminar no estudo de compostos com potencial de atividade biológica (PRETTO, 2005). A Figura 15 mostra o gráfico os resultados obtidos para a avaliação da atividade tóxica do óleo vegetal obtido das sementes de murici-rasteiro.

Figura 15 - Taxa de mortalidade de *Artemia salina* em função da concentração do óleo vegetal de murici-rasteiro



Através da equação de regressão linear dada por $y = 0,68x + 73,3$ pode-se obter o valor de Concentração letal (CL_{50}). Segundo Amarante et al. (2011) considera-se baixa toxicidade quando CL_{50} for superior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; moderada toxicidade quando CL_{50} estiver entre $100-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; muito tóxico quando CL_{50} for inferior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O valor de CL_{50} encontrado para o óleo vegetal das sementes de *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. foi de $34,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ classificando-se como tóxico e ativo. Segundo Amarante et al., (2011) extratos de plantas e derivados que apresentam alta toxicidade contra a *Artemia salina* sugerem que a presença de substâncias bioativas com alto potencial para atividade biológica. Em óleos vegetais os principais compostos bioativos são os tocoferóis, carotenoides, compostos fenólicos e os AGE ($\omega-3$ e $\omega-6$) (MALACRIDA, 2009), no presente trabalho não foi qualificado ou quantificado os compostos bioativos responsáveis por essa alta toxicidade, porém através do resultado desse teste podemos considerar a presença de substâncias bioativas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração do óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro apresentou um rendimento de 6,91%, é um óleo vegetal com concentração de 73,31% em ácidos graxos insaturados, dos quais estão presentes os ácidos linolênico (ω -3), linoleico (ω -6) e oleico (ω -9) essenciais na dieta humana.

De acordo com as composições dos medicamentos descritos na Tabela 3 podemos observar que a maioria dos ácidos graxos descritos está presentes no óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro. Entre os medicamentos apresentados o que há maior quantidade de ácidos graxos é o Curatec[®], nos quais estão presentes os ácidos linoleico, oleico, láurico, palmítico, mirístico, esteárico, dos quais podem ser encontrados no óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro.

Os resultados obtidos para as propriedades físico-químicas para o óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro indicam que o óleo armazenado tem uma boa estabilidade, não sofrendo oxidações, hidrólises, o que poderia causar adulterações dos resultados das análises realizadas.

Apresentou inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, resultando em conformidade pela literatura, que afirmam que alguns ácidos graxos possuem atividade antimicrobiana. O óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro apresentou inibição moderada da AChE. O teste de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* indica que o óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro apresentou alta toxicidade, portanto pode possuir em sua composição substâncias bioativas, que o óleo das sementes merecem uma investigação futura, como a qualificação e quantificação dessas substâncias bioativas.

O óleo vegetal das sementes de murici-rasteiro pode ser considerada uma fonte alternativa de ácidos graxos insaturados, com esta estabilidade oxidativa e bioensaios parcialmente promissores. Indicando que o óleo vegetal extraído das sementes de murici-rasteiro são fontes de ácidos graxos que podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e na cosmetologia.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol.** v.18, p.265-267, 1925.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphtoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v.66, p.2388-2392, 2005.
- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorada pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Revista Acta Amazônica**, v.41, n.3, p.431-434, 2011.
- ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v.20, p.1175-1180, 2012.
- ANDRADE, D. F. **Caracterização de Biodiesel através da Separação dos Constituintes por Cromatografia Líquida**. 2011. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- ANGENOLI, L. M. **Polímeros obtidos a partir do biodiesel epoxidado dos óleos de oliva e soja: preparação e caracterização química e físico-química**. 2011. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vasc. Br.**, v.3, n.2, p.145-154, 2004.
- ANVISA. RDC nº270 de 22 de setembro de 2006. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RDC_n_270.pdf?MOD=AJPERES> Acessado em: agosto de 2015.
- ARAÚJO, W. F. et al. Precipitação pluviométrica mensal provável em Boa Vista, Estado de Roraima, Brasil. **Rev. Bras. de Engenh. Agric. E Ambien.**, v.5, n.3, p.563-567, 2001.
- ÁVILA, I. I. C. **Estudo químico do óleo das sementes de melancia das variedades Charleston Gray e Crimson Sweet cultivadas em Bonfim-RR**. 2012. 90p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.
- BARANCELLI, G. V. et al. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arq. Inst. Biol**, v.78, n.1, p.155-168, 2011.
- BARBOSA, R.I.; MIRANDA, I.S. Fitofisionomias e diversidade vegetal das savanas de Roraima. In: BARBOSA, R.I. et al. (orgs.), **Savanas de Roraima: Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrossilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p.61-78.
- CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M.; NETO, S. C. A Revolução Verde da mamona. **Química Nova na Escola**, v.32, n.1, p.3-8, 2010.

- CARNEIRO, P. I. B.; REDA, S. Y.; CARNEIRO, E. B. B. ¹H NMR Characterization of Seed Oils from Rangpuer Lime (*Citrus limonia*) and “Sicilian” Lemon (*Citrus limon*). **Ann. Magn. Reson**, v.4, n.3, p.64-68, 2005.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v.7, p.88-95, 1961
- FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.
- FARIAS, E. S. **Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da semente de andiroba (*Carapa guianensis* aublet) de Roraima**. 2013. p.94. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2013.
- FERREIRA, A. M. et al. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Ver. Esc. Enferm**, v.46, n.3, p.752-760, 2012.
- FERREIRA, M. G. R. **Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.)**. Informação Técnica. Embrapa Rondônia, 2005. Disponível em: http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/folder_murici.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2014.
- FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja-taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v.28, n.1, p.19-23, 2005.
- FIGUEIREDO, M. E. et al. Avaliação química e da atividade antidiarreica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, p.79-83, 2005.
- FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas Aeruginosa*: Frequência de resistência a Múltiplos Fármacos Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.19, n.4, p.421-427, 2007.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev. Psiq. Clín.**, v.32, n.3, p.137-148, 2005.
- GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. 120p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- GARRITANO, G.; JORGE, C. L.; GULIAS, A. P. S. M. Murici. In: VIEIRA, R. F. et al. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v.1, p.235-247, 2006.
- GOMES, L. P. et al. *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes nos municípios de seropédica e Itaguaí-RJ. **Rev. Univ. Rural**, v.24, n.2, p.181-184, 2004.

GREENWAY, D. L. A.; DYKE, K. G. H. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Jounal General Microbiology**, v.115, p.233-245, 1979.

GUERREIRO, A. G.; FURTADO, D. C.; BELISÁRIO, C. M. Caracterização pós-colheita e avaliação de parâmetros físico-químicos em frutos de murici (*Byrsonima verbascifolia*, Malpighiaceae) armazenados sob refrigeração. In: **I CONGRESSO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO CAMPUS RIO GRANDE DO IFGOIANO**, Goiânia, 6-7 set. 2012.

GUILHON-SIMPLÍCIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *byrsonima* (malpighiaceae). **Quím. Nova**, v.34, n.6, p.1032-1041, 2011.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl group in vegetable oils. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol**, v.105, p.688-696, 2003.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA JUNIOR, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex A. Juss). **Cerne**, v.12, n.1, p.84-91, 2006.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.** v.88, n.2, p.53-58, 2007.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)I. **Tabelas de Composição Nutricional Dos Alimentos Consumidos no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2011, 351p.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 595p.

JEMMI T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-born pathogen and hygiene indicator. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz**, v. 25, n.2, p.571-580, 2006.

JORGE, N.; LUZIA, D. M. M. Caracterização do óleo das sementes de *Pachira aquática* Aublet para aproveitamento alimentar. **ACTA AMAZÔNICA**, v.42, n.1, p.149-156, 2012.

JUDD, W. S. et al. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. 2.ed. Sunderland: Sinuer Associates, 2002, 576p.

KACLÍKOVÁ E. et al. Detection and Quantification of *Citrobacter freundii* and *C. braakii* by 5'- Nuclease Polymerase Chain Reaction. **Current Microbiology**, v.51, p.229-232, 2005.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciênc. Agrotec.** v.29, n.5, p.1008-1014, 2005.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, n.2, p.158-163, 2006.

LIMA, P. S. **Metátase de oleofínicas com óleo vegetais: uma estratégia para o desenvolvimento de biorefinrias**. 2011. 63p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LIMA, F. E. L. et al. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Rev. Nutr.** v.13, n.2, p.73-80, 2000.

LIMA, L. B.; LIMA, I. V. M.; SILVA, M. G. V. estudo do potencial proteico, lipídico e antioxidante de resíduos de frutos de industrias do estado do Ceará. In: **46º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA – Química e Recursos Hídricos**, Salvador, 25-29 de setembro, 2006. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2006/trabalhos2006/10/192-333-10-T1.htm>>. Acessado em 25 de agosto de 2015.

LÔBO, I. P. FERREIRA, S. L. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1596-1608, 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, v.2, 1998. 228p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 325p.

LÓPEZ, S. et al.. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and narcissus extracts. **Life Sciences**, v.71, p.2521-2529, 2002.

MALACRIDA, C. R. **Caracterização de óleos extraídos de sementes de frutas: composição de ácidos graxos, tocoferóis e carotenóides**. 2009. 105p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphabneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.430-433, 2009.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr.**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. J. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.79-82, 1999.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **An. bras. Demartol.**, v.78, n.5, p.525-243, 2003.

MANHEZI, A. C.; BACHION, M. M.; PEREIRA, A. L. Utilização de ácidos graxo essenciais no tratamento de feridas. **Rev. Bras. Enferm.**, v.61, n.5, p.620-628, 2008.

MARINHO, R. O. S. **Estudos fitoquímicos da espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em dermocosmética**. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MAZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p.97.

MENDES, R. A.; COELHO, A. I. M.; AZEVEDO, R. M. C. Contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.9, p.3933-3938, 2011.

MINETT, T. S. C.; BERTOLUCCI, P. H. F. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. **Rev. Neurociências**, v.8, n.1, p.11-14, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Alimentos regionais brasileiros**. 1ed. Brasília: Ministério de saúde, 2002, 140p.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev. Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.109-122, 2006.

MORAIS, S. M. et al. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Rev. Bras. Plant. Med**, v.15, n.4, p.575-582, 2013.

MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim.**, v.24, p.105-123, 2002.

MORGENSTERN, M. et al. Determination of the Kinetics of Biodiesel Production Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H NMR). **Energy & Fuels**, v.20, p.1350-1353, 2006.

MOURA, B. S. **Transesterificação Alcalina de Óleos vegetais para Produção de Biodiesel: Avaliação Técnica e Econômica**. 2010. 146p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v.32, n.3, p.639-648, 2009.

MOTA, W. M. et al.. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Plant. Med**, v.14, n.4, p.624-628, 2012.

MUKHERJEE, P. K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**. v.14, p. 289-300, 2007.

MUÑIZ-RAMIREZ, A. et al. Antimicrobial activities of diterpene labdane from sedes of *Byrsonima crassifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.12, n.1, p.31-37, 2014.

MUSTAD, V. A. et al. Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women. **Journal of Lipid Research**, v.38, p.459-468, 1997.

NOJIMOTO, I. T. I. et al. Efeitos bacteriostáticos e bactericida de antibióticos sobre as *listeria* spp isolados em Goiânia de pacientes com clínica de aborto repetitivo. **Rev. Pat. Trop.**, v.23, n.1, p.45-59, 1994.

NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxicas e antioxidantes de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, p.718-723, 2008.

PERAZZINI, H.; BITTI, M. T. Recuperação e utilização de resíduos sólidos orgânicos provenientes da indústria de processamentos de frutas na produção de etanol. **Centro Científico Conhecer**, v.6, n.10, p.1-6, 2010.

PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. 2005. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

REDA, S. Y. **ESTUDO COMPARATIVO DE ÓLEOS VEGETAIS SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO**. 2004. 153p. Dissertação (Mestrado em Avaliação Tecnológica de Matérias-Primas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Parâmetros físico-químicos do óleo de milho *in natura* e sob aquecimento calculado pelo programa PROTEUS RMN ¹H. **UEPG: Ci. Exatas terra, Ci. Agr. Eng.**, v. 12, n. 2, p. 31-36, 2006.

REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. G. Chemical and aroma Determination of the Pul and Seeds of Murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, n.3, p. 425-428, 2003.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. 2004. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, Instituto Mauá de Tecnologia, 184 p.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. 1999. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA. 816p.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domíniodo cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.25, n.1, p.102-123, 2001.

SALGADO, J. M. et al. Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.28, n.4, p.922-928, 2008.

SANNOMIYA, M. et al. Multagenic evolution and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. Leaf extracts. **Journal of Pharmacology**, v.112, p.319-326, 2007.

SANNOMIYA, M. et al. Application of liquid chromatography/eletrosplay ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusión of *Byrsonima crass* Niedenzu, Rapid Commun. **Mass. Spectom**, v.19, p.2244-2250, 2005.

SANTOS, R.C. et al. Fatty acid profile and bioactivity from *Annona hypoglauca* seeds oil. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.30, p.2377-2382, 2015.

SANTOS, N. C. et al. . Toxicidade e avaliação de atividade moluscida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Rev.Bras. Bioci.**, v.8, n.4, p.324-329, 2010

SILVA, K. O. **Avaliação das atividades antimicrobianas, aderencia, antioxidante, anti-inflamatória e antinociepiva de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan.** 2011. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011. 96p.

SILVA, S. R. **Perfil dos ácidos graxos, atividade antioxidante e caracterização físico-química do óleo das sementes de três espécies de maracujá cultivadas no estado de Roraima.** 2011. 83p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011. 83p.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks: uma abordagem clínica.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 992p.

SOUZA, L. C. D. et al. Composição química e nutrientes em sementes florestais pente de macaco, flor de paca, itaúba, jatobá e murici manso. **Biosi. J.** v.28, n.3, p.478-483, 2012.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e prevenção da Aterosclerose- Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.88, Suplemento I, 2007.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W.; Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **THE LANCET**, v.358, p.135-138, 2001.

SÚAREZ-MAHECHA, H. et al. Importância de ácidos graxos poli-insaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para nutrição humana. **B. Inst. Pesc.**, v.28, n.1, p.101-110, 2002.

TOSCANO, G.; MALDINI, E.; Analises of physical and chemiscal characteristics of vegetables oils as fuel. **Journal of Agricultural Engineering**, v.38, n.3, p.39-47, 2007.

VANDRUSCOLO, T. P. S. et al. Determinação do teor de óleo presente no murici (*Byrsonima crassifolia* (L.), visando à produção de biodeisel. In: **52 CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA - Química e Inovação: caminho para a sustentabilidade**, Recife, 14-18 out. 2012. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/13/1344-14201.html>> Acessado em: 11 ago. 2015.

VIGLI, G.; et al. Classification of Edible Oils by Employing ³¹P and ¹H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virginian Olive Oils. **J. Agric. Food. Chem.**, v.51, p.5715-5722, 2003.

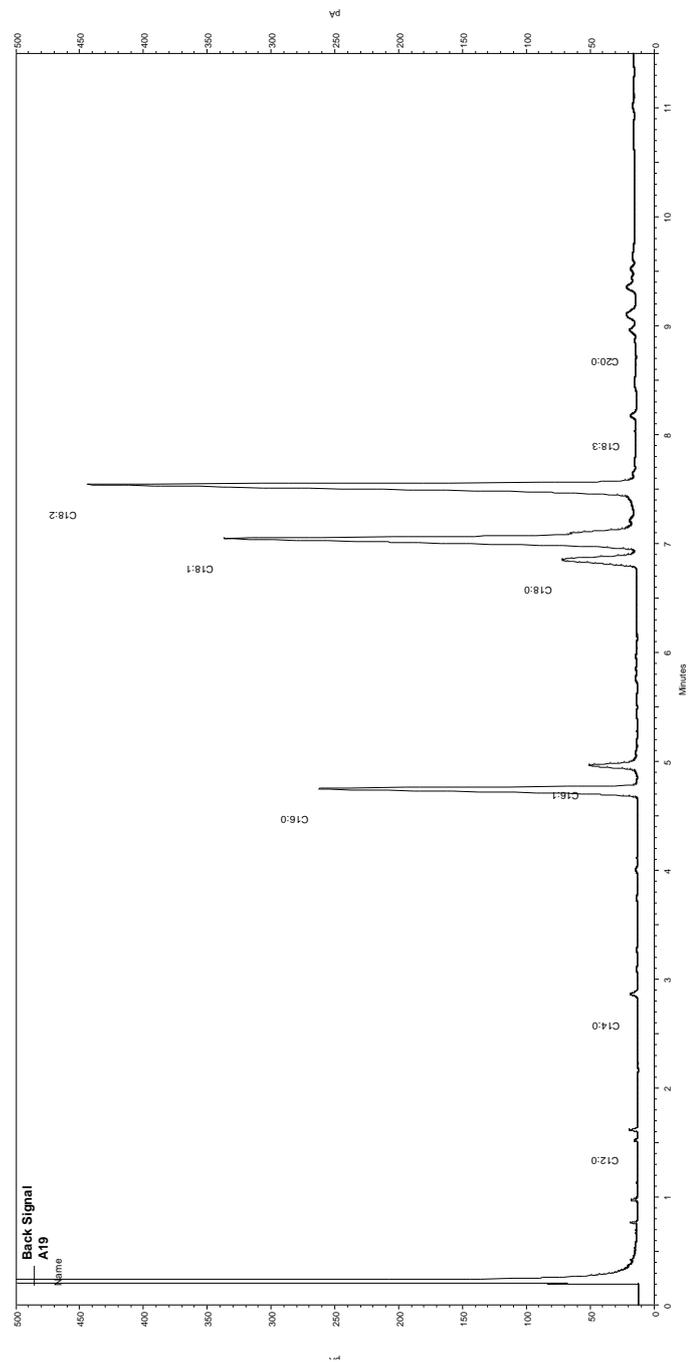
VINUTHA, B. et al. Screening of selected Idian medicinal plants for acetylcolinesterase inhibitory activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, p.359-363, 2007.

VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico.** 2005. 115p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2005.

ZACCHINO, A. S.; GUPTA, M. P.; **Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos**, vol. 85, Corpus Editorial y Distribuidora: Rosario, 2007.

ZAROTSKY, V.; SRAMEK, J.J.; CUTLER, N. R. Galantamine hydroromide: An agent for Alzheimer's disease. **Am. J. Health-Syst Pharm.** , v.60, n.1, p.466-452, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Cromatograma do óleo vegetal das sementes de *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.**Picos**

- C12:0 - Éster metílico ácido láurico
- C14:0 - Éster metílico ácido mirístico
- C16:0 - Éster metílico ácido palmítico
- C16:1 - Éster metílico ácido palmitoleico
- C18:0 - Éster metílico ácido esteárico
- C18:1 - Éster metílico ácido oleico
- C18:2 - Éster metílico ácido linoleico
- C18:3 - Éster metílico ácido linolênico
- C20:0 - Éster metílico ácido araquídico

ANEXO B - Espectro de RMN ¹H integrado do óleo vegetal das sementes de *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.