



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

NÁDIA ELÍGIA NUNES PINTO PARACAMPO

***FINGERPRINTING* E ANÁLISE MULTIVARIADA
APLICADOS AO ESTUDO DE IDENTIDADE E QUALIDADE
DE FITOPRODUTO DE AJURU (*Chrysobalanus icaco* Linnaeus)**

CAMPINAS
2017

NÁDIA ELÍGIA NUNES PINTO PARACAMPO

***FINGERPRINTING* E ANÁLISE MULTIVARIADA
APLICADOS AO ESTUDO DE IDENTIDADE E QUALIDADE
DE FITOPRODUTO DE AJURU (*Chrysobalanus icaco* Linnaeus)**

**Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Ciências**

Orientador: PROF. DR. JOSÉ ALBERTO FRACASSI DA SILVA

Coorientador: PROF. DR. RONEI JESUS POPPI

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA NÁDIA ELÍGIA NUNES PINTO PARACAMPO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOSÉ ALBERTO FRACASSI DA SILVA.**

**CAMPINAS
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8469-1192>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

P21f Paracampo, Nádia Elígia Nunes Pinto, 1972-
Fingerprinting e análise multivariada aplicados ao estudo de identidade e qualidade de fitoproduto de ajuru (*Chrysobalanus icaco* Linnaeus) / Nádia Elígia Nunes Pinto Paracampo. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: José Alberto Fracassi da Silva.

Coorientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. RAPD. 2. Amplificação randômica do DNA polimórfico
. 3. Atividade antiproliferativa. 4. Quimiometria. I. Silva, José Alberto Fracassi da. II. Poppi, Ronei Jesus. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fingerprinting and multivariate analysis applied to the study of identity and quality of ajuru (*Chrysobalanus icaco* Linnaeus) phytoproduct

Palavras-chave em inglês:

RAPD

Random amplification of polymorphic DNA

Antiproliferative assay

Chemometrics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

José Alberto Fracassi da Silva [Orientador]

Marcene Augusto Leal de Oliveira

Patrícia Valderrama

Mary Ann Foglio

Helena Teixeira Godoy

Data de defesa: 28-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (Orientador)

Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira (DQ-UFJF)

Profa. Dra. Patrícia Valderrama (DAQBi-UTFPR)

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy (FEA-UNICAMP)

Profa. Dra. Mary Ann Foglio (FCF-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno **NÁDIA ELÍGIA NUNES PINTO PARACAMPO**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de junho de 2017.

DEDICATÓRIA

Acabou?!... Nem acredito!

Passei por esse doutorado literalmente voando!

Entre a ciência de separação e a quimiometria, foi muito bom saber que tinha sempre para onde voar,... quero dizer, voltar!

Por isso, dedico agora este trabalho no todo de sua concepção àqueles que por afinidade, apesar da separação, permaneceram agrupados a mim, alimentando minha alma com a coragem necessária e suficiente para mais esta conquista. São eles:

Minha filha, Manuela Nunes Pinto Paracampo, razão única e emoção da minha vida.

Meu companheiro de caminhada, Antonio José Souza Paracampo.

Meu pai, Elson Nunes Pinto, que me ensinou a importância de Jesus na história da humanidade.

Minha mãe, Odíneia Moraes Nunes Pinto, com quem aprendi a importância de Jesus, e Maria, na minha vida.

Sem vocês, certamente, tudo teria sido bem mais difícil!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Sra. Maria Neci Nascimento, exemplo de responsabilidade e comprometimento, que durante todo esse tempo cuidou da minha família, dos meus pets, das minhas plantas, da minha casa... Cuidou de mim no sentido mais amplo!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, registro toda minha gratidão aos que confiaram no meu trabalho:

Meus orientadores, Prof. Dr. Fracassi e Prof. Dr. Ronei, pela oportunidade, acolhimento e suporte durante todo processo de orientação.

Meu Conselheiro Acadêmico na Embrapa, Dr. Osmar Lameira, pelo apoio à realização deste projeto.

Dr. Ghilleen Prance, pela colaboração para a ratificação taxonômica dos espécimes estudados.

Dra. Socorro Padilha, pela colaboração com a caracterização genética.

Me. Orivan Teixeira, pela colaboração com as análises de fertilidade do solo e tecido foliar.

Profa. Dra. Mary Ann Foglio, que conheceu nosso trabalho somente no exame de qualificação de área e, acreditando, contribuiu para a avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos.

Aos que “meteram a mão na massa”:

Minha sogra, Alzira Paracampo, autêntica representante do conhecimento tradicional, pelo auxílio na coleta de amostras na Ilha do Marajó.

Meu marido Antonio Paracampo, pela coleta de amostras em Outeiro, Acará e Ilha do Marajó.

João de Oliveira, Expedito da Silva Filho e Olaíde Terra, pelo auxílio na coleta de amostras nas demais localidades.

Conceição Paixão e Dra. Julieta Neta, pela colaboração na etapa de tratamento das amostras e análises farmacognósticas, bem como pela supervisão dos estagiários da Embrapa Amazônia Oriental que estiveram conosco nessa etapa, e aos quais estendo esse agradecimento: Alessandra Sobrinho, Trícia Noronha, Jeane Pereira, Daiana Correa, Daiane Correa, Breno Thomaz, Elisa Moraes, André Cavalcante e Rafael Marlon de Assis.

Dra. Rafaella Mattietto e Dra. Laura Abreu, por compartilharem comigo seus conhecimentos sobre delineamento experimental.

Joseane Raiol, por toda colaboração na área de botânica e por proporcionar o contato com o Herbário de Kew.

Ricardo Pereira, Aline Coelho e Hugo Loureiro, que ofereceram todo suporte necessário ao desenvolvimento deste trabalho na Unicamp.

Fabrcio Ferreira e Caio da Silva, pelas anlises por espectrometria de massas e por compartilharem seus conhecimentos comigo.

Membros titulares e suplentes das bancas de qualificao de rea e de defesa, Profa. Dra. Mary Ann Foglio, Profa. Dra. Carla Bottoli, Prof. Dr. Marcone de Oliveira, Profa. Dra. Patricia Valderrama e Profa. Dra. Helena Godoy, Profa. Dra. Adriana Rossi, Prof. Da. Jos Luiz da Costa, Prof. Dr. Edenir Pereira Filho, pelo tempo dedicado a avaliao deste trabalho ou pelo animo em poder contribuir.

Aos que doaram um pouco do seu tempo em favor deste projeto:

Camila Campos, Francisco de Azambuja, Kelly Souza, Gabriela Almeida, Humberto Machado, Luciana Oliveira, Priscila da Silva, Leonria Souza, agradeo por toda generosidade.

Antonio Guilherme Campos, pela elaborao do mapa de coleta.

Prof. Dr. Jos Otvio Carrera Silva Jr. (ICS/UFPA), pelos esclarecimentos em farmacotcnica.

Aos facilitadores de burocracia:

Izabel Calasso (Bel), Liza Barros, Lvia Holanda e Jos Ribamar Santos (Pel).

Aos amigos queridos que fiz, alm dos muitos j citados acima:

Grazielle Setti, Maria Lemos, Alieth Cassava, Richard Piffer, Abdul Ismail, Amilton de Oliveira, Thiago Pessoa, Prof. Dr. Dosil P. de Jesus, Prof. Dr. Pedro Volpe, pelas boas horas de conversas boas.

Por fim, meu reconhecimento a:

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, pela oportunidade de realizao do curso de doutorado e pelo apoio financeiro para a realizao desta pesquisa.

Universidade Estadual de Campinas, em especial ao seu renomado corpo docente, por toda inspirao!

“Creio que a verdade é perfeita para a matemática, a química, a filosofia, mas não para a vida. Na vida contam mais a ilusão, a imaginação, o desejo, a esperança.”

Ernesto Sábato

RESUMO

Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae) é uma espécie polimórfica, amplamente utilizada na medicina popular brasileira, cujas investigações químicas e farmacológicas têm revelado resultados promissores. Entretanto, a composição química de extratos à base de plantas pode ser influenciada pelas condições ambientais, pela genética ou por uma combinação de ambas. Nesse contexto, torna-se essencial o estabelecimento de padrões de identidade e perfis de controle de qualidade do extrato de *C. icaco* para garantir a confiabilidade e repetibilidade das pesquisas farmacológicas. Para isso, foi adotada uma abordagem multidisciplinar, integrando química analítica, genética molecular e farmacologia na avaliação de 25 espécimes silvestres de *C. icaco*, procedentes de 15 municípios do Pará (Brasil). As amostras foram coletadas durante as estações de maior e menor precipitação pluviométrica. Inicialmente, utilizou-se cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UHPLC-DAD) para estabelecer *fingerprint* do extrato hidroalcoólico de *C. icaco*. Também foi utilizada cromatografia eletrocínética micelar de fluxo invertido (RF-MEKC) para estabelecer *fingerprint* do extrato hidroalcoólico de *C. icaco*, como uma técnica alternativa. Esses dados foram submetidos à análise multivariada e dois modelos foram obtidos a partir da análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Em seguida, as técnicas de UHPLC-DAD e espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS) foram utilizadas para identificar os principais compostos responsáveis pela separação em classes. As amostras foram categorizadas em duas classes: Classe 1 (morfotipo vermelho) e Classe 2 (morfotipos branco e preto). Esses resultados revelaram a existência de dois quimiotipos, o que foi reforçado pela caracterização genética. Adicionalmente, identificou-se correlação entre os dados de *fingerprint* e os das análises de fertilidade do solo e de tecido foliar. De maneira geral, os extratos hidroalcoólicos de *C. icaco* apresentaram efeito citostático, bem como alguns extratos foram seletivos contra células tumorais de ovário (OVCAR-3), cólon (HT-29), pulmão (NCI-H460) e leucemia (K-562). A constatação mais importante deste trabalho foi a de que os três morfotipos de *C. icaco* não são todos fitoequivalentes uns aos outros.

ABSTRACT

Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae) is a polymorphic species, widely used in Brazilian popular medicine. Researchers reported very promising results in chemical and pharmacological investigations. However, the chemical composition of herbal extracts can be influenced by both, environmental conditions and genetics. In this context, it is essential to establish identity standards and quality control profiles of the *C. icaco* extract that ensure the reliability and repeatability of the pharmacological research. For this purpose, a multidisciplinary approach was adopted, integrating analytical chemistry, molecular genetics and pharmacology in the evaluation of 25 wild specimens of *C. icaco* from 15 municipalities of Pará State (Brazil). Samples were collected in periods of high and low rainfall. Initially, ultra-high efficiency liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD) was used to establish the fingerprint of the *C. icaco* hydroalcoholic extract. Reverse-flow micellar electrokinetic chromatography (RF-MEKC) was also used to establish fingerprint of the *C. icaco* hydroalcoholic extract, as an alternative technique. The acquired data were submitted to multivariate analysis and two models were obtained from principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Subsequently, UHPLC-DAD and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) techniques were used to identify the main compounds responsible for class separation. The samples were categorized into two classes: Class 1 (red morphotype) and Class 2 (white and black morphotypes). These results pointed to the existence of two chemotypes, which was reinforced by the genetic characterization. Additionally, the fingerprint data presented a correlation with soil fertility and leaf tissue data. In general, *C. icaco* hydroalcoholic extracts showed cytostatic effect, and some extracts were selective against ovarian (OVCAR-3), colon (HT-29), lung (NCI-H460) and leukemia (K-562) cell lines. The most important finding in this study was that the three morphotypes of *C. icaco* are not all phytoequivalent to each other.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ajuru (<i>Chrysobalanus icaco</i> L.). (a) Arbusto. (b) Folhas. (c) Fruto. (d) Inflorescência.....	37
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>C. icaco</i>	37
Figura 3 - Exsicatas ilustrando detalhes dos ramos de: (a) <i>Chrysobalanus icaco</i> L. (Chrysobalanaceae) e (b) <i>Eugenia rotundifolia</i> Casar (Myrtaceae)	38
Figura 4 - Estruturas químicas de compostos fenólicos encontrados em folha de <i>C. icaco</i>	39
Figura 5 - Mapa da área de coleta dos 25 espécimes silvestres de <i>C. icaco</i> e solo, ilustrando 24 pontos georreferenciados em 15 municípios do estado do Pará, Brasil.....	46
Figura 6 - Amostras de solo coletadas no hábitat dos 25 espécimes de <i>C. icaco</i> , durante o período chuvoso. Amostras após etapa de preparo para análise de fertilidade.....	48
Figura 7 - Etapas do beneficiamento das folhas de <i>C. icaco</i> após a operação de pré-limpeza. (a) Lavagem. (b) Centrifugação em secador giratório de salada. (c) Secagem prévia à temperatura ambiente. (d) Secagem em estufa com circulação forçada a 45 ± 2 °C por 10 dias. (e) Moagem (malha 20 mesh). (f) Quarteamento da amostra (g) Embalagem em saco de PEAD.....	52
Figura 8 - Procedimento de obtenção do extrato hidroalcoólico (tintura) de folhas de <i>C. icaco</i> (a) Extração em mesa agitadora pendular com velocidade de agitação de 90 ± 2 bpm, à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e ao abrigo da luz. (b) Filtração do extrato em papel de filtro qualitativo (80 g/m^2) sob pressão reduzida.....	54
Figura 9 - Variações morfológicas quanto à cor do fruto maduro observadas entre os espécimes de <i>C. icaco</i> estudados. (a) Ajuru-branco – fruto amarelo-pálido. (b) Ajuru-preto – fruto roxo. (c) Ajuru-vermelho – fruto vermelho ou rosado	55
Figura 10 - Variações morfológicas quanto ao hábito da planta observadas entre os espécimes de <i>C. icaco</i> estudados. (a) Ajuru-preto, arbusto com 1,5 m de altura. (b) Ajuru-preto, árvore. (c) Ajuru-vermelho, arbusto rasteiro. (d) Ajuru-preto, arbusto com 4 m de altura. (e) Ajuru-preto e Ajuru-branco, árvores crescendo lado a lado como se fossem um único indivíduo	55

Figura 11 - Exsicatas de <i>C. icaco</i> (a) Ajuru-vermelho, IAN 191979. (b) Ajuru-branco, IAN 191976. (c) Ajuru-preto, IAN191983.....	56
Figura 12 - <i>Fingerprints</i> UHPLC-DAD representativos de extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>C. icaco</i> para cada morfotipo (cor do fruto) (extratos BJ1, VI1 e BR1). Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18; temperatura da coluna: 30 °C; fase móvel: (A) 1% ácido fórmico em água e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,3 mL/min; volume de injeção: 1 µL; tempo de análise: 5,4 min; detecção: 273 nm. Os picos característicos e majoritários utilizados nos cálculos de desvios padrão relativo no procedimento de validação do método estão identificados com os algarismos arábicos 6, 10 e 16 e seus respectivos tempos de retenção	63
Figura 13 - Espectros de fragmentação MS/MS do pico 6, modo negativo (ESI-), do <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de <i>C. icaco</i> . (a) Íon precursor. (b) Íon produto. (c) Estrutura química da miricetina 3-O-glucuronideo.....	65
Figura 14 - Espectros de fragmentação MS/MS do pico 10, modo negativo (ESI-), do <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de <i>C. icaco</i> . (a) Íon precursor. (b) Íon produto	66
Figura 15 - Espectros de fragmentação MS/MS do pico 16, modo negativo (ESI-), do <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de <i>C. icaco</i> . (a) Íon precursor. (b) Íon produto	66
Figura 16 - Cromatogramas de íons totais representativos de extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>C. icaco</i> para cada morfotipo (cor do fruto) (extratos BJ1, VI1 e BR1). Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18; temperatura da coluna: 30 °C; fase móvel: (A) 0,1% ácido fórmico em água e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,3 mL/min; volume de injeção: 1 µL; tempo de análise: 6 min; modo de ionização: negativo. Os picos identificados pelas letras a, b e c correspondem aos picos 6, 10 e 16, definidos pela análise por DAD como característicos, respectivamente.....	74
Figura 17 - <i>Fingerprints</i> CE-DAD representativos de extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>C. icaco</i> para cada morfotipo (cor do fruto) (extratos BJ1, VI1 e BR1). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 58,7 cm x 50 µm (i.d.), 50,0 cm de comprimento efetivo. Eletrólito de corrida: 50 mmol/L H ₃ PO ₄ (pH 2,5) e 16 mmol/L SDS; temperatura: 20 °C; voltagem: -20 kV; injeção hidrodinâmica: 25 mbar por 6s; tempo de análise: 30 min; detecção: 254 nm. Os picos característicos utilizados nos cálculos de desvios padrão relativo no procedimento de validação do método estão identificados com os algarismos arábicos 1 e 2, seguidos por seus respectivos tempos de migração	95

Figura 18 - Perfil do gel de agarose demonstrando o polimorfismo gerado pelo primer OPA-10 nos 25 espécimes de *C. icaco*. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produtos de amplificação do DNA (1,5 h a 100 V) corados com brometo de etídeo. M = padrão DNA Ladder 100 bp..... 102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Teor de umidade em amostras de folhas de <i>C. icaco</i>	57
Gráfico 2 - Teor de cinzas totais em amostras de folhas de <i>C. icaco</i>	57
Gráfico 3 - Teor de resíduo seco em amostras de extrato hidroalcoólico 70% (tintura) de folhas de <i>C. icaco</i>	57
Gráfico 4 - Gráfico de <i>scores</i> da análise de componentes principais (PCA) – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição e agrupamento dos dados de UHPLC-DAD das 48 amostras de <i>C. icaco</i> , que descreve 82,19% do total de variância dos dados. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas)	68
Gráfico 5 - Gráfico de <i>loadings</i> da análise de componentes principais (PCA) – visualização das variáveis responsáveis pela separação de grupos em PC3. A variável assinalada corresponde ao composto 16 no <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de <i>C. icaco</i>	69
Gráfico 6 - Gráfico de <i>scores</i> da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) – visualização 3D (LV1xLV2xLV3) da distribuição dos dados de calibração das amostras de <i>C. icaco</i> . Os símbolos indicam Classe 1 (triângulos invertidos) e Classe 2 (círculos)	70
Gráfico 7 - Gráfico de <i>scores</i> da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) – visualização da capacidade preditiva do modelo PLS-DA para <i>C. icaco</i> . As amostras que caíram acima da linha tracejada superior foram consideradas pertencentes à Classe 1. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (quadrados) e morfotipo branco (triângulos). O limiar de discriminação foi de 0,5111.....	71
Gráfico 8 - Análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA). (a) Gráfico de <i>loadings</i> – visualização das variáveis com maior magnitude e fortemente responsáveis pela separação em LV1. As variáveis assinaladas correspondem aos compostos 6 e 10 no <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD. (b) Gráfico VIP – visualização da projeção da importância da variável (VIP). Os asteriscos vermelhos indicam as variáveis com as maiores pontuações VIP e que correspondem aos compostos 6, 10 e 16 no <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de <i>C. icaco</i>	72

Gráfico 9 - Análise de componentes principais (PCA). (a) Gráfico de <i>scores</i> – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição e agrupamento dos dados de UHPLC-ESI-MS das 48 amostras de <i>C. icaco</i> , que descreve 68,77% do total de variância dos dados. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas). (b) Gráfico de <i>loadings</i> – visualização das variáveis responsáveis pela separação de grupos em PC2. As variáveis assinaladas representam as com maior magnitude e a variável 273 corresponde ao composto 16 no <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD	75
Gráfico 10 - Análise de fertilidade do solo – teor de potássio, determinado por fotometria de chama, das 47 amostras de solo coletadas no habitat dos espécimes de <i>C. icaco</i> durante o período chuvoso e menos chuvoso	79
Gráfico 11 - Análise de fertilidade do solo – teor de matéria orgânica, determinado por volumetria, das 47 amostras de solo coletadas no habitat dos espécimes de <i>C. icaco</i> durante o período chuvoso e menos chuvoso	80
Gráfico 12 - Análise de tecido foliar – teor de zinco, determinado por MP-AES, das 48 amostras de folhas de <i>C. icaco</i> coletadas durante o período chuvoso e menos chuvoso	80
Gráfico 13 - Gráfico de <i>scores</i> da análise de componentes principais (PCA) – visualização (PC1xPC2) da distribuição dos dados de <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD das 46 amostras de <i>C. icaco</i> , que descreve 73,31% do total de variância dos dados. Cada ponto representa uma amostra individual. As amostras de mesma procedência estão interligadas por um segmento de reta, onde as extremidades correspondem às amostras coletadas no período chuvoso (1) e menos chuvoso (2).....	82
Gráfico 14 - Gráfico de <i>loadings</i> da análise de componentes principais (PCA) – visualização das variáveis responsáveis pela distribuição das amostras em PC2. As variáveis assinaladas correspondem aos compostos 6 e 10 no <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de <i>C. icaco</i>	83
Gráfico 15 - Gráfico de contorno obtido para avaliação do número de picos em função das concentrações de ácido fosfórico [H ₃ PO ₄] e dodecil sulfato de sódio [SDS] na solução de separação em RF-MEK. Primeiro delineamento composto central.....	91
Gráfico 16 - Gráfico de contorno obtido para avaliação do número de picos em função das concentrações de ácido fosfórico [H ₃ PO ₄] e dodecil sulfato de sódio [SDS] na solução de separação em RF-MEK. Segundo delineamento composto central.....	93

Gráfico 17 - Gráfico de <i>scores</i> da análise de componentes principais (PCA) – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição e agrupamento dos dados de CE-DAD das 48 amostras de <i>C. icaco</i> , que descreve 68,23% do total de variância dos dados. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas).	97
Gráfico 18 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard, com base nas 84 bandas polimórficas amplificadas nas 25 amostras de <i>C. icaco</i> . Similaridade genética média (sg_m) = 0,38. Coeficiente de correlação cofenética (r) = 0,8914; $p < 0,00001$. COD GEN – relação de códigos adotados no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental	103
Gráfico 19 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os três morfotipos cor do fruto, a partir das médias das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard para as 25 amostras de <i>C. icaco</i> . Similaridade genética média (sg_m) = 0,36. Coeficiente de correlação cofenética (r) = 0,9971; $p < 0,00001$	104
Gráfico 20 - Atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorubicina em cultura de células tumorais humanas, relacionando a porcentagem de crescimento celular à concentração de extrato, após 48 horas de incubação	111
Gráfico 21 - Atividade antiproliferativa do extrato CM2 de <i>C. icaco</i> em cultura de células tumorais humanas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48 h	112
Gráfico 22 - Atividade antiproliferativa do extrato PJ2 de <i>C. icaco</i> em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48 h	112
Gráfico 23 - Atividade antiproliferativa do extrato RG2 de <i>C. icaco</i> em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48 h	113
Gráfico 24 - Atividade antiproliferativa do extrato RP1 de <i>C. icaco</i> em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48 h	113
Gráfico 25 - Atividade antiproliferativa do extrato VI1 de <i>C. icaco</i> em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48 h	114

Gráfico 26 - Gráfico de *scores* da análise de componentes principais (PCA) – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição dos dados de GI₅₀ (µg/mL) referentes à atividade antiproliferativa das 48 amostras de *C. icaco*. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas) 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre as amostras de <i>Chrysobalanus icaco</i> L. utilizadas no estudo.....	49
Tabela 2 - Dados de conformidade do sistema e validação do método de <i>fingerprint</i> de extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>C. icaco</i> (extrato BE1) por UHPLC-DAD	62
Tabela 3 - Projeção da importância da variável (VIP) para variáveis discriminatórias (<i>threshold</i> = 1)	73
Tabela 4 - Níveis codificados e reais dos fatores do primeiro delineamento composto central.....	87
Tabela 5 - Ensaios do primeiro delineamento composto central.....	87
Tabela 6 - Níveis codificados e reais dos fatores do segundo delineamento composto central	88
Tabela 7 - Ensaios do segundo delineamento composto central.....	88
Tabela 8 - Efeitos e interações calculados para o número de picos no primeiro delineamento composto central.....	89
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para o número de picos do primeiro delineamento composto central.....	90
Tabela 10 - Efeitos e interações calculados para o número de picos no segundo delineamento composto central	91
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para o número de picos do segundo delineamento composto central	92
Tabela 12 - Figuras de mérito avaliadas para o método de <i>fingerprint</i> de extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>C. icaco</i> (extrato BE1) por CE-DAD.....	94
Tabela 13 - Identificação dos 18 <i>primers</i> RAPD selecionados e aplicados às 25 amostras de <i>C. icaco</i> com o número de bandas geradas e taxa de polimorfismo	101

Tabela 14 - Grupos formados pelo método de otimização de Tocher a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard, com base nas 84 bandas polimórficas amplificadas nas 25 amostras de <i>C. icaco</i>	104
Tabela 15 - Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> e suas densidades de inoculação (D.I.)	106
Tabela 16 - Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>C. icaco</i> sobre diferentes linhagens celulares, representada pela concentração necessária para inibir 50% (GI ₅₀) do crescimento celular.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

amu	Unidade de massa atômica (<i>Atomic Mass Unit</i>)
ANOVA	Análise de variância (<i>Analysis Of Variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	Unidades arbitrárias (<i>Arbitrary Units</i>)
BGE	Eletrólito de corrida (<i>Background Electrolyte</i>)
BSA	<i>Albumina do soro bovino (Bovine Serum Albumin)</i>
C	Absorbância do controle de células
CCC	Coeficiente de Correlação Cofenética
CCD	Delineamento composto central (<i>Central Composite Design</i>)
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>Collision-Induced Dissociation</i>)
COW	Correlação de deformação otimizada (<i>Correlated Optimized Warping</i>)
D.I.	Densidade de Inoculação
DAD	Detector de arranjo de diodos (<i>Diode Array Detector</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOE	Planejamento de experimentos (<i>Design Of Experiments</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EOF	<i>Fluxo eletrosmótico (Electroosmotic Flow)</i>
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (<i>Electrospray Ionization</i>)
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GI ₅₀	Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular (<i>Growth Inhibition</i>)
GPS	Sistema de posicionamento global (<i>Global Positioning System</i>)

HPLC	Cromatografia líquido de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
i.d.	Diâmetro interno (<i>Internal Diameter</i>)
LV	Variável latente (<i>Latent Variable</i>)
MDR	Resistente a múltiplas drogas (<i>Multiple Drug Resistance</i>)
MP-AES	Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas (<i>Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometry</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
MT	Tempo de migração (<i>Migration Time</i>)
PC	Componente principal (<i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
RAPD	Amplificação ao acaso de DNA polimórfico (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RF-MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar de fluxo invertido (<i>Reversed-Flow Micellar Electrokinetic Chromatography</i>)
RMT	Tempo de migração relativo (<i>Relative Migration Time</i>)
RPA	Área de pico relativa (<i>Relative Peak Area</i>)
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRT	Tempo de retenção relativo (<i>Relative Retention Time</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino

SNC	Sistema Nervoso Central
SNR	Relação sinal-ruído (<i>Signal-to-Noise Ratio</i>)
SRB	Sulforrodamina B
T	Média da absorbância da célula tratada
T ₀	Média da absorbância da célula no tempo zero da adição dos extratos
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TE	Tris/EDTA
TGI	Concentração capaz de inibir em 100% o crescimento celular (<i>Total Growth Inhibition</i>)
TIC	Cromatograma de íons totais (<i>Total Ion Chromatogram</i>)
UHPLC	Cromatografia líquido de ultra-alta eficiência (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
UPGMA	Método das médias aritméticas não-ponderadas (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>)
UV-VIS	Espectroscopia no Ultravioleta-Visível
VIP	Projeção da importância da variável (<i>Very Importance in the Projection</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. REFERENCIAL TEÓRICO	31
3.1. Plantas medicinais e fitoterápicos	31
3.2. Controle de qualidade de plantas medicinais e fitoprodutos	32
3.3. Técnicas analíticas aplicadas para a obtenção de <i>fingerprint</i>	33
3.3.1. Métodos quimiométricos	35
3.4. <i>Chrysobalanus icaco</i> Linnaeus.....	36
3.4.1. Potencial químico e biológico: estado da arte	38
4. COLETA, BENEFICIAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO, OBTENÇÃO DO FITOPRODUTO E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	40
4.1. Material e métodos	40
4.1.1. Coleta de material botânico para estudo químico	40
4.1.2. Coleta de material botânico para estudo taxonômico	47
4.1.3. Coleta de material botânico para estudo genético	47
4.1.4. Coleta de solo para estudo de fertilidade	47
4.1.5. Beneficiamento do material botânico	52
4.1.6. Obtenção do extrato hidroalcoólico (tintura)	53
4.1.7. Análises físico-químicas.....	53
4.2. Resultados e discussão.....	54
4.2.1. Avaliação taxonômica	54
4.2.2. Análises físico-químicas.....	56
5. PADRÃO DE IDENTIDADE DE <i>Chrysobalanus icaco</i> L. DETERMINADO PELA APLICAÇÃO DE <i>FINGERPRINTING</i> CROMATOGRÁFICO ASSOCIADO À QUIMIOMETRIA	58
5.1. Reagentes	58
5.2. Material e métodos	58
5.2.1. Preparo da amostra	58
5.2.2. Condições UHPLC-DAD	58
5.2.3. Condições ESI-MS/MS.....	59
5.2.4. Análise quimiométrica	59
5.2.5. Tratamento de resíduos	60
5.3. Resultados e discussão	60

5.3.1. Otimização do método <i>fingerprinting</i> por UHPLC-DAD.....	60
5.3.2. Validação do método <i>fingerprinting</i> por UHPLC-DAD.....	61
5.3.3. <i>Fingerprints</i> UHPLC-DAD de <i>C. icaco</i>	63
5.3.4. Caracterização dos três picos majoritários por UHPLC-DAD-ESI-MS/MS	64
5.3.5. Análise quimiométrica	67
5.3.5.1. Análise multivariada dos dados gerados pelo DAD	67
5.3.5.1.1. Análise de componentes principais.....	67
5.3.5.1.2. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais	69
5.3.5.2. Análise multivariada dos dados gerados pelo ESI-MS	73
6. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PROCEDÊNCIA E DA SAZONALIDADE DO MATERIAL BOTÂNICO SOBRE O <i>FINGERPRINT</i> UHPLC-DAD DE <i>Chrysobalanus icaco</i> L. E CORRELAÇÃO DESSES DADOS COM OS DAS ANÁLISES DE FERTILIDADE DE SOLO E DE TECIDO FOLIAR	76
6.1. Reagentes.....	76
6.2. Material e métodos	76
6.2.1. Análise quimiométrica dos dados de <i>fingerprint</i> UHPLC-DAD	76
6.2.2. Análise de fertilidade de solo	76
6.2.3. Análise de tecido foliar	77
6.2.4. Análise quimiométrica dos dados de fertilidade do solo e tecido foliar	77
6.2.5. Tratamento de resíduos	78
6.3. Resultados e discussão.....	78
6.3.1. Análise química de fertilidade de solo e de tecido foliar	78
6.3.2. Análise exploratória dos dados de fertilidade de solo e de tecido foliar	80
6.3.3. <i>Fingerprint</i> x procedência x sazonalidade x fertilidade do solo x tecido foliar	81
7. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR DE FLUXO INVERTIDO USANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA DETERMINAÇÃO DE <i>FINGERPRINT</i> DE <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	85
7.1. Reagentes.....	85
7.2. Material e métodos	85
7.2.1. Preparo da amostra	85
7.2.2. Condições CE-DAD	85
7.2.3. Análise quimiométrica	88
7.2.4. Tratamento de resíduos	88
7.3. Resultados e discussão	89

7.3.1. Primeiro delineamento composto central	89
7.3.2. Segundo delineamento composto central	91
7.3.3. Validação do método <i>fingerprinting</i> por CE-DAD	93
7.3.4. <i>Fingerprints</i> CE-DAD de <i>C. icaco</i>	94
7.3.5. Análise exploratória dos dados	95
8. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE <i>Chrysobalanus icaco</i> L. POR MEIO DE MARCADORES DE POLIMORFISMO DO DNA AMPLIFICADO AO ACASO	98
8.1. Reagentes	98
8.2. Material e métodos	98
8.2.1. Extração e quantificação de DNA	98
8.2.2. PCR	99
8.2.3. Tratamento de resíduos	100
8.3. Resultados e discussão	100
9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA IN VITRO DOS EXTRATOS DE <i>Chrysobalanus icaco</i> L. EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS.....	105
9.1. Reagentes	105
9.2. Material e métodos	105
9.2.1. Ensaio antiproliferativo.....	105
9.2.2. Tratamento de resíduos	108
9.3. Resultados e discussão	108
9.3.1. Atividade antiproliferativa	108
9.3.2. Análise exploratória dos dados	114
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
10.1. Conclusões	116
10.2. Perspectivas futuras.....	117
11. GLOSSÁRIO.....	118
12. REFERÊNCIAS	121
APÊNDICE A	134
APÊNDICE B	137
APÊNDICE C	144
APÊNDICE D.....	149
APÊNDICE E	157

ANEXO 1	173
ANEXO 2	175
ANEXO 3	180
ANEXO 4	182
ANEXO 5	184

1. INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus é uma doença que afeta mais 415 milhões de adultos no mundo e cuja estimativa de custos com o tratamento é superior a 673 bilhões de dólares¹. No Brasil, calcula-se que esse número já ultrapasse nove milhões de pessoas maiores de 18 anos e permaneça em ascensão, como na maioria dos países do mundo, em especial nos países em desenvolvimento onde a medicina tradicional à base de plantas desempenha um importante papel e, às vezes, é a principal fonte de cuidados com a saúde^{2,3}.

Frente a essa realidade, é crescente o interesse no estudo sobre plantas com potencial hipoglicemiante identificado pelo conhecimento tradicional^{4,5,6,7,8,9,10,11}. Dentre essas plantas, o “ajuru” (*Chrysobalanus icaco* Linnaeus, Chrysobalanaceae) é uma espécie nativa da Amazônia e Mata Atlântica^{12,13}, cuja folha, raiz ou casca do caule é especialmente utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de diabetes^{14,15,16}. Também conhecida como “ajuru-vermelho”, “ajuru-branco” e “ajuru-preto”, *C. icaco* é uma espécie única polimórfica que varia principalmente na cor e tamanho do fruto, forma e tamanho da folha, e hábito de crescimento. Essas diferentes formas ou morfotipos crescem lado a lado, sem qualquer separação ecológica e sem ser possível subdividir essa espécie com base apenas em material de herbário¹².

O efeito antidiabético de extratos de *C. icaco* tem sido reportado^{17,18,19,20}, bem como pesquisas sobre suas propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva²¹, antileishmania²², antioxidante^{20,21,23,24,25}, genotóxica^{19,25}, antimicrobiana²⁶, anti-HIV²⁷, antiangiogênica²⁸, anticâncer e antiresistência a múltiplas drogas²⁹, e prevenção do ganho de peso^{17,18}. Em estudos fitoquímicos, a presença de grupos químicos farmacologicamente importantes como flavonoides e terpenoides^{16,17,23,26,27,30,31} foi identificada.

No entanto, apesar dos muitos resultados promissores, sabe-se que a eficácia de um extrato à base de plantas é normalmente derivada das interações sinérgicas entre seus múltiplos constituintes químicos. Além disso, a biossíntese de metabólitos secundários é frequentemente afetada pelas condições ambientais, pela genética ou por uma combinação de ambas³², o que pode originar variações no conteúdo total e/ou nas proporções relativas desses constituintes, alterando o efeito

terapêutico desejado^{33,34}. Nesse contexto, o estabelecimento de padrões de identidade e perfis de controle de qualidade de extratos de *C. icaco* para garantir a confiabilidade e repetibilidade das investigações farmacológicas, torna-se essencial.

Com esse propósito, adotou-se abordagem sistêmica e multidisciplinar, integrando química analítica, genética molecular e farmacologia na avaliação de 25 espécimes silvestres de *C. icaco*, procedentes de 15 municípios do estado do Pará, Brasil, e coletados durante as estações de maior e menor precipitação pluviométrica.

Este trabalho representa uma etapa imprescindível para a aquisição de conhecimento consistente, capaz de responder os seguintes questionamentos:

- Os diferentes morfotipos de *C. icaco* fornecem extratos hidroalcoólicos semelhantes?
- A biossíntese dos metabólitos secundários (em especial polifenóis) em folhas de *C. icaco* é influenciada pela procedência geográfica e/ou a sazonalidade do material botânico?

Este projeto de pesquisa foi autorizado em conformidade com a legislação nacional em vigência por ocasião do início do trabalho e está incluído na Autorização Especial de Acesso e de Remessa da Embrapa para fins de Pesquisa Científica junto ao IBAMA (nº 002/2008), sob Processo nº 02001.002715/2014-26 (Anexo 1).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar parâmetros de identidade e qualidade de fitoproduto (tintura) de folhas de *C. icaco*, pela aquisição de *fingerprint* associado à análise multivariada, considerando a procedência e a sazonalidade do material botânico.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer teor de cinzas totais e umidade, como parâmetros mínimos de identidade e qualidade da droga vegetal, respectivamente; e resíduo seco, como parâmetro de qualidade do extrato hidroalcoólico.
- Desenvolver e validar método analítico para aquisição de perfil cromatográfico padrão (*fingerprint*) do extrato hidroalcoólico, utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UHPLC-DAD).
- Construir modelo de classificação, utilizando métodos quimiométricos, a partir dos dados de *fingerprint* UHPLC-DAD.
- Caracterizar os compostos majoritários do extrato hidroalcoólico utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) associada à detecção por espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS).
- Avaliar a influência da procedência e da sazonalidade do material botânico sobre o *fingerprint* UHPLC-DAD e correlacionar esses dados aos de análises químicas de fertilidade do solo e de tecido foliar.
- Desenvolver e validar método analítico para aquisição de perfil eletroforético padrão (*fingerprint*) do extrato hidroalcoólico por cromatografia eletrocínética micelar de fluxo invertido (RF-MEKC), utilizando detecção por arranjo de diodos (CE-DAD), e realizar análise exploratória nos dados de *fingerprint*.
- Caracterizar os genótipos de *C. icaco* por marcadores de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD).
- Avaliar a atividade antiproliferativa do extrato hidroalcoólico de *C. icaco* contra células tumorais humanas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Plantas medicinais e fitoterápicos

A fitoterapia popular é uma prática tradicional muito antiga, adotada principalmente por aqueles que não têm fácil acesso às práticas de saúde oficiais. Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem recomendando o uso de plantas medicinais e seus derivados pelos sistemas públicos de saúde como forma de reduzir os custos dos programas de atenção primária à saúde e ampliar o número de beneficiários^{35,36}.

No Brasil, o governo federal aprovou em 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”³⁷.

A biodiversidade brasileira aliada a um conhecimento etnofarmacológico expressivo, resultante da miscigenação cultural de indígenas, europeus e africanos, constitui vantagem importante ao estudo sistematizado e multidisciplinar (botânica, agronomia, química, farmácia, entre outras áreas do conhecimento), visando à validação do uso de plantas medicinais. No entanto, ainda são poucas as pesquisas que compreendem toda a cadeia produtiva de determinada espécie de interesse, possibilitando o desenvolvimento de um novo fitoterápico, em conformidade com as exigências da legislação vigente³⁸.

A RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a norma que regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil, exigindo avaliações da matéria-prima vegetal, dos derivados vegetais e do fitomedicamento, o que inclui identificação botânica da espécie usada, padrão de identidade e qualidade (PIQ), e comprovação de eficácia e segurança, que validem as indicações terapêuticas propostas³⁹.

O PIQ de um produto é o conjunto de características qualitativas e/ou quantitativas, que define a qualidade aceitável do produto para os fins a que se destina⁴⁰.

A eficácia e a segurança da utilização de uma planta medicinal ou de um fitoterápico, não validados pelo uso tradicional, devem ser comprovadas por meio de ensaios farmacológicos e toxicológicos, *in vitro* e *in vivo*, e ensaios clínicos, que demonstrem a atividade terapêutica prevista e a ausência de efeitos adversos ou tóxicos em seres humanos⁴¹.

Teoricamente, a atividade biológica apresentada por um fitocomplexo, como um extrato à base de plantas, pode resultar de interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas entre uma série de componentes quimicamente diversos⁴². Assim, deve-se considerar que o potencial medicinal das plantas é suscetível à influência da diversidade genética e diferenças ecogeográficas ou fatores ambientais (abióticos e bióticos), que exercem efeito na produção e acúmulo desses constituintes químicos, mesmo que não seja de maneira constante sobre o metabolismo da planta como um todo^{32,34}.

Essa variabilidade do mesmo material botânico dificulta o estabelecimento de padrões de referência, tornando-se o principal desafio ao controle de qualidade das plantas medicinais e seus derivados. Contudo, apesar da complexidade envolvida, trata-se de um setor impulsionado por um mercado mundial que tem a previsão de chegar a US\$115 bilhões até o ano 2020⁴³.

3.2. Controle de qualidade de plantas medicinais e fitoprodutos

O controle de qualidade no desenvolvimento de medicamentos de origem vegetal compreende desde a colheita da planta medicinal até a pós-comercialização do fitomedicamento (farmacovigilância), com monitoramento químico contínuo em cada etapa de transformação tecnológica.

Atualmente, é consenso entre as agências reguladoras que a qualidade de amostras complexas de extratos brutos vegetais seja preferencialmente avaliada com base na sua totalidade, e não mais a partir de marcadores químicos definidos como apenas um composto ou uma classe de compostos. Dessa forma, o extrato na íntegra passa a ser considerado como composto ativo, considerando os efeitos sinérgicos entre seus vários constituintes e, portanto, suas propriedades biológicas totais^{33,44,45}.

Neste cenário, a metabolômica não direcionada tem ascendido como uma tendência para o mapeamento químico de fitocomplexos, na qual se prioriza a identificação do subconjunto de metabólitos secundários que caracteriza a diferença entre amostras obtidas em condições ecofisiológicas distintas. O perfil metabólico secundário característico de uma amostra vegetal é definido como “impressão digital” ou *fingerprint* e pode ser empregado como referência no controle de qualidade, tornando-se uma estratégia recomendada pela OMS nas últimas décadas^{33,44,46}.

O *fingerprint* é um padrão comum único da espécie vegetal, gerado a partir de múltiplas amostras, que representa uma abordagem qualitativa para fins de autenticação da espécie, avaliação da qualidade, asseguarção da consistência e estabilidade da droga vegetal e seus derivados; sem a intenção de identificar cada metabólito detectado, mas sim comparar perfis químicos. Essa estratégia está fundamentada no conceito de fitoequivalência, no qual fitoprodutos originados da mesma planta somente podem ser considerados fitoequivalentes se os seus perfis químicos totais forem similares e, de onde se presume, apresentem as mesmas atividades biológicas^{33,45,47,48}.

3.3. Técnicas analíticas aplicadas para a obtenção de *fingerprint*

Um *fingerprint* químico pode ser definido como um conjunto de sinais cromatográficos, eletroforéticos e/ou espectroscópicos adquiridos para amostras complexas de extratos vegetais. Esse conjunto de sinais, representados por dados multivariados, deve refletir todos os metabólitos secundários detectáveis e presentes na amostra em estudo. Portanto, é necessário o uso de técnicas hifenadas de análise, de alto desempenho, que possibilitem a desreplicação de extratos como uma estratégia de racionalização metodológica, evitando o isolamento de substâncias já conhecidas^{46,49}.

Dentre as técnicas de separação, a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) é, atualmente, uma das técnicas mais importantes em química analítica, pois retrata um avanço significativo na instrumentação da cromatografia líquida (LC) e na tecnologia de coluna (tamanho de partícula da coluna e dimensão da coluna), como resposta à busca por análises mais rápidas e eficientes. Essa

evolução fundamenta-se na equação de van Deemter, que correlaciona altura equivalente de prato com velocidade linear e tamanho da partícula; traduzindo-se em um aumento muito significativo na resolução, sensibilidade e eficiência, com resultados mais rápidos e menor consumo de solventes^{50,51}.

Outra técnica potencial empregada para a obtenção de *fingerprint* de extratos vegetais tem sido a eletroforese capilar (CE), que apresenta como vantagens alta eficiência de separação, seletividade, flexibilidade, baixo consumo de reagentes, além de permitir a manipulação mínima da amostra⁵². A versatilidade da CE está nos diferentes modos de separação disponíveis. Entre esses, encontra-se a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), que é usada para separar espécies neutras, além de espécies iônicas ou facilmente ionizáveis, o que é particularmente atrativo para a análise de extratos complexos constituídos por diferentes classes de compostos^{53,54}.

MEKC compreende a adição de um surfactante, em concentração superior à sua concentração micelar crítica (CMC), no eletrólito de corrida (BGE) com pH elevado, como um meio de aumentar a seletividade. As micelas formam uma fase pseudoestacionária dentro do capilar, criando um sistema híbrido de eletroforese e cromatografia. Dependendo da carga, as micelas movem-se com ou contra o fluxo eletrosmótico (EOF) e durante a migração, as espécies em solução podem interagir com as micelas por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, resultando na separação mediante partição entre fase micelar e fase aquosa. As interações diferenciais analito/micela são o fator principal na determinação da seletividade da MEKC. Quando desenvolvido em condições de pH menores que 3, o modo de separação recebe a denominação de cromatografia eletrocínética micelar de fluxo invertido (RF-MEKC) e o efeito do EOF pode ser negligenciável. Além disso, um potencial de separação negativo é aplicado na entrada do capilar quando se utiliza micelas carregadas negativamente, tornando a ordem de migração invertida, ou seja, os compostos mais hidrofóbicos eluem primeiro e a resolução entre analitos de baixa polaridade é aumentada, no geral^{53,54,55,56}. Uma limitação dessa técnica são as variações no tempo de migração ocasionadas por fatores como flutuações no EOF, na temperatura, entre outros; e que podem conduzir a dados pouco

reprodutíveis, com sobreposição de picos, impedindo uma interpretação apropriada^{49,52}.

Entre as técnicas espectrométricas ópticas, a mais usual é a detecção por arranjo de diodos (DAD), com alta sensibilidade e boa linearidade. No entanto, limita-se à detecção somente dos analitos que absorvem na região UV-VIS⁴⁶.

Em adição, a espectrometria de massas (MS) é considerada, atualmente, a técnica mais sensível e seletiva para rápida análise qualitativa e quantitativa de extratos vegetais. Além disso, a ionização por *electrospray* (ESI) tem sido a principal fonte utilizada para analisar compostos fenólicos. Normalmente, produzem uma ionização branda dos metabólitos, gerando informação apenas da massa molecular do composto e para obter um número maior de fragmentos característicos, o espectro de dissociação induzido por colisão (CID) pode ser gerado utilizando-se um sistema como MS-MS. Contudo, essa técnica apresenta como limitação a dificuldade em relação à eficiência de ionização bem como a supressão iônica, que pode ser responsabilizada por desvios de repetibilidade e precisão do método analítico^{57,58}.

3.3.1. Métodos quimiométricos

Os métodos quimiométricos de análise multivariada são ferramentas matemáticas e estatísticas capazes de converter grandes conjuntos de dados em informação útil, podendo ser aplicados aos mais diversos fins, tais como: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, entre outros^{59,60}.

Dados de *fingerprints* cromatográficos e eletroforéticos de extratos vegetais contêm informações complexas e têm natureza multivariada. As matrizes de dados são, geralmente, amplas e caracterizadas por um número muito grande de variáveis^{61,62}. Dessa forma, os métodos quimiométricos têm sido utilizados para estabelecer critérios de similaridade e parâmetros de reconhecimento para perfis metabólicos de extratos de plantas medicinais⁶³. Entre esses, a análise de componentes principais (PCA), um método de reconhecimento de padrões não supervisionada, frequentemente constitui o primeiro passo para uma análise exploratória dos dados, sem assumir qualquer conhecimento prévio de classe da amostra. É uma ferramenta analítica eficaz para examinar a variação intrínseca no

conjunto de dados e obter uma visão geral das variações entre os grupos, além de que também pode ser usada como uma ferramenta preditiva^{64,65}.

Após a análise exploratória, métodos de calibração e classificação podem ser utilizados para a obtenção de modelos. Dentre os métodos de classificação, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) pode ser considerada como um classificador linear de duas classes, que é utilizado para maximizar a separação entre grupos de observações e identificar quais variáveis respondem por essa separação⁶⁶. A validação cruzada é um procedimento muito utilizado para validar a capacidade preditiva de um modelo de classificação⁶⁷.

Os dados dos perfis metabólicos estão sujeitos a erros experimentais inerentes do método analítico, por isso devem ser submetidos à pré-tratamento, para reduzir as variações indesejáveis que podem influenciar os resultados finais. Além disso, a seleção criteriosa do pré-tratamento, tanto aplicado às amostras quanto às variáveis, é essencial ao sucesso da análise multivariada de dados⁵⁹. O pré-tratamento mais recomendado a dados cromatográficos e eletroforéticos é o alinhamento de picos pela aplicação do algoritmo *Correlated Optimized Warping* (COW) (disponível em: www.models.life.ku.dk/dtw_cow)⁶⁸. Esse algoritmo alinha um cromatograma desalinhado a um cromatograma de referência, maximizando a correlação entre os sinais por alongamento e compressão de um determinado segmento (*segment length*), ajustado por um parâmetro de flexibilidade (*slack size*)^{59,67}.

3.4. *Chrysobalanus icaco* Linnaeus

Chrysobalanus icaco Linnaeus (Chrysobalanaceae) (Figura 1) é uma espécie pantropical, conhecida como ajuru ou agiru (região Norte do Brasil), guajiru ou grageru (Nordeste brasileiro), abageru ou bajiru (Sudeste brasileiro), *coco-plum*, *fat-pork* ou *icaco* (em outras localidades no mundo). Além disso, também recebe a denominação vernacular: ajuru-vermelho, ajuru-branco ou ajuru-preto, com base na cor do fruto maduro. É uma frutífera de raro cultivo, porém relativamente frequente em seu hábitat natural, principalmente nas regiões costeiras. Com ocorrência em diversos estados brasileiros (AM, AP, PA, MA, PI, CE, RN, PB, AL, SE, BA, ES, RJ e SP) (disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>), é também encontrada na África

tropical, Ásia, ilhas do Pacífico e, no continente americano, da Flórida até o Sudeste brasileiro¹² (Figura 2).

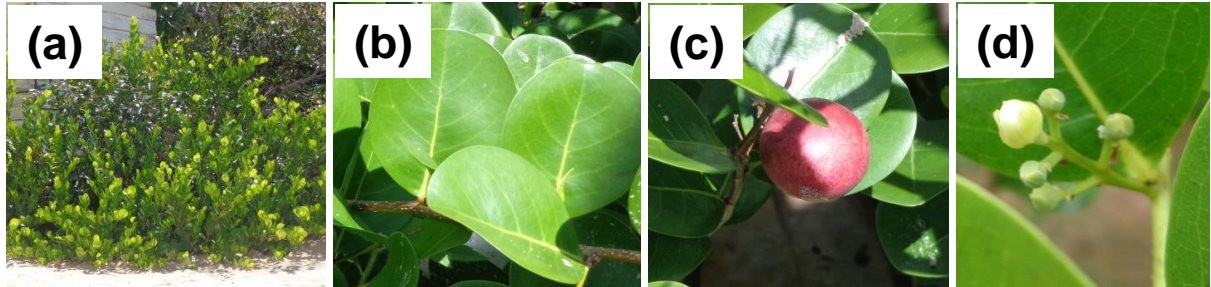


Figura 1 - Ajuru (*Chrysobalanus icaco* L.). (a) Arbusto. (b) Folhas. (c) Fruto. (d) Inflorescência.

Foto: Nádia E. N. P. Paracampo.

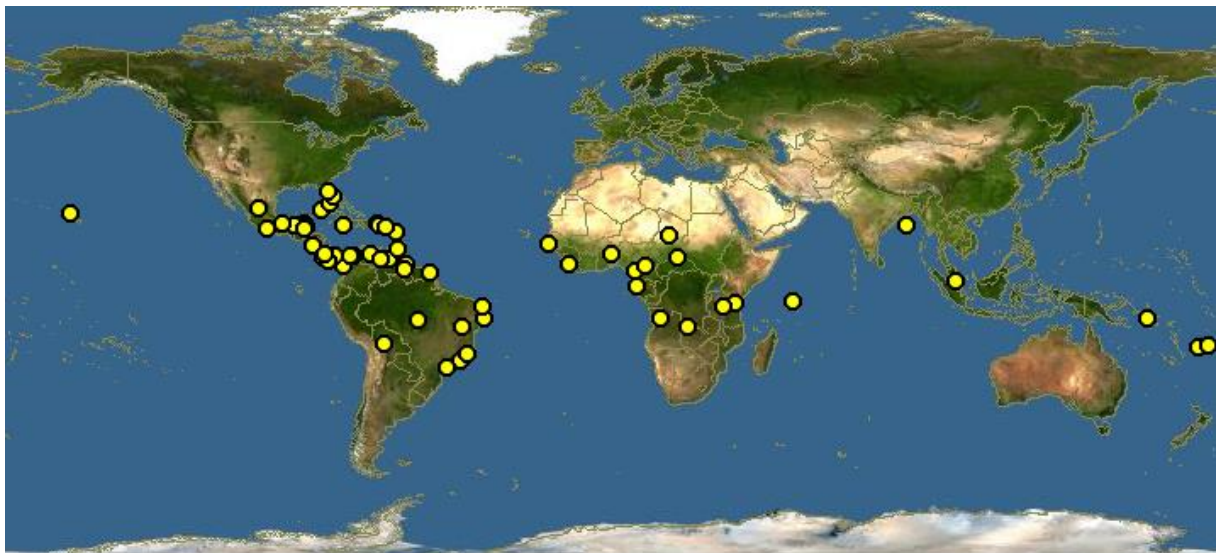


Figura 2 - Distribuição geográfica de *C. icaco*.

Fonte: Imagem disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Chrysobalanus+icaco>

C. icaco é uma espécie que apresenta variações extremas na forma (de orbicular a elíptica) e tamanho da folha, cor (vermelho, amarelo-pálido, roxo) e tamanho do fruto, e hábito de crescimento (de arbusto rasteiro a árvore). Além disso, exibe ampla plasticidade para desenvolver-se em diferentes associações vegetais como mangues e restingas, entre outras; em locais sujeitos ao estresse hídrico ou salino ou, ainda, exposto a inundação em determinadas épocas do ano; e em solos com baixa fertilidade ou com afloramento de rochas. Na vegetação costeira, por

exemplo, quando se observa alta densidade populacional, isso se deve mais à falta de adaptabilidade das demais espécies da região ao ambiente que a sua alta competitividade⁶⁹.

No Brasil, estudos etnodirigidos têm reportado o uso tradicional do óleo da semente e da infusão de raiz, casca, folha e flor para o tratamento de diarreia, leucorreia, doenças infecciosas e pedras nos rins; com destaque para a decocção de folhas como agente diurético e hipoglicemiante. A adoção popular de *C. icaco* como antidiabético foi descrita na literatura, pela primeira vez, em 1977^{14,70,71,72,73}.

Em levantamento etnobotânico realizado no Mercado de Madureira, Rio de Janeiro, o reputado efeito no controle de diabetes garantiu ao *C. icaco* o terceiro lugar entre as 97 espécies mencionadas com maior frequência, confirmando sua importância para a farmacopeia popular. No entanto, o que se verificou foi na verdade a comercialização concomitante de folhas de *C. icaco* e de *Eugenia rotundifolia* (Myrtaceae) (Figura 3), sob a mesma designação popular de abajuru, o que foi hipoteticamente atribuído à dificuldade em distinção dessas espécies, provenientes do extrativismo⁷³.



Figura 3 - Exsicatas ilustrando detalhes dos ramos de: (a) *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) e (b) *Eugenia rotundifolia* Casar (Myrtaceae).

Foto: Imagens disponíveis em: <http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/>

3.4.1. Potencial químico e biológico: estado da arte

Pesquisadores têm relatado o potencial químico e biológico avaliado a partir de diferentes órgãos de *C. icaco*:

RAIZ

- Do extrato orgânico das raízes, foram isolados os diterpenos: ácido ent-15-oxocaur-16-en-19-oico e éster metílico do ácido ent-11-S-hidroxi-15-oxocaur-16-

en-19-oico. O primeiro apresentou atividade anti-HIV *in vitro* ²⁷.

CASCA DO CAULE

- Em investigação do extrato aquoso das cascas do caule, determinou-se a propriedade anti-inflamatória e antinociceptiva do mesmo, e ainda se observou a ausência de toxicidade aguda em camundongos para a dose de 2 g/kg ²¹.

FOLHA

- Na primeira investigação fitoquímica das folhas, foi identificada a presença de miricetina (Figura 4), flavonol que tem sido considerado como marcador quimiotaxonômico de Chrysobalanaceae ³¹.

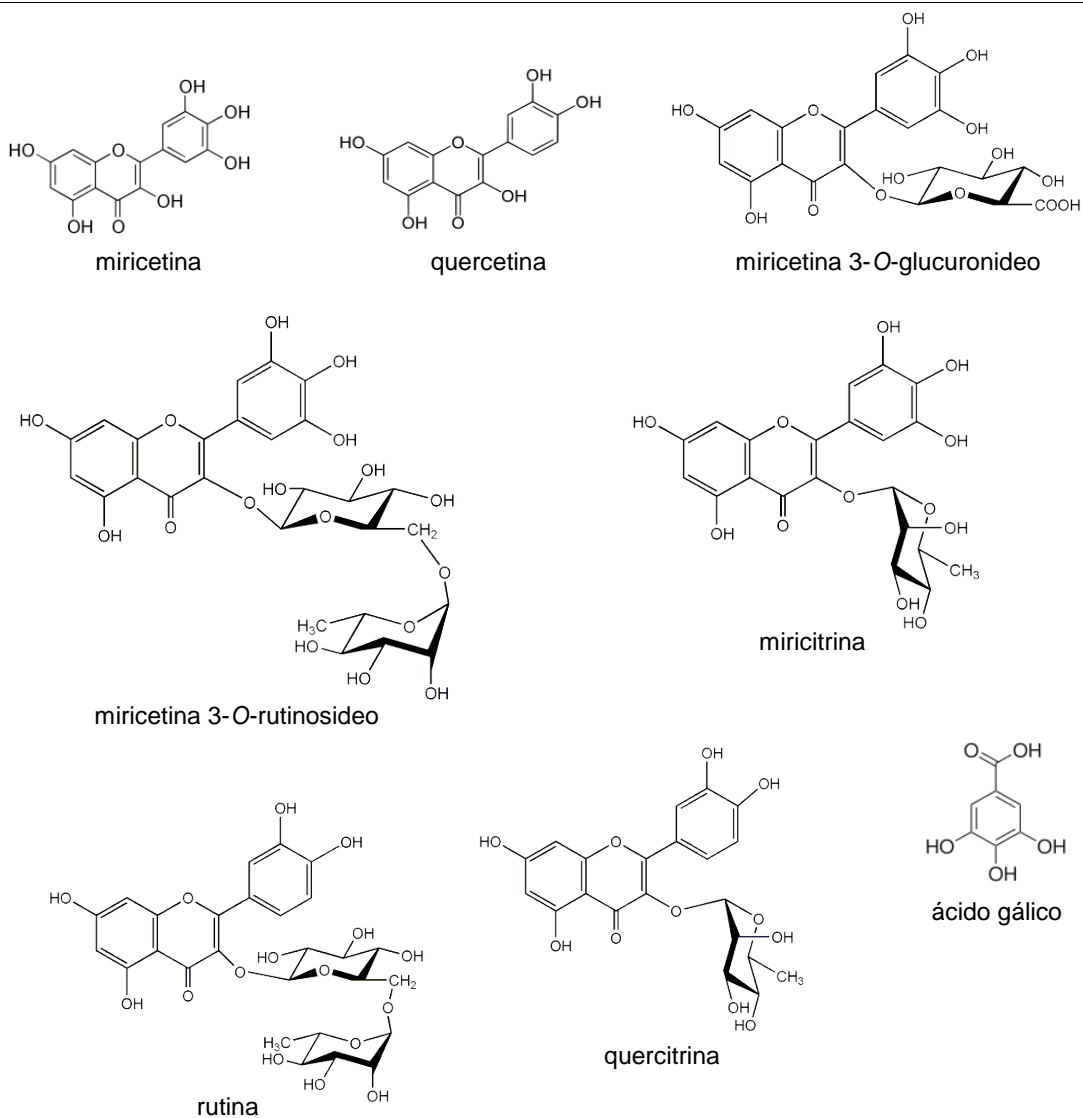


Figura 4 - Estruturas químicas de compostos fenólicos encontrados em folha de *C. icaco*.

- No extrato hidroalcoólico das folhas, identificaram-se por HPLC/MS os seguintes compostos: miricetina-3-O-glucuronídeo; miricetina-3-O-rutinosídeo; rutina; miricetina-3-O-ramnosídeo (miricitrina); quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina) (Figura 4); miricetina ligada a uma unidade de pentose e ácido glucurônico; miricetina ligada a uma unidade de pentose e ramnose; quercetina ligada a uma unidade de pentose e ramnose; quercetina ligada a uma unidade de ácido glucurônico¹⁶.
- No extrato metanólico hidrolisado das folhas, os seguintes compostos fenólicos foram identificados e quantificados por HPLC-DAD: ácido gálico (0,45 mg/g), miricetina (0,78 mg/g) e quercetina (0,14 mg/g)²³ (Figura 4).
- No óleo essencial das folhas, foram identificados e quantificados por GC-MS os seguintes compostos: 2-tridecen-1-ol (1,28%); neofitadieno (0,14%); 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (0,27%); óxido de manoil (0,16%); isômero de fitol (0,76%); 1,4-fenantrenodiona (0,47%); heptacosano (0,78%); octacosano (1,12%); esqualeno (5,55%); nanocosano (11,55%); triacontano (3,12%); nerolidol Z e E (1,14%); hentriacontano (20,02%); vitamina E (5,30%); dotriacontano (2,41%); triacontanal (1,63%); estigma-5,22-ol (1,17%); tritriacontano (4,83%); estigma-5-ol (3,78%); lupenona (1,53%); 4,22-estigmadienona (1,18%); lupenol (0,51%); dotriacontanal (1,39%); estigmast-4-en-3-ona (5,11%); hentetracontanol (0,85%)³⁰.
- A partir da fração em acetato de etila do extrato metanólico das folhas, foram isolados os seguintes triterpenos: ácido 2α - 3β - 6β -tri-hidroxi-olean-12-en-28-oato de β -D-glicopiranosil-(2'→1'')-O- β -D-glicopiranosídeo; ácido 2α - 3β - 6β -tri-hidroxi-olean-12-en-28-oico; ácido 2α - 3β - 6β -23-tetra-hidroxi-olean-12-en-28-oico; e o flavonoide: 5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-3-O- β -D-glicopiranosil-flavona²⁹.
- Na investigação do potencial antiangiogênico do extrato metanólico das folhas, verificou-se inibição média da angiogenese em 44%, ou seja, reduziu a formação de novos vasos de sangue em tecido embrionário de frango²⁸.

- Na avaliação do potencial genotóxico *in vitro* do extrato aquoso das folhas, verificou-se tanto a ação protetora dos efeitos do SnCl₂ sobre o DNA plasmidial, como também o efeito genotóxico, dependendo da dose do extrato^{25,74}.
- Foi avaliado *in vivo*, em experimento com ratos, que o extrato aquoso das folhas é potencialmente genotóxico. Ademais, avaliou-se que ratos diabéticos tratados com o extrato apresentaram redução nos níveis de triglicérido, sem diferenças significativas nos níveis de glicemia e colesterol¹⁹.
- Em estudo *in vivo* sobre o efeito do extrato aquoso das folhas na radiomarcagem com tecnécio (^{99m}Tc), foi sugerido que esse extrato pode interferir na marcação dos constituintes sanguíneos com ^{99m}Tc, possivelmente pela sua ação quelante/antioxidante. Os autores alertaram que, embora o estudo tenha sido realizado em animais, seria necessária cautela na interpretação de exames em medicina nuclear que usam como marcador o ^{99m}Tc, em pacientes que estão em tratamento com extrato de *C. icaco*²⁴.
- A partir dos extratos hexânico e metanólico das folhas, foram isolados: estigmasterol, sitosterol, campesterol, ácido pomólico e 7-O-metil-campferol. Os extratos, frações e compostos isolados apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, mas não contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*²⁶.
- O extrato hidroalcoólico das folhas apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra isolados clínicos bucais de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, mas não contra *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis*. O extrato foi analisado por HPLC/DAD e os flavonoides rutina e miricetina foram identificados⁷⁵.
- Ácido pomólico foi isolado da fração em diclorometano do extrato metanólico das folhas. Na investigação da atividade antitumoral desse triterpeno, observou-se a inibição do crescimento e indução de apoptose em linhagem de células de eritroleucemia (K-562), bem como inibiu a proliferação de Lucena1, uma linhagem de células resistentes a múltiplas drogas (MDR)^{29,76}.
- Resultados experimentais demonstraram que o chá das folhas na concentração de 5%, administrado por via oral por camundongos normais e com diabetes

induzida por aloxana, reduziu a glicemia de jejum e bloqueou 64,20% da absorção intestinal da glicose⁷⁷.

- O extrato aquoso das folhas não induziu efeito anti-hiperglicemiante significativo quando avaliado pelo teste oral de tolerância à glicose em ratos normoglicêmicos⁷⁸.
- Foram avaliadas características físicas e químicas das folhas, frutos e sementes, onde se destacou o valor nutricional do fruto pela concentração de cromo, selênio, cálcio e ferro. Também foi verificado que o chá das folhas, nas concentrações de 2,5% e 5%, reduziu o valor de glicemia em animais diabéticos, com redução maior conforme aumento da concentração, sem causar alteração nos animais normais^{79,80}.
- Na prospecção fitoquímica do extrato aquoso das folhas, verificou-se a presença de taninos, flavonoides, triterpenoides, esteroides, saponinas e alcaloides. A atividade antioxidante desse extrato foi considerada potente no ensaio *in vitro*. Além disso, na avaliação do potencial antidiabético desse extrato, verificou-se que o mesmo não foi capaz de inibir a elevação da glicemia no teste oral de tolerância à glicose em ratos, mas reduziu a glicemia pela administração crônica do extrato²⁰.
- A partir da partição butanólica do extrato metanólico das folhas, foram isolados os flavonóis quercetina e campferol, e a flavona 5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-3-O-β-D-glicopiranosil. Na avaliação da atividade antinociceptiva em camundongos, foi constatado o efeito antinociceptivo sobre a dor inflamatória, mas não sobre a de caráter neurogênico⁸¹. O efeito contra dor inflamatória também foi observado a partir do extrato aquoso⁸².
- O extrato aquoso das folhas foi hipoglicemiante em ratos diabéticos e não demonstrou toxicidade aguda em camundongos até a dose de 5 g/kg⁸³.
- A atividade antileishmania contra *Leishmania amazonensis* foi evidenciada a partir de extratos e frações obtidos das folhas²².
- O extrato etanólico das folhas foi ineficaz ao controle de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, na avaliação da atividade acaricida *in vitro*⁸⁴.

- Na avaliação do extrato aquoso das folhas, verificou-se a normalização da glicemia de jejum e da sensibilidade à insulina, além da inibição do ganho de peso e do acúmulo de gordura no fígado em camundongos obesos, induzidos por dieta hiperlipídica¹⁸.
- O extrato aquoso das folhas, quando administrado em concentrações mais baixas por camundongos obesos, promoveu menor ganho de tecido adiposo, normalizou a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose. Os flavonoides miricetina-3-O-glucuronídeo, rutina, miricetina-3-O-ramnosídeo (miricitrina) e quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina) foram identificados por HPLC-DAD e MS nesse extrato, que apresentou alta atividade antioxidante *in vitro*¹⁷.

FRUTO

- A presença dos flavonoides delphinidina-3,5-diglicosídeo no exocarpo do fruto de ajuru-preto e de cianidina-3-arabinosídeo no de ajuru-vermelho, foi verificada por meio de cromatografia de papel com leitura no UV-VIS. Em trabalho anterior, os autores sugeriram a presença de quercetina-3-arabinosídeo e apigenina-7-O-glucosídeo^{85,86}.
- Em outra pesquisa realizada com o fruto, nove antocianinas foram identificadas tentativamente e quantificadas por HPLC-ESI-MS/MS: petunidina-3-(6"-succinil)-ramnosídeo (367 mg/100 g em base seca); petunidina-3-acetoil-glicosídeo (164 mg/100 g); petunidina-3-(6"-acetoil)-galactosídeo (121 mg/100 g); delphinidina-3-(6"-succinil)-ramnosídeo (100 mg/100 g); delphinidina-3-(6"-acetoil)-glicosídeo (63 mg/100 g); delphinidina-3-galactosídeo/glicosídeo (44 mg/100 g); peonidina-3-(6"-succinil)-ramnosídeo (25 mg/100 g); petunidina-3-galactosídeo/glicosídeo + delphinidina-3-(6"-acetoil)-galactosídeo (74 mg/100 g)⁸⁷.
- O extrato aquoso dos frutos foi avaliado quanto ao efeito antidiabético e verificou-se redução significativa da glicemia de jejum em ratos, bem como diminuição da massa corporal⁸⁸.
- Quantidades significativas de polifenóis, magnésio e selênio foram encontrados nos frutos. Esse estudo também constatou o efeito antioxidante e antigenotóxico *in vivo* do fruto⁸⁹.

- A partir do extrato metanólico dos frutos, foram identificadas e quantificadas por HPLC-ESI-MS as seguintes antocianinas: delphinidina-3-glucosídeo (1162 µg/mL), cianidina-3-glucosídeo (382 µg/mL), petunidina-3-glucosídeo + delphinidina-3-(6"-acetil)-galactosídeo ou delphinidina-3-(6"-oxaloil)-arabinosídeo (1396 µg/mL), peonidina-3-glucosídeo (345 µg/mL), petunidina-3-(6"-acetil)-galactosídeo ou petunidina-3-(6"-oxaloil)-arabinosídeo (611 µg/mL) e peonidina-3-(6"-acetil)-glucosídeo ou peonidina-3-(6"-oxaloil) arabinosídeo (689 µg/mL). Foram também investigadas *in vitro* as atividades anti-inflamatória e antiproliferativa em linhagem de células de carcinoma de cólon (HT-29) e, de acordo com os resultados, observaram-se efeitos quimiopreventivo e anti-inflamatório nas células intestinais⁹⁰.

SEMENTE

- No óleo obtido das sementes, identificou-se por GC a presença dos ácidos graxos: palmítico (4,0%); esteárico (18,0%); oleico (11,0%); linoleico (6,0%); araquídico (1,0%); α -eleosteárico (9c, 11t, 13t) (22,0%); α -parinárico (9c, 11t, 13t, 15c) (10,0%); α -licânico (9c, 11t, 13t) (10,0%); 4-oxo- α -parinárico (9c, 11t, 13t, 15c) (18,0%)⁹¹. Esse óleo também apresentou taninos do tipo catecol⁷⁴.

4. COLETA, BENEFICIAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO, OBTENÇÃO DO FITOPRODUTO E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.1. Material e métodos

4.1.1. Coleta de material botânico para estudo químico

Amostras de folhas de 25 *C. icaco* silvestres foram coletadas em 24 pontos georreferenciados (latitude, longitude e altitude) por um sistema de posicionamento global (GPS) GPSMAP® 76CSx (Garmin, SP, Brasil), em 15 municípios localizados em três das seis Mesorregiões do estado do Pará (Figura 5). São esses:

Mesorregião: BELÉM

Barcarena, Belém, Castanhal e Santo Antônio do Tauá.

Mesorregião: MARAJÓ

Salvaterra e Soure.

Mesorregião: NORDESTE DO PARÁ

Abaetetuba, Acará, Bragança, Marapanim, Nova Timboteua, Salinópolis, São Caetano de Odivelas, Terra Alta e Vigia.

Os municípios foram escolhidos com orientação de parataxonomistas do Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA) e a seleção dos espécimes foi decidida *in loco* mediante avaliação de características morfológicas da planta (cor do fruto e hábito) e/ou do solo (mangue, restinga, etc.).

No Estado do Pará, localizado no Hemisfério Sul, na região da linha do Equador, as estações do ano dividem-se apenas em período mais e menos chuvoso. Temperatura e umidade relativa do ar são praticamente constantes durante o ano todo. Por isso, as coletas ocorreram em períodos de maior (março-abril/2014) e menor (setembro-outubro/2014) precipitação pluviométrica, conforme dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Dados de precipitação em 2014 registrados por cinco estações automáticas do INMET (Belém, Bragança, Castanhal, Salinópolis e Soure), localizadas em área de coleta, estão apresentados no Anexo 2.

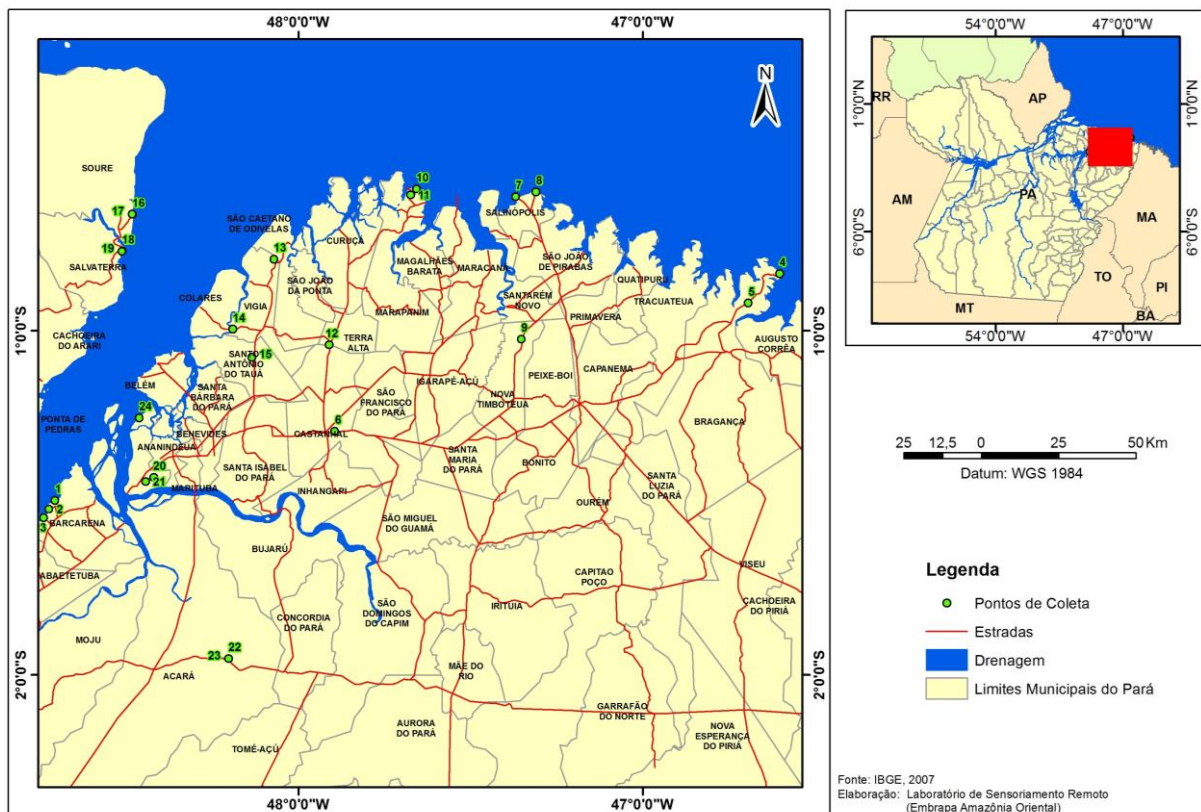


Figura 5 - Mapa da área de coleta dos 25 espécimes silvestres de *C. icaco* e solo, ilustrando 24 pontos georreferenciados em 15 municípios do estado do Pará, Brasil. Os dados de posição geográfica (latitude, longitude e altitude) estão apresentados na Tabela 1.

Fonte: IBGE, 2007.

Elaboração: Laboratório de Sensoriamento Remoto da Embrapa Amazônia Oriental.

As coletas foram realizadas em horário compreendido entre 8h e 17h e sempre observando a fenofase pré-floração. Assim, coletaram-se folhas de 25 espécimes no primeiro semestre de 2014 e repetiram-se essas coletas, a partir dos mesmos espécimes, no segundo semestre. Entretanto, na segunda coleta, observou-se que dois dos 25 indivíduos sofreram poda drástica durante o intervalo entre as coletas. Dessa forma, totalizaram-se 48 amostras (25 do primeiro semestre e 23 do segundo semestre) a serem avaliadas. Além das coordenadas geográficas, a temperatura e a umidade relativa do ar foram medidas com o auxílio de relógio termo-higrômetro MT-241 (Minipa, SP, Brasil).

De 4 a 5 kg de cada amostra *in natura* foram armazenados em sacos de papel identificados e transportados em caixas de isopor até o Laboratório de

Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA), conservadas a 4 °C até o beneficiamento. Todas as informações sobre a coleta e as amostras de *C. icaco* encontram-se detalhadas na Tabela 1.

4.1.2. Coleta de material botânico para estudo taxonômico

Durante a coleta de *C. icaco* do primeiro semestre, cinco ramos de cada espécime foram coletados, com aproximadamente 30 cm de comprimento e contendo folhas maduras, flores e/ou frutos, para fins de herborização (preparação de exsicatas) e identificação taxonômica. Essas amostras foram armazenadas em sacos de papel identificados e levadas ao Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental. A coleta do material botânico, herborização e identificação das amostras foram conduzidas em conformidade com a metodologia clássica utilizada em taxonomia⁹². Essas exsicatas foram incluídas à coleção do Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA) e, conforme método de comunicação científica, duplicatas (cópias das exsicatas) foram encaminhadas como intercâmbio de material ao Herbário de Kew, Reino Unido, para avaliação pelo Dr. Ghilleen Tolmie Prance, taxonomista vegetal especialista em Chrysobalanaceae. As informações sobre as amostras de *C. icaco* encontram-se descritas na Tabela 1.

4.1.3. Coleta de material botânico para estudo genético

Durante a coleta do segundo semestre, brotos (folhas novas) de cada espécime foram coletados para caracterização genética, incluindo os dois drasticamente podados. Essas amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno identificados e transportados em caixa de isopor contendo bolsa térmica de gelo até o Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA). As informações sobre as amostras de *C. icaco* encontram-se descritas na Tabela 1.

4.1.4. Coleta de solo para estudo de fertilidade

Além do material botânico, foram coletadas amostras de solo compostas por três subamostras, recolhidas na profundidade 0-20 cm em vértices de um triângulo imaginário ao redor de cada espécime. Dos 25 espécies de *C. icaco* estudados, notou-se que dois são árvores que crescem lado a lado como se fossem um único indivíduo, portanto foi realizada uma coleta única de solo em torno desses

dois indivíduos, totalizando 24 amostras no primeiro (Figura 6) e 23 no segundo semestre de 2014. Isso, porque a coleta de solo esteve condicionada à de material botânico para estudo químico (Seção 4.1.1.). Essas amostras foram armazenadas em sacos de polietileno identificados e conduzidas ao Laboratório de Solos da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA), para posterior análise de fertilidade. A área de coleta encontra-se ilustrada na Figura 5. Na Tabela 1, estão apresentados os dados de posição geográfica dos 24 pontos de coleta e a descrição do solo baseada na vegetação característica do habitat: Mata de Terra firme, Mata de Igapó, Manguezal ou Restinga.



Figura 6 - Amostras de solo coletadas no hábitat dos 25 espécimes de *C. icaco*, durante o período chuvoso. Amostras após etapa de preparo para análise de fertilidade.

Foto: Nádia E. N. P. Paracampo.

Tabela 1 - Informações sobre as amostras de *Chrysobalanus icaco* L. utilizadas no estudo.

(continua)

COD	Vernáculo	IAN	Data	Hora	Cidade	Local/Nº	Complemento	Latitude	Longitude	Alt (m)	T (°C)	UR (%)	Solo	Hábito
BJ1	Ajuru branco	192706	28/04/14	13h55	Acará	Cacoal/ 23	Propriedade do Sr. Jereca	1º 57' 10,188" S	48º 12' 10,195" W	48,67	33,3	72	Terra firme	Árvore
BJ2			07/10/14	-							-			
CP1	Ajuru branco	191976	24/03/14	9h12	Barcarena	Praia do Caripi/ 1	Restaurante Floresta Tropical	1º 29' 33,354" S	48º 42' 26,005" W	1,09	35,9	66	Terra firme	Arbusto porte médio
CP2			24/09/14	9h49							31,1	63		
SC1	Ajuru branco	192018	04/04/14	10h25	São Caetano de Odivelas	Santa Maria 13	Propriedade do Sr. Branco	0º 47' 29,537" S	48º 4' 15,359" W	7,82	28,1	62	Terra firme	Arbusto porte médio
SC2			30/09/14	-							-	-		
BE1	Ajuru preto	191977	24/03/14	13h43	Abaetetuba	Praia de Beja/ 3	-	1º 36' 59,651" S	48º 48' 37,583" W	-0,6	29,5	77	Igapó	Arbusto porte médio
BE2			24/09/14	15h07							31,4	64		
CM1	Ajuru preto	191986	28/03/14	10h21	Marapanim	Camará/ 11	-	0º 36' 18,419" S	47º 40' 28,736" W	6,13	34,1	51	Igapó	Arbusto porte médio
CM2			29/09/14	11h07							34,2	55		
IT1	Ajuru preto	191978	24/03/14	11h03	Barcarena	Praia de Itupanema/ 2	Propriedade do Sr. Jorge	1º 31' 5,360" S	48º 43' 27,981" W	2,77	31,2	67	Restinga	Arbusto porte médio
IT2			24/09/14	12h56							31,7	54		
NT1	Ajuru preto	191983	27/03/14	15h19	Nova Timboteua	PA124/ 9	-	1º 1' 25,749" S	47º 21' 9,598" W	9,5	36,9	42	Terra firme	Arbusto porte alto
NT2			23/09/14	14h33							37,9	53		
OU1	Ajuru preto	192357	29/04/14	14h51	Belém	Outeiro/ 24	Praia do Amor	1º 15' 8,523" S	48º 27' 43,527" W	10,22	31,5	67	Restinga	Árvore
OU2			06/10/14	15h40							31,6	66		
PG1	Ajuru preto	192462	20/04/14	13h03	Salvaterra	Praia Grande/ 19	-	0º 46' 7,600" S	48º 30' 43,622" W	10,94	34,7	63	Igapó	Árvore
PG2			12/10/14	9h29							33,3	65		
PJ1	Ajuru preto	192705	28/04/14	13h55	Acará	Cacoal/ 23	Propriedade do Sr. Jereca	1º 57' 10,188" S	48º 12' 10,195" W	48,67	33,3	72	Terra firme	Árvore
PJ2			07/10/14	11h20							39,3	43		
PP1	Ajuru preto	192465	19/04/14	12h29	Soure	Praia do Pesqueiro/ 16	-	0º 39' 41,361" S	48º 28' 55,902" W	6,61	31,2	65	Restinga	Arbusto porte médio
PP2			11/10/14	10h37							34,2	62		

Tabela 1 - Informações sobre as amostras de *Chrysobalanus icaco* L. utilizadas no estudo.

(continuação)

COD	Vernáculo	IAN	Data	Hora	Cidade	Local/Nº	Complemento	Latitude	Longitude	Alt (m)	T (°C)	UR (%)	Solo	Hábito
VI1	Ajuru preto	192358	28/04/14	11h28	Acará	Cacoal/ 22	Propriedade do Sr. Viana	1º 57' 8,125" S	48º 12' 9,752" W	34,73	30,1	75	Terra firme	Árvore
VI2			07/10/14	11h50							33,3	49		
AJ1	Ajuru vermelho	191979	26/03/14	10h49	Bragança	Praia de Ajuruteua/ 4	-	0º 50' 0,362" S	46º 36' 7,990" W	-2,76	32,7	56	Restinga	Arbusto porte baixo
AJ2			22/09/14	10h29							35	72		
AT1	Ajuru vermelho	191984	27/03/14	13h27	Salinópolis	Praia do Atalaia/ 8	Barraca Barcelona	0º 35' 44,600" S	47º 18' 36,761" W	5,89	36,7	55	Restinga	Arbusto porte baixo
AT2			23/09/14	12h56							36,3	69		
BR1	Ajuru vermelho	191980	26/03/14	11h58	Bragança	PA458/ 5	-	0º 55' 9,263" S	46º 41' 36,137" W	3,73	35,8	50	Mangue	Arbusto porte médio
BR2			22/09/14	12h44							32,2	63		
CT1	Ajuru vermelho	191981	26/03/14	16h58	Castanhal	Sítio Joana D'arc/ 6	Propriedade do Sr. Dalvarino Sousa	1º 17' 28,595" S	47º 53' 39,480" W	80,64	30,7	62	Terra firme	Árvore
CT2			22/09/14	16h09							31,7	55		
CR1	Ajuru vermelho	191985	28/03/14	9h25	Marapanim	Praia do Crispim/ 10	-	0º 35' 14,883" S	47º 39' 25,993" W	-0,84	34,8	58	Terra firme	Arbusto porte baixo
CR2			29/09/14	10h04							32,6	57		
HO1	Ajuru vermelho	184904	25/04/14	10h41	Belém	Embrapa/ 21	Horto de Plantas Medicinais	1º 26' 17,851" S	48º 26' 36,758" W	23,2	33,6	60	Terra firme	Arbusto porte médio
HO2			02/10/14	10h37							31	58		
MA1	Ajuru vermelho	191982	27/03/14	10h47	Salinópolis	Praia do Maçarico/ 7	Quiosque Café da Manhã	0º 36' 36,939" S	47º 22' 8,952" W	1,57	34,7	49	Igapó	Arbusto porte médio
MA2			23/09/14	10h33							32,1	68		
PI1	Ajuru vermelho	192359	25/04/14	8h37	Belém	Embrapa/ 20	Piscicultura	1º 25' 34,711" S	48º 25' 13,171" W	18,87	32,9	78	Terra firme	Arbusto porte médio
PI2			02/10/14	9h15							31,7	67		
RG1	Ajuru vermelho	192463	20/04/14	11h28	Salvaterra	Praia Grande/ 18	-	0º 46' 5,001" S	48º 30' 41,708" W	8,3	32,3	64	Restinga	Arbusto porte baixo
RG2			12/10/14	8h30							30,8	75		
RP1	Ajuru vermelho	192464	19/04/14	14h35	Soure	Praia do Pesqueiro/ 17	-	0º 39' 36,602" S	48º 28' 57,895" W	7,82	32,5	62	Restinga	Arbusto porte médio
RP2			11/10/14	12h20							32,7	64		

Tabela 1 - Informações sobre as amostras de *Chrysobalanus icaco* L. utilizadas no estudo.

(conclusão)

COD	Vernáculo	IAN	Data	Hora	Cidade	Local/Nº	Complemento	Latitude	Longitude	Alt (m)	T (°C)	UR (%)	Solo	Hábito
SA1	Ajuru vermelho	192020	04/04/14	14h39	Santo Antônio do Tauá	15	Propriedade do Sr. Adiel	1° 4' 34,782" S	48° 8' 6,597" W	42,18	26,9	79	Terra firme	Arbusto porte médio
SA2			30/09/14	12h25							33,6	44		
TA1	Ajuru vermelho	191987	28/03/14	14h40	Terra Alta	12	Propriedade da Sra. Nilda	1° 2' 27,168" S	47° 54' 39,718" W	37,86	31	62	Terra firme	Arbusto porte médio
TA2			29/09/14	14h22							35,5	47		
VG1	Ajuru vermelho	192019	04/04/14	13h08	Vigia	Penha Longa/14	Propriedade da Sra. Maria Augusta	0° 59' 41,782" S	48° 11' 26,450" W	9,5	28,9	78	Terra firme	Árvore
VG2			30/09/14	10h08							33,5	46		

Nota:

COD: código da amostra. Vernáculo: nome popular da espécie baseado na cor do fruto maduro. IAN: número de exsicata no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental. Data: dia/mês/ano da coleta. Hora: horário da coleta. Complemento: especificação da localização da coleta. Local/Nº: localização da coleta/número do ponto de coleta ilustrado na Figura 5. Cidade: município da coleta. Latitude: coordenada geográfica (norte-sul). Longitude: coordenada geográfica (leste-oeste). Alt (m): altitude em metro. T (°C): temperatura ambiente em grau Celsius. UR (%): umidade relativa em porcentagem. Solo – descrição do solo baseada na vegetação característica do habitat: Mata de Terra firme, Mata de Igapó, Manguezal ou Restinga. Hábito – forma geral da planta: árvore ou arbusto (porte baixo: rasteiro; porte médio: até 1,5 m de altura; porte alto: até 4 m de altura). (-): ausência de informação.

4.1.5. Beneficiamento do material botânico

Esta etapa (Figura 7) foi conduzida em ambiente de laboratório com a utilização de toucas, máscaras e luvas descartáveis bem como jaleco por toda equipe envolvida, a fim de minimizar a contaminação microbiológica. A operação de pré-limpeza compreendeu desfolhamento e seleção, eliminando talos, folhas velhas ou com aparente deficiência e/ou patologia. As folhas selecionadas foram lavadas quase que individualmente e em água corrente para remoção de sujidades, centrifugadas com o auxílio de secador giratório de salada (Plasútil) e dispostas sobre folhas de papel tipo kraft. Em seguida, as amostras foram transferidas para sacos de papel e levadas para a estufa com circulação forçada de ar 320-SE (Fanem[®], SP, Brasil) a 45 ± 2 °C por 10 dias. Após a secagem, as amostras foram rasuradas e moídas em moinho de facas tipo Willey TE-650/1 (Tecnal[®], SP, Brasil), com peneira de retenção em aço inox e malha de 20 mesh (0,85 mm). As amostras trituradas foram quarteadas sobre folhas de papel manteiga, conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira⁹³. Depois, foram acondicionadas em sacos de polietileno de alta densidade (PEAD) lacrados em seladora de pedal e armazenadas a -25 °C.



Figura 7 - Etapas do beneficiamento das folhas de *C. icaco* após a operação de pré-limpeza. (a) Lavagem. (b) Centrifugação em secador giratório de salada. (c) Secagem prévia à temperatura ambiente. (d) Secagem em estufa com circulação forçada a 45 ± 2 °C por 10 dias. (e) Moagem (malha 20 mesh). (f) Quarteamento da amostra (g) Embalagem em saco de PEAD.

Foto: Nádia E. N. P. Paracampo.

Cerca de 200 g de cada amostra foram dispostos separadamente em sacos de PEAD com zíper e armazenados em freezer para serem utilizados nos procedimentos de extração, determinação de água em drogas vegetais (umidade) e cinzas totais⁹³. Aproximadamente, 15 g de cada amostra foram encaminhados ao Laboratório de Solos para análise de tecido foliar.

4.1.6. Obtenção do extrato hidroalcoólico (tintura)

Na medicina popular brasileira, as folhas de *C. icaco* são utilizadas como produto de infusão, no entanto optou-se pela investigação da tintura por tratar-se de uma forma mais estável para ser utilizada em manipulação farmacêutica¹⁶.

5 g de folhas secas e pulverizadas foram extraídos por maceração com 50 mL de álcool de cereais 70% (v/v) (95 °GL Cerealcool, aferido com alcoômetro Gay Lussac Arba) durante sete dias consecutivos em erlenmeyers cobertos com Parafilm[®], envolvidos com papel alumínio e dispostos sobre mesa agitadora pendular TE-240-1 (Tecnal[®], SP, Brasil) com velocidade de agitação de 90 ± 2 bpm, à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e ao abrigo da luz. O procedimento de extração (Figura 8) foi repetido (em triplicata) para as 48 amostras de *C. icaco*, totalizando 144 extratos. Em seguida, as tinturas foram filtradas em papel de filtro qualitativo (80 g/m², Qualy) sob pressão reduzida em bomba de vácuo TE-0581 (Tecnal[®], SP, Brasil) e aferidas a 50 mL com etanol 70% (v/v). As tinturas foram armazenadas em frascos de PEAD de 20 mL à temperatura de -11 °C. A relação droga vegetal:líquido extrator (1:10) e o tempo de extração empregados são os recomendados para a obtenção de tinturas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira⁹⁴.

4.1.7. Análises físico-químicas

A determinação do teor de água em drogas vegetais (umidade) e cinzas totais na droga vegetal (folhas de *C. icaco*), bem como resíduo seco na tintura foram realizadas segundo os procedimentos estabelecidos na Farmacopeia Brasileira⁹³ e pela OMS⁹⁵.

Nesta etapa foram utilizados: estufa e mufla (Quimis[®], SP, Brasil), balança analítica Libror AEG-320 (Shimadzu, SP, Brasil).

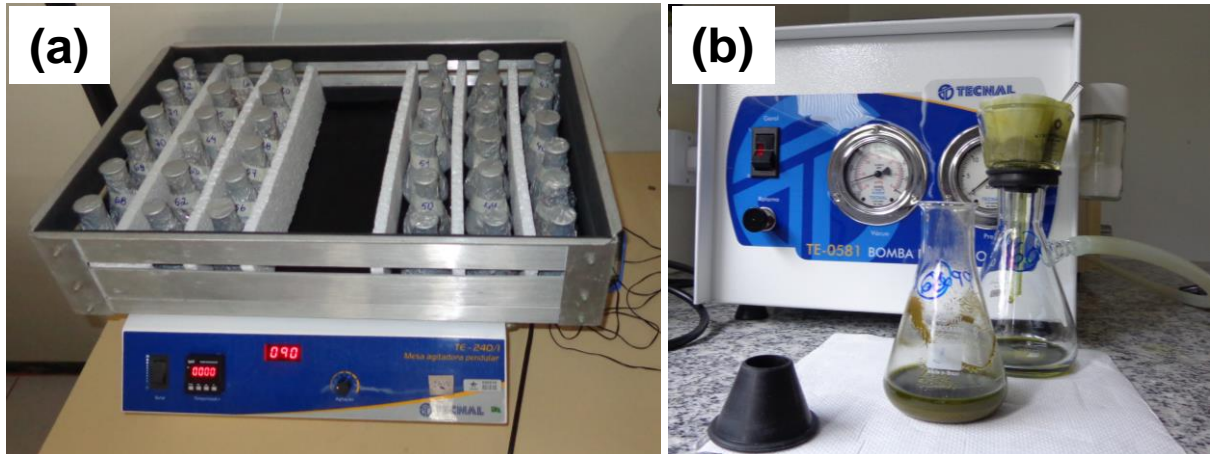


Figura 8 - Procedimento de obtenção do extrato hidroalcoólico (tintura) de folhas de *C. icaco*. (a) Extração em mesa agitadora pendular com velocidade de agitação de 90 ± 2 bpm, à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e ao abrigo da luz. (b) Filtração do extrato em papel de filtro qualitativo (80 g/m^2) sob pressão reduzida.

Foto: Nádia E. N. P. Paracampo.

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Avaliação taxonômica

Durante o trabalho de campo, observaram-se variações extremas em caracteres morfológicos de *C. icaco* como: tamanho e formato das folhas, cor e tamanho dos frutos e hábito da planta. Além disso, verificaram-se dois morfotipos (cor do fruto maduro) crescendo lado a lado como se fossem um indivíduo único (Figura 10e). Por isso, apesar do presente estudo envolver 25 indivíduos de *C. icaco*, tem-se apenas 24 amostras iniciais de solo, bem como pontos de coleta georreferenciados. Entretanto, a insuficiência de informações para uma revisão taxonômica mantém *C. icaco* como uma espécie polimórfica¹². As Figura 9 e 10 ilustram as variações morfológicas quanto à cor do fruto maduro e ao hábito da planta, respectivamente, observadas entre os espécimes estudados.

O exame detalhado das exsiccatas não possibilitou distinção de quaisquer morfotipos a partir das entidades taxonômicas, embora tenha sido constatada variação considerável no tamanho das folhas. Exsiccatas de *C. icaco* dos espécimes estudados estão demonstradas na Figura 11. As medições foram feitas do menor ao maior tamanho de folhas e frutos em cada espécime, e características como textura da folha e tipo de ápice foram avaliadas. Mesmo quando as amostras foram classificadas com base nas cores de frutos maduros, não foram encontrados

diferenças óbvias. Dessa forma, verificou-se que a partir somente da morfologia não é possível classificar esses espécimes em nenhuma categoria significativa.



Figura 9 - Variações morfológicas quanto a cor do fruto maduro observadas entre os espécimes de *C. icaco* estudados. (a) Ajuru-branco – fruto amarelo-pálido. (b) Ajuru-preto – fruto roxo. (c) Ajuru-vermelho – fruto vermelho ou rosado.

Foto: Nádia E. N. P. Paracampo.

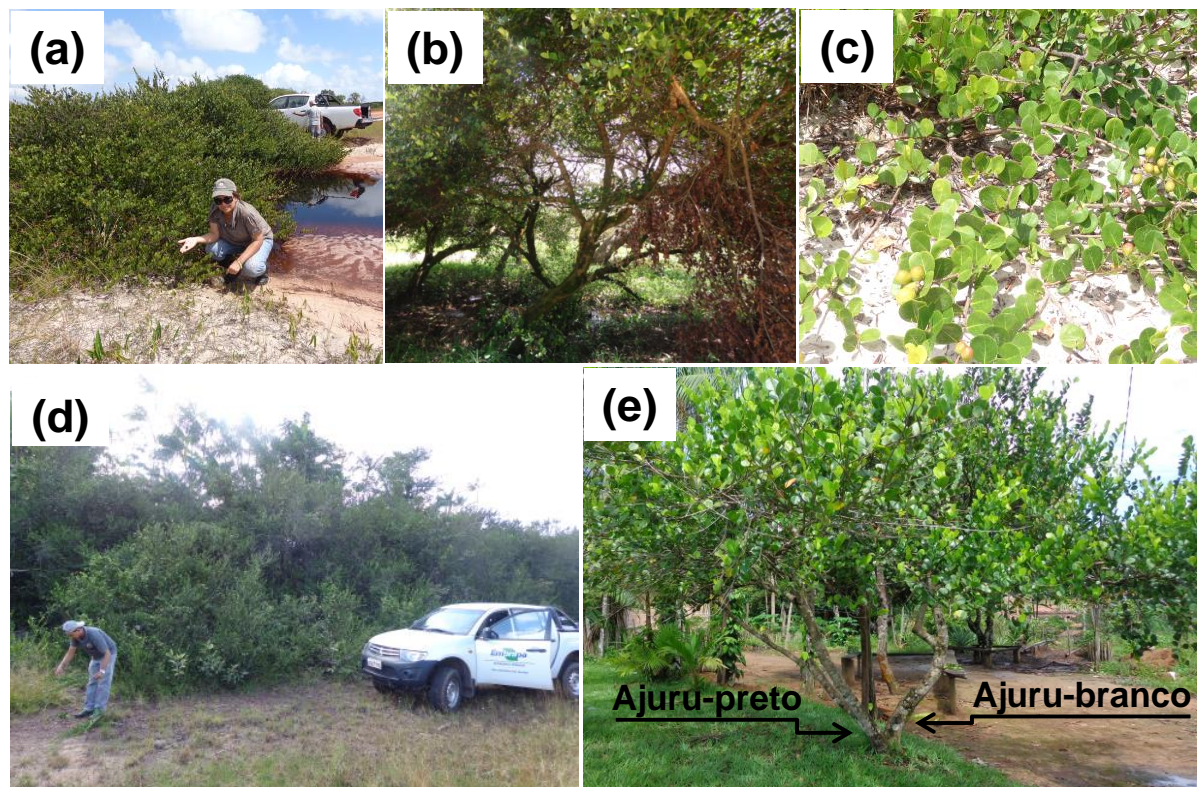


Figura 10 - Variações morfológicas quanto ao hábito da planta observadas entre os espécimes de *C. icaco* estudados. (a) Ajuru-preto, arbusto com 1,5 m de altura. (b) Ajuru-preto, árvore. (c) Ajuru-vermelho, arbusto rasteiro. (d) Ajuru-preto, arbusto com 4 m de altura. (e) Ajuru-preto e Ajuru-branco, árvores crescendo lado a lado como se fossem um único indivíduo.

Foto: Nádia E. N. P. Paracampo e Expedito Rodrigues da Silva Filho.

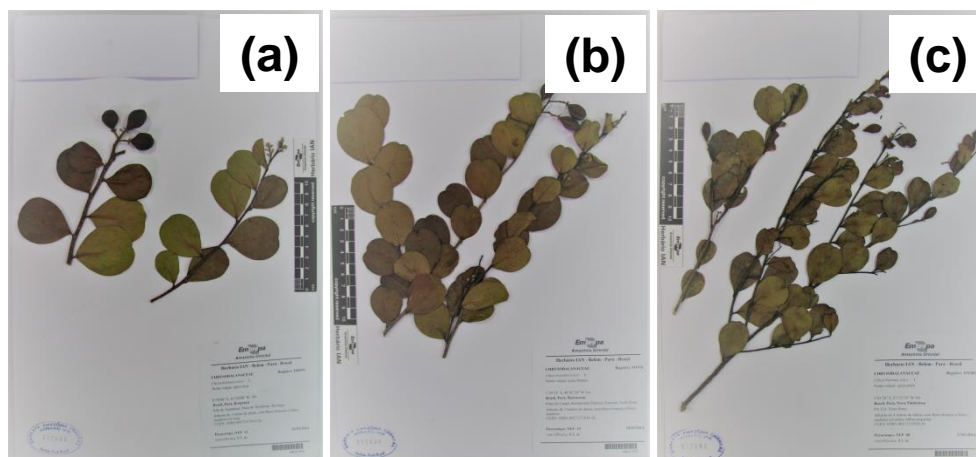


Figura 11 - Exsicatas de *C. icaco*. (a) Ajuru-vermelho, IAN 191979. (b) Ajuru-branco, IAN 191976. (c) Ajuru-preto, IAN191983.

Foto: Helena Joseane Raiol Souza.

4.2.2. Análises físico-químicas

Não existe monografia farmacopeica descrita para a espécie *C. icaco*, nem qualquer outro tipo de especificação. Dessa forma, as análises físico-químicas foram desenvolvidas a fim de estabelecer a avaliação qualitativa da droga vegetal e a padronização do extrato hidroalcoólico (tintura).

O teor de água das amostras variou de $7,4 \pm 0,3\%$ (m/m) a $10,9 \pm 0,3\%$ (m/m). O menor e o maior teor de água foram observados em RP2 e BE1, respectivamente (Gráfico 1). Foi verificado que todas as amostras analisadas apresentaram teor de água abaixo do limite máximo aceitável de 14% (m/m), preconizado em diferentes farmacopeias para plantas medicinais⁶⁴, indicando que as mesmas foram submetidas a processo adequado de secagem e armazenamento.

O teor de cinzas totais variou entre $3,52 \pm 0,04\%$ (m/m) e $7,32 \pm 0,07\%$ (m/m) e foram obtidos em RP2 e CT1, respectivamente (Gráfico 2). Esses resultados incluem cinzas fisiológicas e não fisiológicas⁹³.

O resíduo seco do extrato hidroalcoólico variou de $1,1 \pm 0,1\%$ (m/v) a $2,6 \pm 0,1\%$ (m/v) e foram verificados nas tinturas de CP1 e BR1, respectivamente (Gráfico 3).

Em trabalhos futuros, esses resultados poderão servir de referência a *C. icaco*, visto que não existe limite estabelecido.

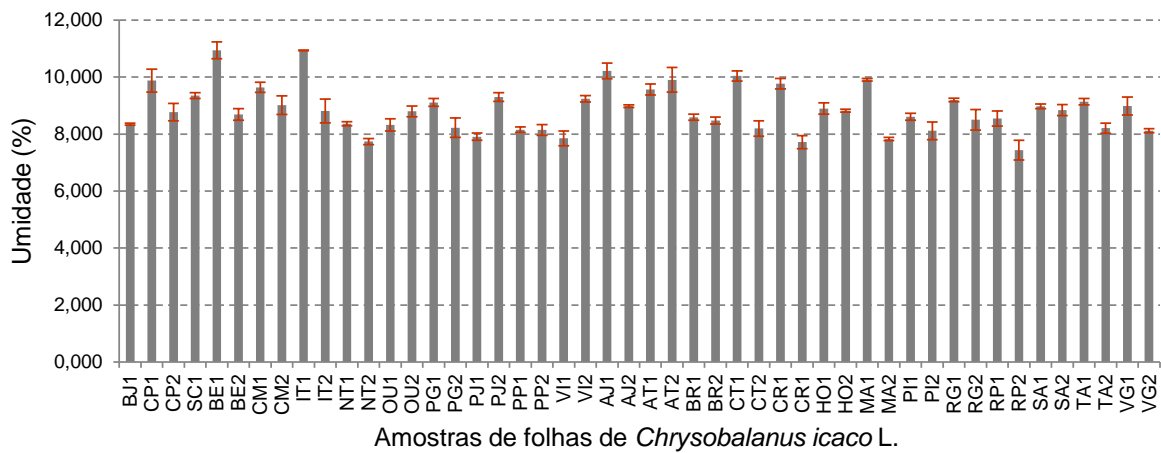


Gráfico 1 - Teor de umidade em amostras de folhas de *C. icaco*.

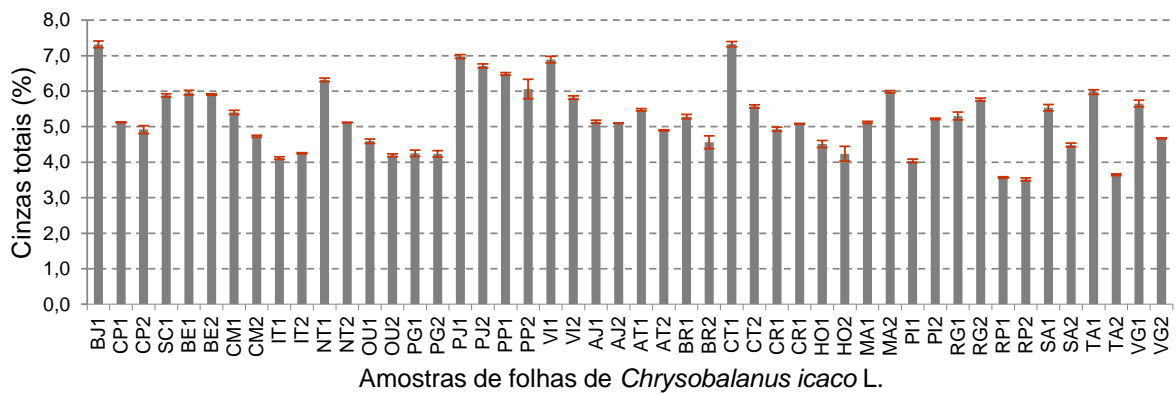


Gráfico 2 - Teor de cinzas totais em amostras de folhas de *C. icaco*.

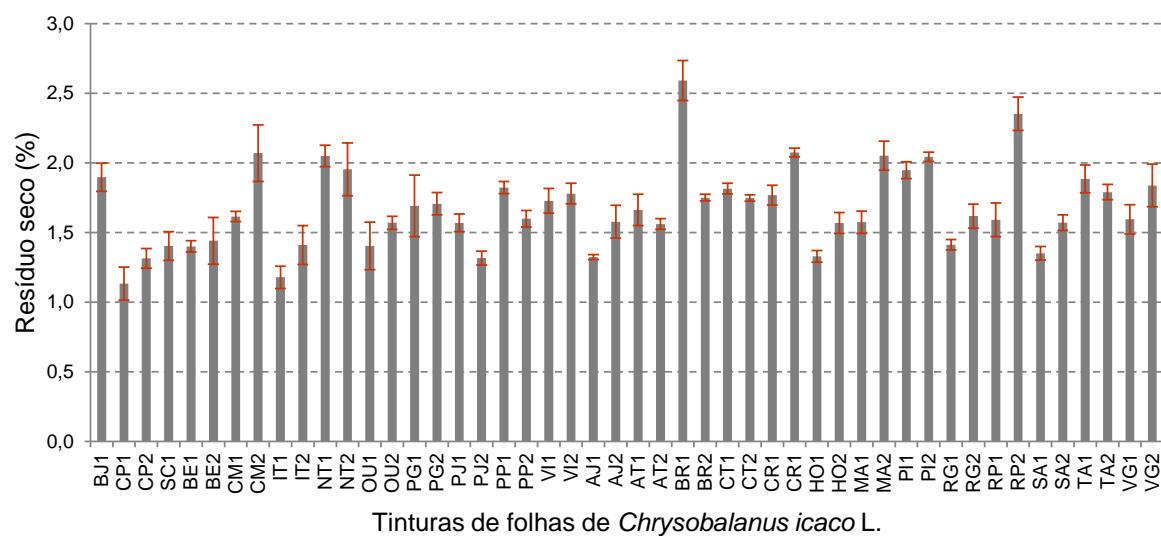


Gráfico 3 - Teor de resíduo seco em amostras de extrato hidroalcoólico 70% (tintura) de folhas de *C. icaco*.

5. PADRÃO DE IDENTIDADE DE *Chrysobalanus icaco* L. DETERMINADO PELA APLICAÇÃO DE *FINGERPRINTING* CROMATOGRÁFICO ASSOCIADO À QUIMIOMETRIA

5.1. Reagentes

Acetonitrila HPLC/Spectro Tedia; Ácido fórmico 98% PA ACS Merck.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Preparo da amostra

Alíquotas de cada extrato (tintura) foram centrifugadas durante 5 min a 9660 x g (MiniSpin[®] Eppendorf[®], HH, Alemanha) e soluções das amostras foram preparadas diluindo-se 400 µL de extrato em 10 mL de água (Direct Q-3 Millipore, MA, EUA). Em seguida, essas soluções foram filtradas em membranas de 0,22 µm de poro Millex[®]-GV (Merck Millipore, HE, Alemanha). As análises de *fingerprint* das tinturas de *C. icaco* foram realizadas a partir dos 144 extratos hidroalcoólicos e cada extrato foi injetado em duplicata no UHPLC-DAD.

5.2.2. Condições UHPLC-DAD

A análise por UHPLC foi realizada em sistema ACQUITY UPLC[®] (Waters Corporation, MA, EUA), equipado com bomba binária, amostrador automático e DAD. Para a separação cromatográfica foram utilizadas coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 mm × 50 mm; 1,8 µm) e pré-coluna Eclipse XDB-C18 (2,1 mm × 5 mm; 1,8 µm) (Agilent Technologies, CA, EUA). A fase móvel foi composta de (A) 1% de ácido fórmico em água e (B) acetonitrila, filtradas em membrana de 0,45 µm de poro Durapore[®] (Merck Millipore, HE, Alemanha). O seguinte sistema de gradiente foi usado: B 10% - 40% de 0 - 4,2 min, B 40% - 10% de 4,2 - 4,8 min, 10% de B mantido durante 0,6 min. A vazão foi de 0,3 mL/min. As temperaturas da coluna e do amostrador automático foram mantidas a 30 °C e 7 °C, respectivamente. O volume de injeção de amostra foi de 1 µL. O comprimento de onda foi fixado em 273 nm para a aquisição dos cromatogramas. Os espectros no UV-VIS foram adquiridos na faixa de 202 a 798 nm, com resolução de 4,8 nm, 80 pontos/s. O software empregado foi Empower versão 2 (Waters Corporation, MA, EUA).

5.2.3. Condições ESI-MS/MS

O sistema MS/MS utilizado foi o Xevo[®] TQD triplo quadrupolo, equipado com ESI (Waters Corporation, MA, EUA) e controlado pelo software MassLynx versão 4.1 (Waters Corporation, MA, EUA). As condições cromatográficas estabelecidas no UHPLC/DAD, foram aplicadas na análise por UHPLC/DAD/ESI-MS/MS em sistema ACQUITY UPLC[®] equipado com bomba quaternária, exceto pela concentração de (A) que foi reduzida para 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água, e pelo tempo de análise que foi estendido para 6,0 min. Análises *Full Scan* foram executadas na faixa m/z de 100 - 1000, com ionização em modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-). Os parâmetros instrumentais foram otimizados antes das análises das amostras utilizando quercetina como padrão. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização com fluxo de 1000 L/h e gás do cone com fluxo de 100 L/h. A temperatura de dessolvatação foi de 600 °C. No modo positivo, a voltagem no capilar e no cone foram 2,40 kV e 20 V, respectivamente. No modo negativo, a voltagem no capilar foi -1,50 kV e no cone foi -50 V. Nos experimentos de ESI-MS/MS, os íons mais abundantes foram selecionados como íons precursores para fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID). Argônio foi empregado como gás de colisão à pressão de $3,7 \cdot 10^{-3}$ mBar. Os espectros dos íons produtos foram registrados entre m/z 100 e m/z do íon sob estudo. A fragmentação foi realizada para cada composto usando-se rampa de energia de colisão (10 - 30 V) e de voltagem do cone (15 - 40 V), a fim de obter maior intensidade do sinal.

5.2.4. Análise quimiométrica

Os arquivos de dados gerados pelo DAD, de um total de 288 corridas cromatográficas, foram exportados no formato ARW usando o software Empower 2. Em seguida, foram convertidos para o formato xlsx usando Excel[®] 2010 (Microsoft Office, WA, EUA) e importados para o MATLAB[®] R2016a (MathWorks, MA, EUA). Os arquivos gerados pelo MS (MassLynx 4.1) foram convertidos ao Excel[®] e importados ao MATLAB[®]. O pré-tratamento dos dados incluiu alinhamento dos picos, utilizando o algoritmo COW⁶⁸, normalização e centragem na média. Depois, por meio da interface gráfica do PLS_Toolbox 7.3 (Eigenvector Technologies, WA, EUA), a classificação não supervisionada pela análise de componentes principais (PCA) foi

aplicada para avaliação das similaridades e diferenças entre esses perfis cromatográficos, bem como teve também o intuito de identificar tendências entre as amostras quanto às características morfológicas (hábito, cor do fruto maduro), procedência (origem geográfica, características do solo, proximidade com o mar) ou época de colheita.

Posteriormente, também foi utilizado o método supervisionado de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Os gráficos de *loadings* foram empregados para identificar a influência das variáveis na separação entre as classes. Todos os cálculos quimiométricos neste trabalho foram realizados em notebook Inspiron 15 Série 5000 da Dell® com processador Intel® Core™ i7-5500U (2.4 GHz, Cache de 4 MB); e memória 16 GB, Dual Channel DDR3, 1600 MHz.

5.2.5. Tratamento de resíduos

Os resíduos tóxicos gerados nesta etapa do trabalho experimental foram descartados e/ou tratados conforme as normas para a gestão de resíduos químicos do Instituto de Química da Unicamp (disponível em: <http://www.iqm.unicamp.br/sites/default/files/normasResiduos.pdf>).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Otimização do método *fingerprinting* por UHPLC-DAD

As condições propícias para o método UHPLC-DAD foram otimizadas por procedimentos univariados, tomando como partida os parâmetros descritos na literatura para avaliação de extratos de folhas de *C. icaco* por HPLC^{16,17}. Assim, a fim de melhorar o desempenho cromatográfico, o efeito da vazão da fase móvel foi examinado de 0,2 a 0,35 mL/min com a temperatura da coluna mantida em 30 °C, e a temperatura da coluna foi investigada de 25 a 35 °C à vazão de 0,3 mL/min. Em seguida, foram avaliados o volume de injeção de amostra de 0,7 a 1,3 µL e a concentração do modificador ácido de 0,1 a 1,1% (v/v), com a temperatura da coluna mantida em 30 °C e a vazão em 0,3 mL/min. Em relação à otimização do gradiente, foram considerados a composição da fase móvel e o tempo. Em seguida, observou-se que as respostas dos constituintes químicos detectáveis nas amostras ocorreram principalmente na região do espectro compreendida entre 235 e 411 nm. Além disso,

a maior intensidade dos picos cromatográficos foi verificada no comprimento de onda 273 nm, selecionado para realização do estudo. O tempo necessário para uma separação satisfatória foi de 5,4 min por amostra, bem inferior ao estabelecido para os protocolos para *C. icaco* por HPLC, que são de 30 a 50 min por amostra. As melhores condições de análise foram selecionadas com base na observação da qualidade de separação para detectar um número máximo de picos característicos dentro do comprimento do *fingerprint* e encontram-se descritas na Seção 5.2.2.

5.3.2. Validação do método *fingerprinting* por UHPLC-DAD

A validação de um método cromatográfico é pautada em compostos individuais e está muitas vezes relacionada à concentração de um único analito. No entanto, um *fingerprint* cromatográfico é um perfil químico de uma matriz complexa e, por conseguinte, sua validação é raramente realizada já que não representa a avaliação global desse perfil, que é na verdade uma propriedade da amostra⁹⁶. Mesmo assim, é indispensável identificar desvios inerentes ao processo da análise qualitativa por meio da validação, ou seja, conhecer a variabilidade intrínseca ao método, pois as similaridades e diferenças entre *fingerprints* devem ser avaliadas a partir de amostras homogêneas e estáveis.

No Brasil a ANVISA estabelece os parâmetros para a validação de métodos analíticos por meio da RE N° 899 de 29/05/2003⁹⁷ e métodos bioanalíticos por meio da RDC N° 27 de 17/05/2012⁹⁸. Porém, considerando-se a complexidade da matéria prima vegetal, os níveis de aceitação adotados para as análises de derivados de plantas medicinais são os estipulados para os métodos bioanalíticos (RSD \leq 15%) (disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf).

A validação do método *fingerprinting* por UHPLC-DAD, incluindo parâmetros de adequação do sistema, foi realizada com base em compostos individuais. Entre todos os picos observados (Figura 12), três deles (picos n° 6, 10 e 16) foram definidos como picos característicos e majoritários nos extratos de *C. icaco* e o pico 6 (RT = 1,91 min) foi escolhido como pico de referência para o cálculo do tempo de retenção relativo (RRT) e da área de pico relativa (RPA). Os desvios padrão relativo (RSD) de RRT e de RPA do pico 10 (RT = 2,21 min) e 16 (RT = 4,06

min) foram calculados para a estimativa de precisão de injeção, estabilidade da amostra, repetibilidade e precisão intermediária.

Como parâmetros para avaliação da conformidade do sistema, a precisão da injeção foi determinada pela análise de seis injeções da mesma solução da amostra, e os RSD do RRT e da RPA não excederam 0,07% e 2,19%, respectivamente; bem como o teste de estabilidade da solução da amostra foi avaliado por meio da análise da mesma solução da amostra em diferentes tempos (0, 2, 4, 8, 12 e 24 h), e os valores de RSD do RRT e da RPA estiveram abaixo de 0,41% e 4,84%, respectivamente.

A repetibilidade e precisão intermediária do método foram avaliadas pela análise de seis soluções de uma mesma amostra dentro de um único dia ($n = 6$) e em dias diferentes ($N = 12$), respectivamente. Em termos de repetibilidade, os valores de RSD do RRT e da RPA estiveram abaixo de 0,20% e 3,59%, respectivamente. Em termos de precisão intermediária, os valores de RSD do RRT e da RPA não excederam 1,18% e 4,63%, respectivamente.

Todos os testes foram realizados com soluções de extrato da amostra codificada como BE1, escolhida aleatoriamente, preparada como descrito na Seção 5.2.1. Os resultados estão resumidos na Tabela 2 e todos os valores de RSD estão de acordo com os critérios de aceitação das agências reguladoras para métodos analíticos ($RSD \leq 5\%$)^{97,99}, o que indica que o método *fingerprinting* por UHPLC-DAD foi satisfatoriamente validado.

Tabela 2 - Dados de conformidade do sistema e validação do método *fingerprinting* de extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco* (extrato BE1) por UHPLC-DAD.

Pico nº	Precisão da injeção RSD (%)		Estabilidade* RSD (%)		Repetibilidade RSD (%)		Precisão intermediária RSD (%)	
	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA	RRT	RPA
10	0,07	1,15	0,15	3,39	0,07	2,37	0,16	2,43
16	0,04	2,19	0,41	4,84	0,20	3,59	1,18	4,63

Nota:

* Tempo: 0, 2, 4, 8, 12 e 24h.

5.3.3. Fingerprints UHPLC-DAD de *C. icaco*

As amostras de *C. icaco* foram coletadas em diversas localidades em Estado da Amazônia brasileira, a partir de diferentes solos e em duas estações distintas. Ainda que essas amostras tenham apresentado as variações morfológicas já descritas, verificou-se que seus perfis cromatográficos, por inspeção visual, demonstraram-se semelhantes ou sem diferenças evidentes. Embora variações de intensidade em bandas cromatográficas tenham sido observadas. Diante disso, constatou-se a importância de abordagem para o reconhecimento de padrões.

Nos perfis, pôde-se ver cerca de 16 picos comuns e os cromatogramas *fingerprint* representativos de cada morfotipo com base na cor do fruto maduro estão apresentados na Figura 12. Os picos considerados nas análises de precisão estão identificados com os algarismos arábicos 6, 10 e 16, seguidos por seus respectivos tempos de retenção.

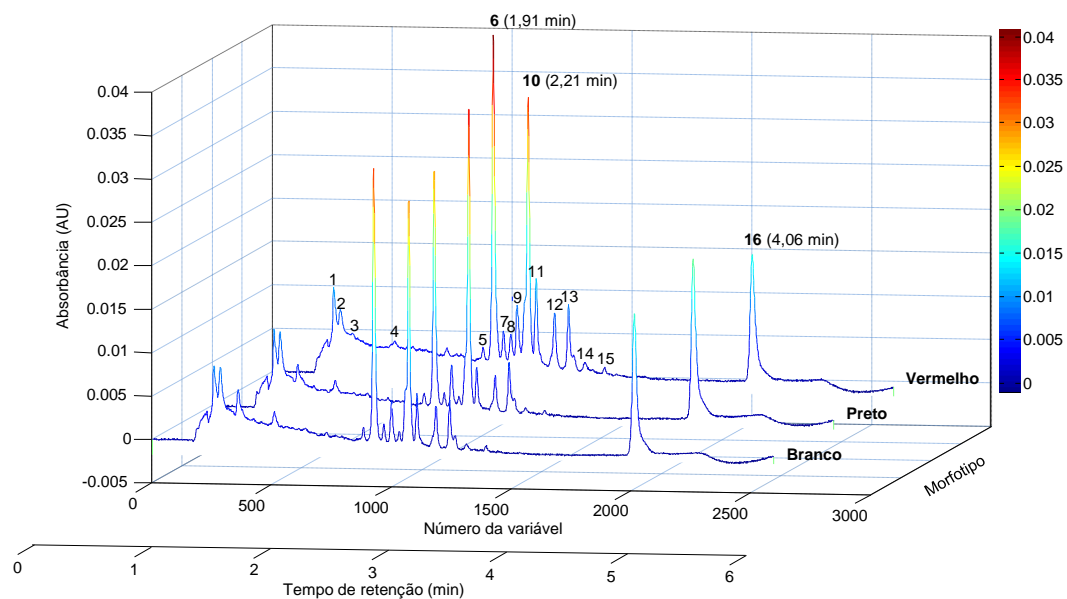


Figura 12 - Fingerprints UHPLC-DAD representativos de extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco* para cada morfotipo (cor do fruto) (extratos BJ1, VI1 e BR1). Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18; temperatura da coluna: 30 °C; fase móvel: (A) 1% ácido fórmico em água e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,3 mL/min; volume de injeção: 1 μ L; tempo de análise: 5,4 min; detecção: 273 nm. Os picos característicos e majoritários utilizados nos cálculos de desvios padrão relativo no procedimento de validação do método estão identificados com os algarismos arábicos 6, 10 e 16 e seus respectivos tempos de retenção.

5.3.4. Caracterização dos três picos majoritários por UHPLC-DAD-ESI-MS/MS

Para caracterizar e tentar identificar os picos mais intensos (nº 6, 10 e 16) nos *fingerprints* de *C. icaco*, foram obtidos os espectros no UV/Vis. Todos os três picos mostraram espectros no UV típicos de flavonoides com bandas a 340–354 nm (banda I) e 226–268 nm (banda II) (Apêndice A). Além disso, ambos os modos de ionização positivo e negativo foram operados na análise por MS. Inicialmente, os 144 extratos de *C. icaco* foram analisados, com injeção única, no modo *Full Scan* para avaliação dos cromatogramas de íons totais (TIC). Verificou-se pelos resultados maior intensidade dos íons no modo negativo que no modo positivo, assim ESI no modo negativo foi aplicado para a aquisição de íons precursores e íons produtos das amostras BJ1, VI1 e BR1, selecionadas por apresentarem maior intensidade de sinal em 273 nm. As condições usadas no UHPLC foram as mesmas, apenas a concentração de ácido fórmico em água (0,1%) foi reduzida para evitar a perda de sensibilidade^{100,101}.

No espectro de massas do pico 6 (Figura 13), verificou-se íon precursor $[M-H]^-$ em m/z 493 (100%), indicando massa molecular de 494 amu para o composto 6. Pela análise MS/MS, observou-se fragmento em m/z 317 (100%) correspondente à perda de ácido glucurônico (176 amu), semelhante ao padrão de fragmentação do flavonoide miricetina 3-O-glucuronideo, já identificado em extratos hidroalcoólicos e aquosos de folhas de *C. icaco*^{16,17}.

Na análise do pico 10 (Figura 14), observou-se íon precursor em m/z 595 (100%), indicando massa molecular de 596 amu para o composto 10. No espectro de fragmentação do íon precursor, verificaram-se íons produtos em m/z 595 (100%) e m/z 316. O íon produto em m/z 316 pode ser atribuído a aglicona miricetina, após a perda de uma unidade de pentose (132 amu) e uma unidade de ramnose (146 amu) a partir de $[M-2H]^-$, que também já foi anteriormente identificada por Barbosa e colaboradores como miricetina ligada a uma unidade de pentose e ramnose¹⁶.

Nos dados de MS para o pico 16 (Figura 15), observou-se íon precursor em m/z 363 (100%), indicando massa molecular de 364 amu para o composto 16. No espectro de fragmentação, observaram-se íons produtos em m/z 348 (100%), m/z 363, m/z 283 e m/z 268. O íon produto em m/z 348 foi deduzido como $[M-H-CH_3]^-$ correspondente à perda de metila (15 amu). Entretanto, além disso, não

existem dados suficientes para sugerir uma identificação confiável. Apesar de todos os esforços, não foi possível desreplicar o composto 16 a partir das técnicas utilizadas e, conseqüentemente, o mesmo permanece desconhecido.

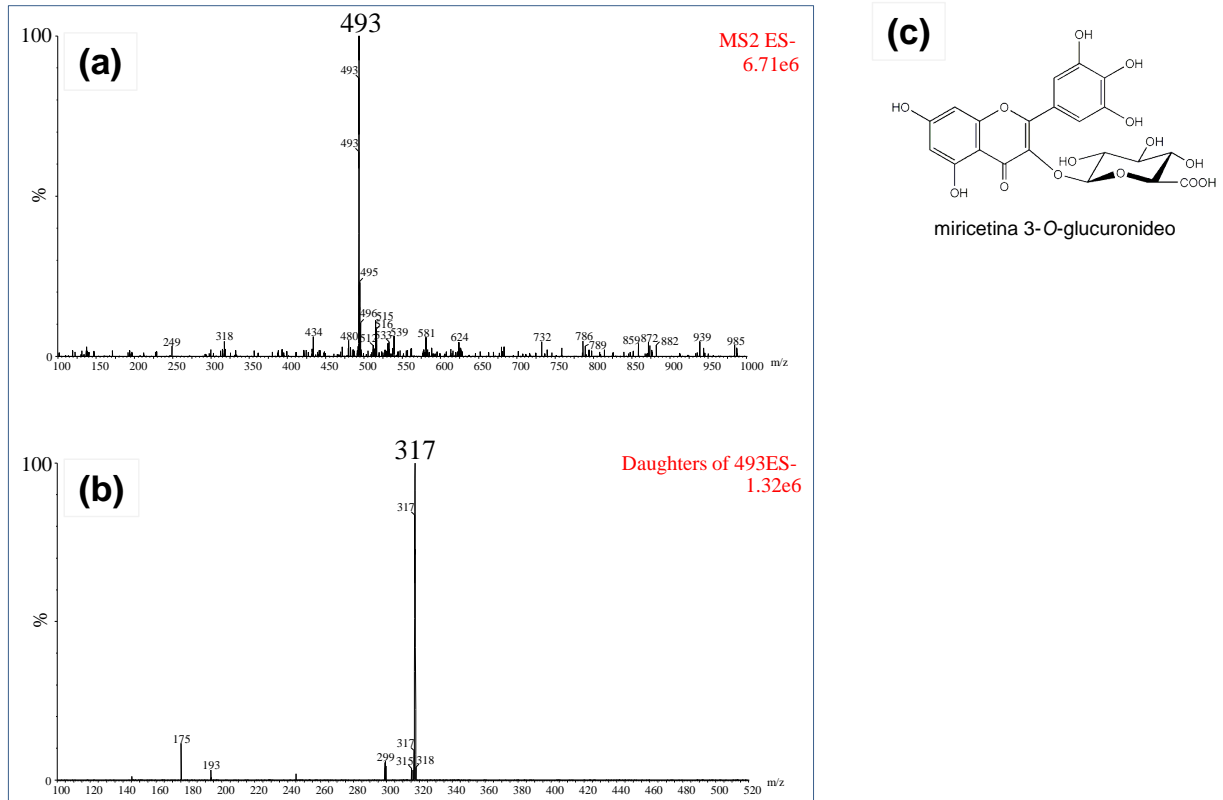


Figura 13 - Espectros de fragmentação MS/MS do pico 6, modo negativo (ESI-), do *fingerprint* UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. icaco*. (a) Íon precursor. (b) Íon produto. (c) Estrutura química da miricetina 3-O-glucuronideo.

Na verdade, mesmo os compostos 6 e 10 encontram-se descritos na literatura apenas com identificação provisória, sem o uso de padrões autênticos^{16,17} e, portanto, recomenda-se a identificação inequívoca também desses compostos, incluindo sua estereoquímica, mediante: extração, fracionamento, isolamento e técnicas espectroscópicas complementares, como ressonância magnética nuclear.

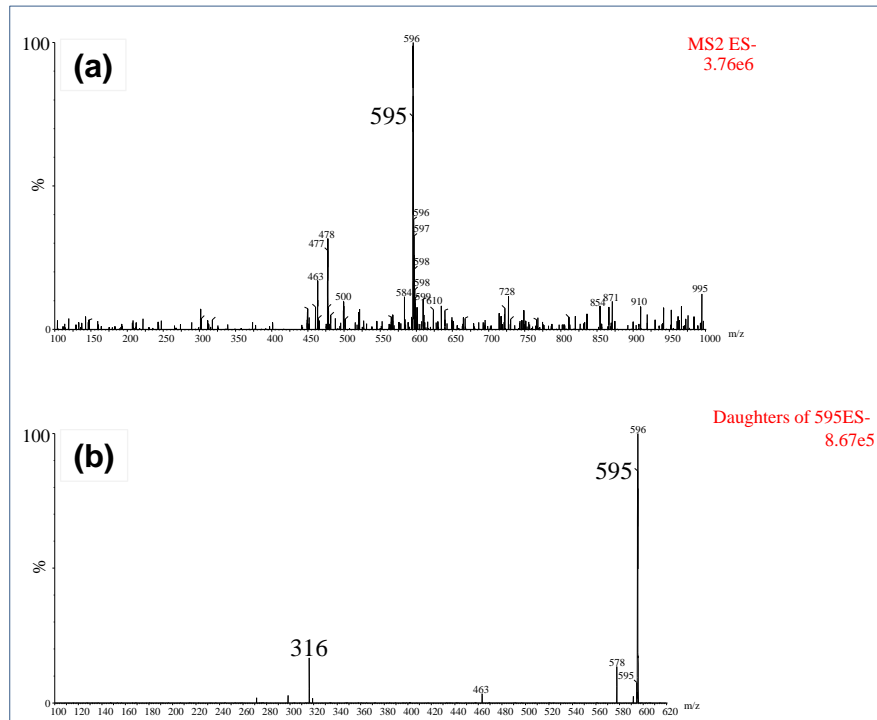


Figura 14 - Espectros de fragmentação MS/MS do pico 10, modo negativo (ESI-), do *fingerprint* UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. icaco*. (a) Íon precursor. (b) Íon produto.

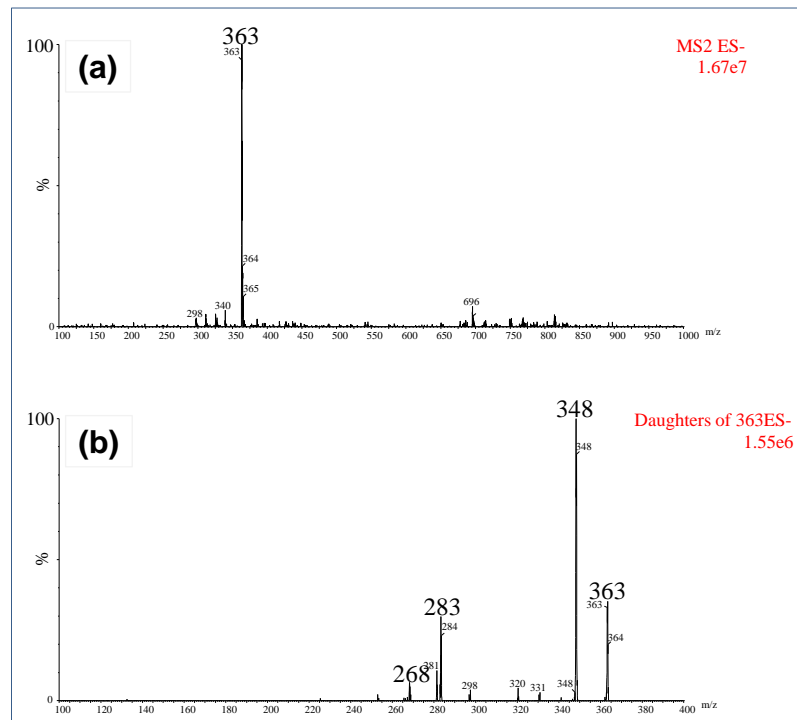


Figura 15 - Espectros de fragmentação MS/MS do pico 16, modo negativo (ESI-), do *fingerprint* UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. icaco*. (a) Íon precursor. (b) Íon produto.

5.3.5. Análise quimiométrica

5.3.5.1. Análise multivariada dos dados gerados pelo DAD

A análise de *fingerprint* das 48 amostras de *C. icaco* por UHPLC-DAD resultou em um total de 288 cromatogramas (6 replicatas). Para cada cromatograma, obteve-se a matriz de dados (\mathbf{X}_n) de dimensões 25921 \times 123 (tempo de retenção \times comprimento de onda) e calculou-se a matriz transposta (\mathbf{X}_n^T). A maior intensidade dos picos foi verificada no comprimento de onda de 273 nm, que foi selecionado para a realização do estudo e, dessa maneira, a matriz transposta foi reduzida a um vetor linha. Em seguida, o número de pontos nos dados de tempo de retenção dessa matriz foi reduzido (tempos de retenção tomados a cada 10 variáveis, reduzindo para 2593 pontos), sem prejudicar as características originais do cromatograma, com a singular finalidade de facilitar o processamento de dados. Depois, usou-se o cromatograma de cada amostra e as suas repetições para compor as matrizes de dados originais de dimensões 6 \times 2593 para cada amostra. Em cada uma dessas matrizes, os picos foram alinhados por COW⁶⁸ usando códigos para o MATLAB, incluindo a seleção automática de parâmetros e cromatograma de referência. O cromatograma médio de cada uma das 48 amostras de *C. icaco* foi calculado, resultando em vetores de dimensão 1 \times 2593, que foram combinados para formar a matriz $\mathbf{M}_{48 \times 2593}$, com o objetivo de estabelecer parâmetros quimiométricos comparativos para discriminação das amostras. Antes da análise multivariada, o algoritmo automatizado foi aplicado também à matriz $\mathbf{M}_{48 \times 2593}$ para seleção dos parâmetros de deformação otimizada (cromatograma de referência = 14; *segment length* = 452; *slack size* = 11) empregados no alinhamento dos *fingerprints* das 48 amostras de *C. icaco*. Após o alinhamento, os cromatogramas foram normalizados para área unitária e centrados na média utilizando a interface PLS_Toolbox. A análise multivariada PCA, não supervisionada, e PLS-DA, supervisionada, também foram realizadas usando essa interface. Validação cruzada foi empregada para avaliar o desempenho dos modelos obtidos por PCA e PLS-DA. Utilizou-se o método *Venetian Blinds* (com 6 separações) como procedimento de validação cruzada.

5.3.5.1.1. Análise de componentes principais

A PCA foi empregada para investigar a existência de qualquer padrão nos

dados que pudessem ser utilizados para extrair informações a partir dos *fingerprints* de *C. icaco*. Inicialmente, avaliaram-se *outliers* que foram atribuídos à variabilidade na medição e, por isso, não houve necessidade de removê-los. Em seguida, os três primeiros componentes principais, que representaram 82,19% da variância total (PC1 46,89%, PC2 25,99% e PC3 9,30%), foram considerados significativos e observou-se no gráfico 3D de *scores* da PCA (Gráfico 4), uma clara tendência à separação de amostras do morfotipo vermelho (cor do fruto maduro) em relação às dos outros morfotipos (branco e preto). Além disso, embora o tamanho da amostra do morfotipo branco tenha sido pequeno, foi possível notar uma tendência de sobreposição entre as amostras do morfotipo branco e as do morfotipo preto, não podendo ser distinguidas. Cada ponto no Gráfico 4 representa uma amostra individual e foi codificado de acordo com o seu morfotipo (triângulos invertidos para morfotipo vermelho, quadrados para morfotipo preto e estrelas para morfotipo branco). Portanto, as amostras de *C. icaco* foram diferenciadas e categorizadas em dois grupos de acordo com os morfotipos: Grupo I (morfotipo vermelho) e Grupo II (morfotipo branco e morfotipo preto).

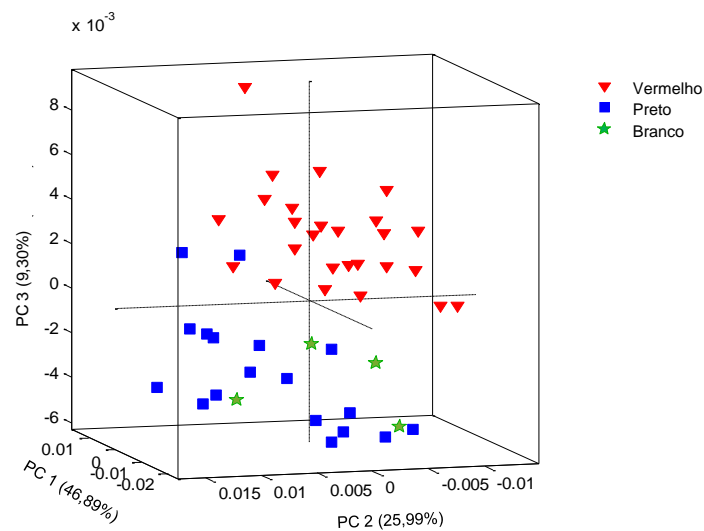


Gráfico 4 - Gráfico de *scores* da análise de componentes principais (PCA) – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição e agrupamento dos dados de UHPLC-DAD das 48 amostras de *C. icaco*, que descreve 82,19% do total de variância dos dados. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas).

A melhor separação para distinguir os dois grupos foi observada em PC3. Sendo assim, examinando as variáveis responsáveis pela discriminação dos grupos no gráfico de *loadings* da PCA (Gráfico 5), verificou-se que a variável 2010 (com *loading* negativo), que corresponde ao composto 16, está forte e negativamente correlacionada ao Grupo I.

A partir desse resultado, pôde-se concluir que os Grupos I e II não são qualitativamente consistentes ou fitoequivalentes entre si, pois extratos vegetais considerados fitoequivalentes devem apresentar os mesmos constituintes em concentrações exatas ou dentro de um intervalo de variação racional⁶⁵. A existência desses dois quimiotipos de *C. icaco*, observada pela primeira vez, provavelmente não teria sido percebida sem uma análise holística dos dados dos *fingerprints* UHPLC-DAD, ou seja, apenas por comparação visual dos perfis cromatográficos ou pela utilização de métodos convencionais para quantificação de marcadores, ao invés do uso de métodos de reconhecimento de padrões.

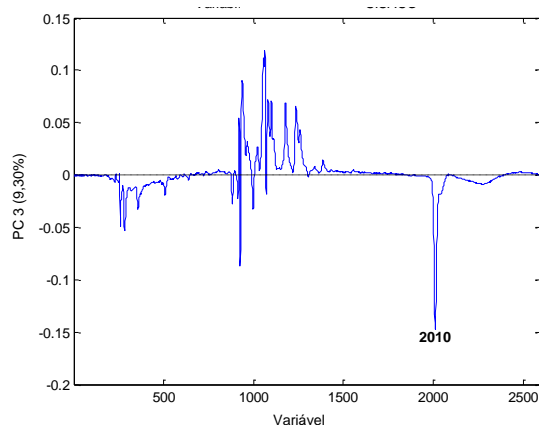


Gráfico 5 - Gráfico de *loadings* da análise de componentes principais (PCA) – visualização das variáveis responsáveis pela separação de grupos em PC3. A variável assinalada corresponde ao composto 16 no *fingerprint* UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. icaco*.

5.3.5.1.2. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

O algoritmo PLS-DA foi empregado na construção de um modelo de classificação. Os dados dos *fingerprints* UHPLC-DAD foram utilizados como variáveis **X**, enquanto que as variáveis **Y** foram associadas aos dois grupos previamente definidos pelo modelo PCA.

As amostras de *C. icaco* foram divididas em dois grupos: um conjunto de 40 amostras (22 do morfotipo vermelho e 18 do morfotipo preto) foi selecionado para construir o conjunto de calibração, a fim de desenvolver e otimizar o modelo PLS-DA. As demais 8 amostras (4 do morfotipo vermelho e 4 do morfotipo branco) foram utilizadas para validação externa. Intencionalmente, as amostras consideradas como possíveis *outliers* na análise exploratória de componentes principais e as poucas amostras do morfotipo branco foram utilizadas como subconjunto de validação externa.

Na classificação, foram necessárias 4 variáveis latentes (LVs) para definir adequadamente as classes de *C. icaco*: Classe 1 (morfotipo vermelho) e Classe 2 (não morfotipo vermelho). O gráfico 3D de *scores* PLS-DA (Gráfico 6) mostrou a óbvia discriminação das classes consideradas, confirmando as diferenças em seus *fingerprints*. Cada ponto representa uma amostra individual e foi codificado de acordo com a sua classe (triângulos invertidos para Classe 1 e círculos para Classe 2). Todas as amostras utilizadas para calibração foram corretamente classificadas e os valores de sensibilidade e especificidade foram de 1,00. Para a validação cruzada, a sensibilidade e a especificidade foram superiores a 0,944.

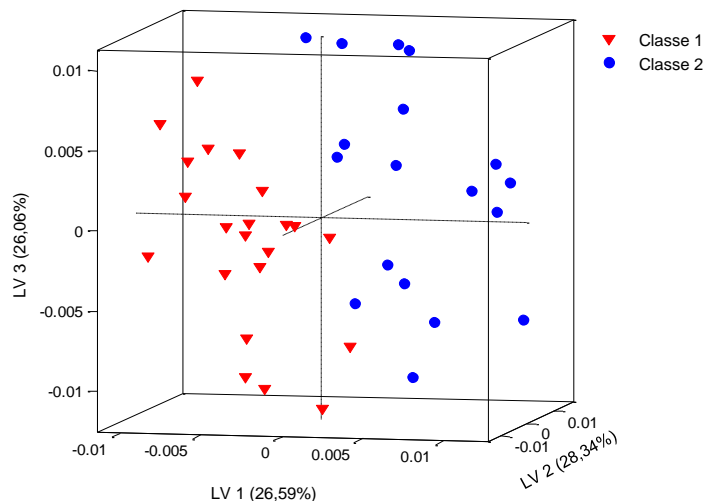


Gráfico 6 - Gráfico de *scores* da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) – visualização 3D (LV1xLV2xLV3) da distribuição dos dados de calibração das amostras de *C. icaco*. Os símbolos indicam Classe 1 (triângulos invertidos) e Classe 2 (círculos).

O modelo PLS-DA foi aplicado para classificar as 8 amostras do subconjunto de validação externa. O resultado das previsões para a Classe 1 está apresentado na Gráfico 7. A probabilidade limiar de associação da amostra com a Classe 1 no modelo foi de 0,5111, que foi estimada com base na estatística bayesiana. A partir das regras PLS-DA, considerou-se que uma amostra pertencia à Classe 1 quando o valor estimado da classe apresentava um valor superior ao limiar de discriminação (linha tracejada vermelha). Verificou-se que o modelo PLS-DA foi capaz de discriminar as amostras de *C. icaco* com sensibilidade igual a 1 e capacidade preditiva de 100%.

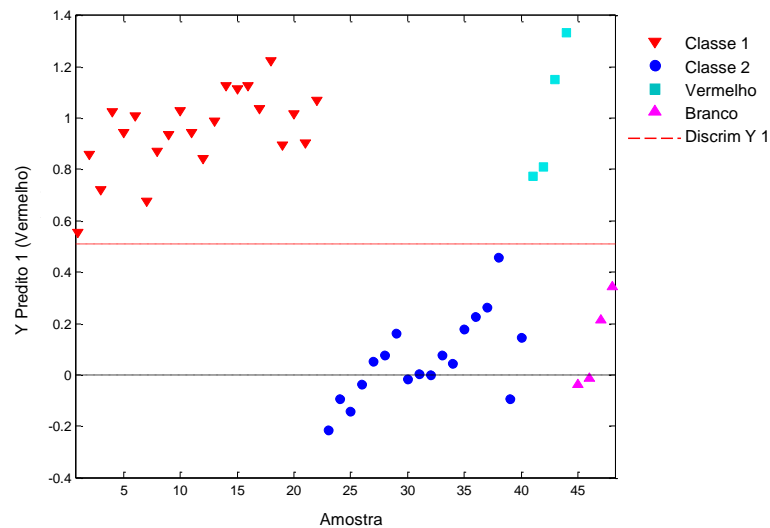


Gráfico 7 - Gráfico de scores da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) – visualização da capacidade preditiva do modelo PLS-DA para *C. icaco*. As amostras que caíram acima da linha tracejada superior foram consideradas pertencentes à Classe 1. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (quadrados) e morfotipo branco (triângulos). O limiar de discriminação foi de 0,5111.

Pela estratégia utilizada no conjunto de validação externa, observou-se no Gráfico 7 que os "outliers" (quadrados) foram de fato classificados como Classe 1. Além disso, foi verificado que os valores estimados para amostras de morfotipo branco (triângulos) as classificou como Classe 2, o que confirmou o resultado obtido pela PCA.

Os *loadings* para LV1 estão demonstrados na Gráfico 8a. As variáveis 925 (com *loading* negativo) e 1070 (com *loading* positivo), que correspondem aos

picos dos compostos 6 (miricetina 3-*O*-glucuronideo) e 10 (miricetina ligada a uma unidade de pentose e uma de ramnose), respectivamente, são as de maior magnitude e parecem fortemente responsáveis pela separação na LV1. Ambos são derivados de miricetina e estão positivamente e negativamente correlacionados com morfotipo vermelho, respectivamente.

Adicionalmente, as variáveis foram avaliadas usando a projeção da importância da variável (VIP) (Gráfico 8b), que estima a importância individual de cada variável no modelo PLS-DA. Assim, verificou-se que as variáveis que apresentam valor VIP superior a 1 (*threshold* = 1, linha tracejada vermelha) são as mais relevantes para a classificação; sendo possível notar que os maiores valores VIP (assinalados com asteriscos) correspondem aos picos dos compostos majoritários (6, 10 e 16) no *fingerprint* de *C. icaco*. A relação dos valores VIP está apresentada na Tabela 3.

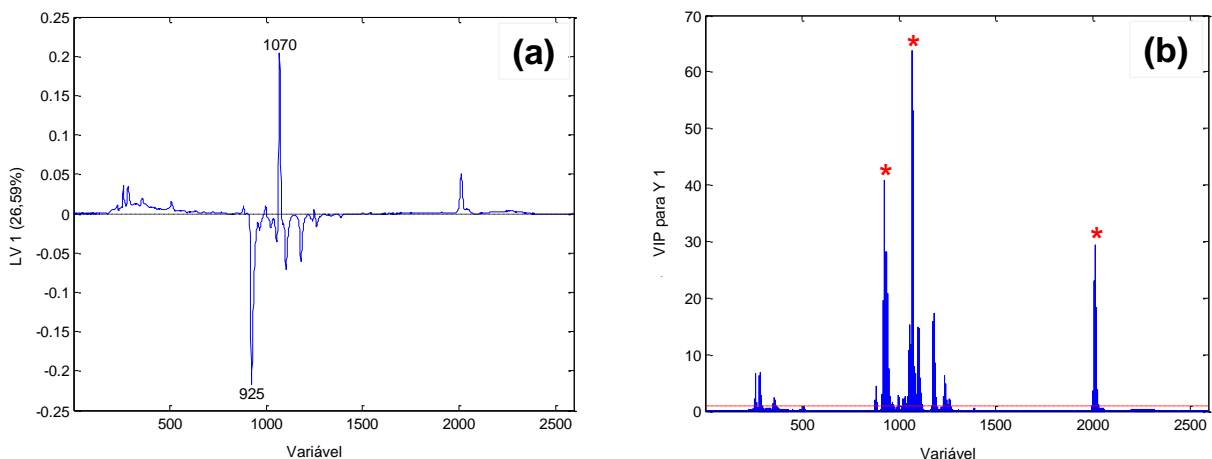


Gráfico 8 - Análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA). (a) Gráfico de *loadings* – visualização das variáveis com maior magnitude e fortemente responsáveis pela separação em LV1. As variáveis assinaladas correspondem aos compostos 6 e 10 no *fingerprint* UHPLC-DAD. (b) Gráfico VIP – visualização da projeção da importância da variável (VIP). Os asteriscos vermelhos indicam as variáveis com as maiores pontuações VIP e que correspondem aos compostos 6, 10 e 16 no *fingerprint* UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. icaco*.

Tabela 3 - Projeção da importância da variável (VIP) para variáveis discriminatórias (*threshold* = 1).

Pico	*Tempo de retenção (min)	Variável	[M – H] ⁺ (m/z)	Valor VIP
1	0,46	259	377	6,79
2	0,62	284	609	5,81
3	0,76	361	609	1,66
5	1,83	883	**	2,76
6	1,91	925	493	43,6
7	3,14	934	449	30,3
8	3,22	999	645	1,97
9	3,36	1055	463	14,6
10	2,21	1070	595	68,3
11	2,30	1100	**	15,3
12	3,64	1179	629	17,7
13	3,80	1238	579	5,04
16	4,06	2010	363	31,4

Nota:

* Tempos de retenção no DAD.

** Picos observados no DAD, mas não detectados por MS.

Recentemente, os resultados apresentados acima foram publicados no periódico *Journal of Separation Science*, v. 40, n.10, p.2161-2169, 2017.

5.3.5.2. Análise multivariada dos dados gerados pelo ESI-MS

O extrato de uma planta medicinal é usualmente composto por diversas classes de compostos químicos, que podem requerer diferentes métodos analíticos e/ou diferentes métodos de detecção. Como cada detector fornece informação significativamente distinta¹⁰², realizou-se análise exploratória também no conjunto de dados gerados pelo ESI-MS durante o *Full Scan* dos 144 extratos de *C. icaco*, no modo negativo. Na Figura 16, observam-se TICs característicos de cada morfotipo de *C. icaco*, onde os picos definidos como característicos dos extratos segundo análise por DAD (picos nº 6, 10 e 16) estão identificados pelas letras a, b e c, respectivamente. Por inspeção visual, verificou-se a presença de cerca de 14 picos com variações nas intensidades das bandas cromatográficas.

Para cada um dos 144 TICs, obteve-se um vetor constituído por 297 linhas (tempos de retenção) e 1 coluna ($\lambda = 273$ nm), a partir do qual se calculou o vetor linha. Em seguida, cada amostra e suas repetições foram usadas para compor as matrizes de dados originais de dimensões 3 × 297, cujos picos foram alinhados usando COW com seleção automática de parâmetros *segment length* e *slack size*, bem como cromatograma de referência para cada matriz⁶⁸. Depois disso, o

cromatograma médio de cada amostra foi calculado, resultando em vetores 1×297 , que foram combinados para formar a matriz $T_{48 \times 297}$ utilizada na análise quimiométrica. Antes da PCA, o algoritmo automatizado foi aplicado também à matriz $T_{48 \times 297}$ para seleção dos parâmetros de COW (cromatograma de referência = 39; *segment length* = 75; *slack size* = 10) empregados no alinhamento dos *fingerprints* das 48 amostras de *C. icaco*. Posteriormente, os cromatogramas foram alinhados, normalizados para área unitária e centrados na média, utilizando a interface gráfica PLS_Toolbox.

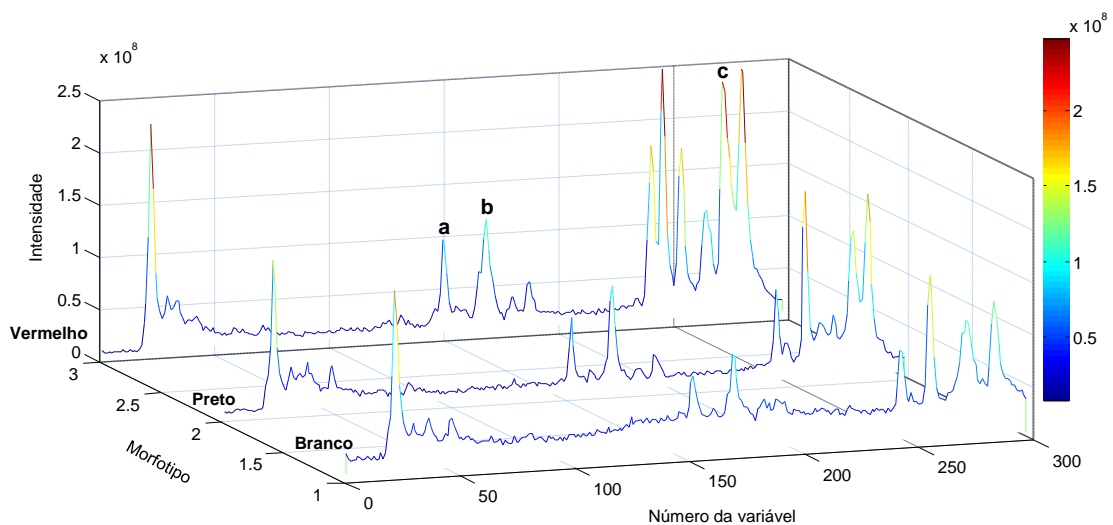


Figura 16 - Cromatogramas de íons totais representativos de extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco* para cada morfotipo (cor do fruto) (extratos BJ1, VI1 e BR1). Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18; temperatura da coluna: 30 °C; fase móvel: (A) 0,1% ácido fórmico em água e (B) acetonitrila; eluição em gradiente; vazão: 0,3 mL/min; volume de injeção: 1 μ L; tempo de análise: 6 min; modo de ionização: negativo. Os picos identificados pelas letras a, b e c correspondem aos picos 6, 10 e 16, definidos pela análise por DAD como característicos, respectivamente.

Na análise exploratória, três PCs que descreveram 68,77% da variância dos dados foram selecionados. No gráfico 3D de *scores* da PCA (Gráfico 9a), verificou-se que as amostras do morfotipo vermelho também se agruparam distintamente dos outros dois morfotipos pela projeção nos três primeiros componentes principais (PC1 35,77%, PC2 20,55% e PC3 12,45%), assim como foram igualmente divididas em dois grupos relativos: Grupo I (morfotipo vermelho) e

Grupo II (morfotipos branco e preto). A melhor separação para distinguir os dois grupos foi percebida em PC2. As variáveis responsáveis pelo agrupamento observado foram identificadas no gráfico de *loadings* da PCA. Examinando os *loadings* em PC2 (Gráfico 9b), observou-se que as variáveis 22 e 279 (com *loadings* positivos) se destacaram, indicando maior peso sobre a discriminação do morfotipo vermelho em relação aos morfotipos preto e branco. Portanto, deduziu-se que essas variáveis estão positivamente correlacionados ao Grupo I, ou seja, seriam mais intensas no morfotipo vermelho em comparação aos demais. Além disso, constatou-se que a variável 273, que corresponde ao pico identificado como c no TIC (pico nº 16 no *fingerprint* UHPLC-DAD de *C. icaco*), manteve-se negativamente correlacionado ao Grupo I. Dessa forma, a análise exploratória dos TICs obtidos por ESI-MS ratificou o resultado observado a partir dos dados de DAD.

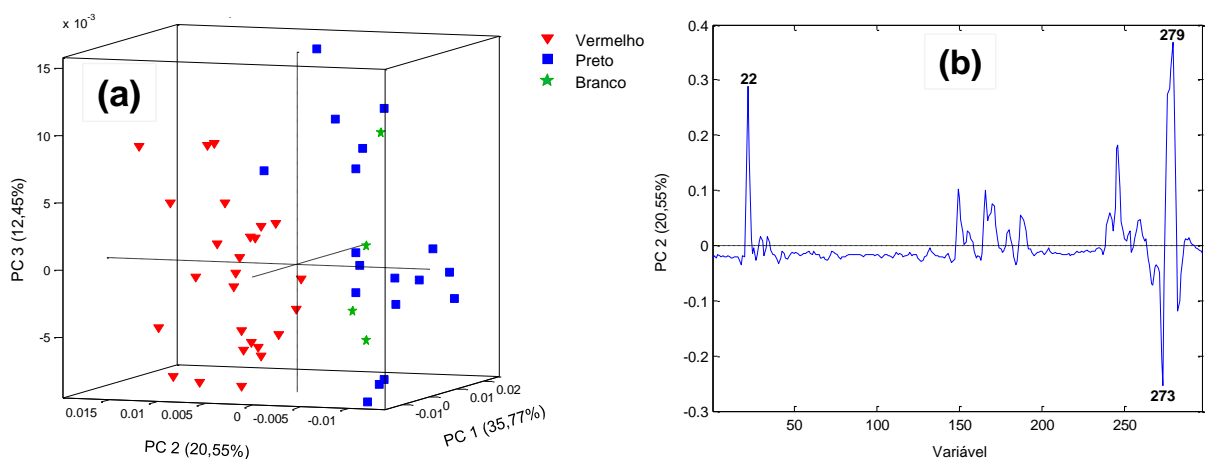


Gráfico 9 - Análise de componentes principais (PCA). (a) Gráfico de *scores* – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição e agrupamento dos dados de UHPLC-ESI-MS das 48 amostras de *C. icaco*, que descreve 68,77% do total de variância dos dados. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas). (b) Gráfico de *loadings* – visualização das variáveis responsáveis pela separação de grupos em PC2. As variáveis assinaladas representam as com maior magnitude e a variável 273 corresponde ao composto 16 no *fingerprint* UHPLC-DAD.

6. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PROCEDÊNCIA E DA SAZONALIDADE DO MATERIAL BOTÂNICO SOBRE O FINGERPRINT UHPLC-DAD DE *Chrysobalanus icaco* L. E CORRELAÇÃO DESSES DADOS COM OS DAS ANÁLISES DE FERTILIDADE DE SOLO E DE TECIDO FOLIAR

6.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nesta etapa foram da marca Synth grau analítico.

6.2. Material e métodos

As análises de fertilidade do solo e de tecido foliar foram realizadas com a colaboração do Analista Químico da Embrapa Amazônia Oriental, Me. Orivan Maria Marques Teixeira (Anexo 3).

6.2.1. Análise quimiométrica dos dados de *fingerprint* UHPLC-DAD

Nesta etapa, foram considerados apenas os dados de *fingerprint* UHPLC-DAD referentes às 23 amostras de *C. icaco* que possuem material coletado nos dois períodos (chuvoso e menos chuvoso), visto que dois dos indivíduos de ajuru-branco foram podados, conforme descrito na Seção 4.1.1. Assim, foram considerados 46 extratos e, portanto, 138 cromatogramas. Esse procedimento foi adotado com o intuito de, por análise exploratória, avaliar a influência específica de fatores ambientais nos *fingerprints*. Inicialmente, o tratamento dos dados foi similar ao descrito na Seção 5.3.5.1. Na sequência, os vetores das amostras 1×2593 foram combinados para formar a matriz $P_{46 \times 2593}$. A PCA foi antecedida pelo alinhamento dos picos cromatográficos com a aplicação do algoritmo automatizado à matriz $P_{46 \times 2593}$. Os parâmetros de COW⁶⁸ também foram selecionados automaticamente: cromatograma de referência = 12; *segment length* = 452; *slack size* = 10.

6.2.2. Análise de fertilidade de solo

O Laboratório de Solos da Embrapa Amazônia Oriental participa do Programa de Análise de Qualidade de Laboratórios de Fertilidade (PAQLF), coordenado pela Embrapa Solos.

Determinações de macro e micronutrientes, bem como outros indicadores da composição dos solos foram realizadas nas 47 amostras, em duplicata e de acordo com procedimentos estabelecidos no “Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes”¹⁰³: pH em água (Quimis[®], SP, Brasil); cálcio, cálcio+magnésio, alumínio, nitrogênio, acidez potencial e matéria orgânica por volumetria; sódio e potássio usando fotômetro de chama Q498M2 (Quimis[®], SP, Brasil); fósforo disponível por espectrofotometria no UV-VIS (Biospectro, PR, Brasil); ferro, zinco, cobre e manganês foram realizadas em espectrômetro de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas MP-AES 4200 (Agilent Technologies, CA, EUA), no qual o fluxo de nebulização e posição de visualização foi otimizado para cada analito pelo software MP Expert. Os resultados foram organizados e calculados em planilha Excel[®] 2010 (Microsoft Office, WA, EUA).

6.2.3. Análise de tecido foliar

O Laboratório de Solos da Embrapa Amazônia Oriental participa do Programa Interlaboratorial de Análise de Tecido Vegetal (PIATV), coordenado pela ESALQ-USP.

Foram determinados macro e micronutrientes nas 48 amostras de tecido foliar, em duplicata, conforme procedimentos estabelecidos no “Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes”¹⁰³: nitrogênio pelo método de Kjeldahl; potássio usando fotômetro de chama; fósforo por espectrofotometria no UV-VIS; cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre e manganês por MP-AES. Para digestão do tecido vegetal, foi utilizado um sistema de digestão por micro-ondas Start D (Milestone, BG, Itália). Os resultados foram organizados e calculados em planilha Excel[®].

6.2.4. Análise quimiométrica dos dados de fertilidade do solo e tecido foliar

As planilhas Excel[®] contendo os dados referentes às análises de fertilidade do solo e de tecido foliar foram convertidas para arquivos do MATLAB[®]. Em seguida, no PLS_Toolbox, os dados das matrizes de dimensões 47 x 14 (dados de fertilidade do solo) e 48 x 9 (dados de tecido foliar) foram autoescalados,

tornando-se adimensionais. Depois, aplicou-se a PCA para reconhecimento de padrões dentro de cada conjunto de dados.

6.2.5. Tratamento de resíduos

Os resíduos tóxicos gerados nas análises de fertilidade do solo e de tecido foliar foram descartados e/ou tratados conforme as normas para a gestão de resíduos químicos nos laboratórios da Embrapa Amazônia Oriental¹⁰⁴.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Análise química de fertilidade de solo e de tecido foliar

O principal propósito da análise química para avaliação da fertilidade do solo é determinar a suficiência ou deficiência de nutrientes para o desenvolvimento da planta, além de condições adversas como acidez, salinidade, etc., que o possam prejudicar¹⁰⁵. Esses nutrientes disponíveis no solo exercem funções específicas na fisiologia da planta como: estrutural, constituinte de enzimas ou ativador enzimático. Ademais, as condições de precipitação afetam a umidade do solo e, por isso, necessitam ser consideradas para melhor interpretação da disponibilidade dos macro e micronutrientes. Enquanto que, a análise de tecido foliar é normalmente utilizada para avaliação do estado nutricional da planta, assim como indicar a falta de algum nutriente no solo^{106,107}.

Sobre a nutrição de *C. icaco*, pesquisadores reportaram que essa planta se desenvolve em solo ácido, salino-sódico e também em solo com pH neutro, todos de baixa fertilidade e, em sua maioria, extremamente arenosos. Foram observados teores reduzidos de N (nitrogênio) e P (fósforo) nas folhas, ramos, inflorescências e frutos imaturos dessa espécie, em relação aos da maioria das plantas cultivadas. Contudo, sem apresentar sinais visíveis de deficiência nutricional. Mesmo vegetando em locais de fertilidade, salinidade e disponibilidade hídrica muito variadas, essa planta manteve concentrações similares de N, P, K (potássio) e Na (sódio) nos órgãos analisados¹⁰⁸. Adicionalmente, foi verificado que o hábito de crescimento dessa planta (árvore ou arbusto) ou altura pode estar relacionado à disponibilidade de água, nutrientes e/ou concorrência por luz, pois em ambiente com solo argiloso e maior diversidade vegetal, o crescimento é mais vertical⁶⁹. Essa hipótese também

pôde ser observada entre os 25 espécimes de *C. icaco* estudados neste projeto, conforme demonstrado na Tabela 1, Seção 4.1.

Um dos principais fatores que podem interferir na disponibilidade dos nutrientes no solo e que, portanto, afetam a absorção e a nutrição das plantas¹⁰⁹ é o pH ou acidez ativa. Nas amostras de solo coletadas no hábitat dos 25 espécimes de *C. icaco* silvestres, observou-se que o pH variou entre $4,4 \pm 0,2$ e $6,6 \pm 0,3$. Outro indicador da qualidade do solo é o teor matéria orgânica, cujos resultados estiveram entre $0,5 \pm 0,2$ e $36,3 \pm 0,6$ g/kg.

Os Gráficos 10 e 11 ilustram os resultados obtidos na determinação de potássio e matéria orgânica no solo, respectivamente. No Gráfico 12, verificam-se os resultados de zinco obtidos na análise de tecido foliar. Os demais resultados da análise de fertilidade de solo encontram-se no Apêndice B e os de tecido foliar, no Apêndice C.

O nitrogênio é um dos nutrientes de função estrutural bastante requerido pela maioria das culturas. Entretanto, é extremamente móvel no solo, o que dificulta sua determinação e interpretação eficiente dos resultados¹¹⁰. Talvez isso explique os valores de desvios padrão tão elevados obtidos para nitrogênio no solo (Apêndice B).

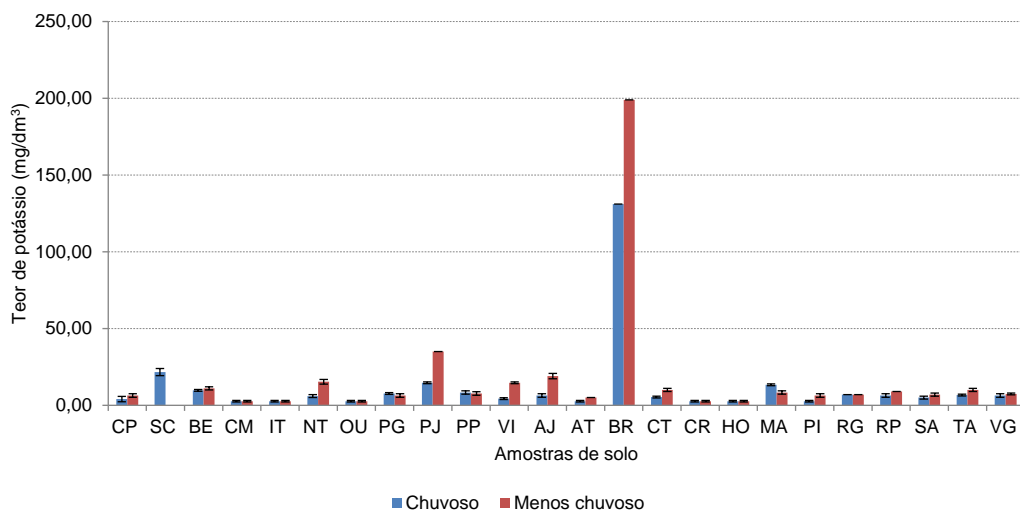


Gráfico 10 - Análise de fertilidade do solo – teor de potássio, determinado por fotometria de chama, das 47 amostras de solo coletadas no habitat dos espécimes de *C. icaco* durante o período chuvoso e menos chuvoso.

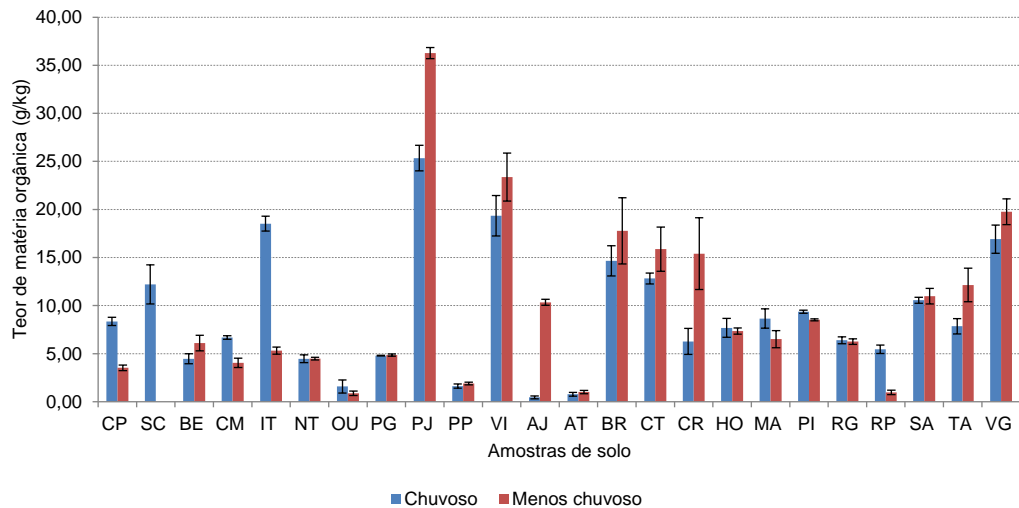


Gráfico 11 - Análise de fertilidade do solo – teor de matéria orgânica, determinado por volumetria, das 47 amostras de solo coletadas no habitat dos espécimes de *C. icaco* durante o período chuvoso e menos chuvoso.

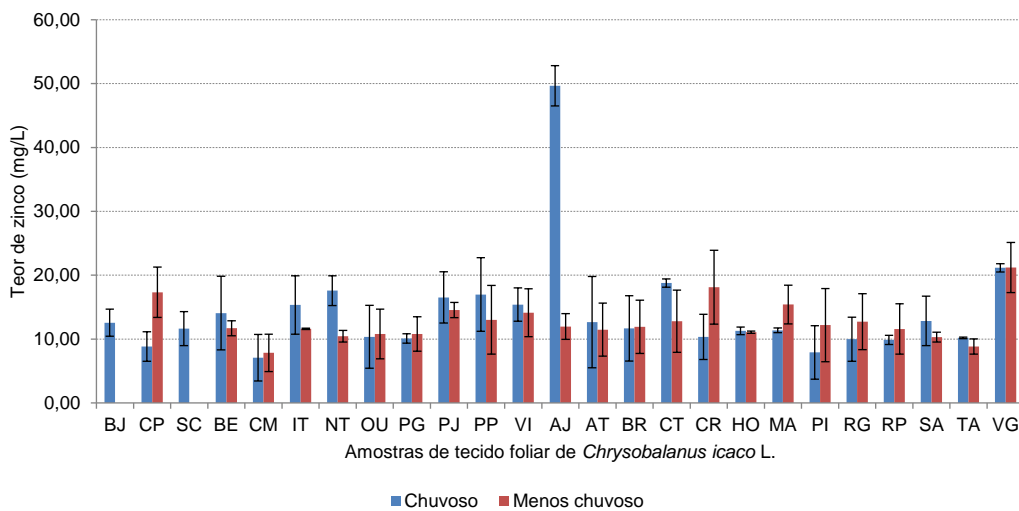


Gráfico 12 - Análise de tecido foliar – teor de zinco, determinado por MP-AES, das 48 amostras de folhas de *C. icaco* coletadas durante o período chuvoso e menos chuvoso.

6.3.2. Análise exploratória dos dados de fertilidade de solo e de tecido foliar

Na PCA aplicada às matrizes de dados de solo e de tecido foliar, não se distinguiu nenhum agrupamento ou tendência dentro dos conjuntos de dados analisados, quanto às características morfológicas (hábito, cor do fruto maduro),

procedência (origem geográfica, características do solo, proximidade com o mar) ou época de colheita.

6.3.3. *Fingerprint* x procedência x sazonalidade x fertilidade do solo x tecido foliar

Pesquisadores têm descrito muitas hipóteses sobre a influência de fatores ambientais no metabolismo de plantas medicinais como, por exemplo, a existência de relação entre a biossíntese e/ou acúmulo de compostos fenólicos e a incidência solar; a idade da planta; o estresse oxidativo, hídrico ou térmico; e os estágios de floração e frutificação^{111,112}. Esses estudos têm sido obtidos principalmente com o intuito de determinar a época ideal para fins de colheita.

Igualmente, a investigação de relação entre a produção de metabólitos secundários e o conteúdo de metais no solo e/ou folha tem sido relatada^{32,113}. Assim, verificou-se a influência ora positiva, ora negativa da concentração de potássio sobre os teores de flavonoides glicosilados, dependendo da espécie em estudo^{111,114,115}.

Para *C. icaco*, Nissen-Levi e colaboradores observaram que nas folhas de plantas tratadas com sais de magnésio, foi detectado o dobro da concentração de antocianinas que as do grupo controle em mesmo estágio de desenvolvimento¹¹⁶. Resultados como esse podem ser considerados estratégicos à manipulação de nutrientes com o propósito de alterar positivamente o metabolismo de uma planta medicinal ou, simplesmente, para a domesticação da espécie.

Desta forma, a análise de fertilidade do solo, bem como de tecido foliar foram realizadas com a finalidade de investigar a possível correlação entre os valores de nutrientes no solo e na folha com a resposta no perfil químico dos extratos de *C. icaco*, em condições de hábitat com maior ou menor precipitação pluviométrica.

Na análise exploratória da matriz $P_{46 \times 2593}$, foram selecionados dois PCs que descreveram 73,31% da variância dos dados. No gráfico de *scores* da PCA (Gráfico 13), cada ponto representa uma amostra individual. As amostras de mesma procedência estão interligadas por um segmento de reta, onde as extremidades correspondem às amostras coletadas no período chuvoso (1) e menos chuvoso (2).

Verificou-se que a maioria dos *scores* para as amostras de mesma procedência apresentaram tendência a agrupamento. Entretanto, algumas das 46 amostras de *C. icaco* encontram-se localizadas em ambos os lados (positivo e negativo) no eixo PC2. Esses resultados sugerem que o *fingerprint* UHPLC-DAD do extrato de *C. icaco* sofre variação com relação à origem geográfica e à época de colheita. Entretanto, não foi observada a formação de agrupamentos ou tendências referentes ao hábito da planta, tipo de solo, mesorregião de procedência ou disponibilidade de algum nutriente no solo.

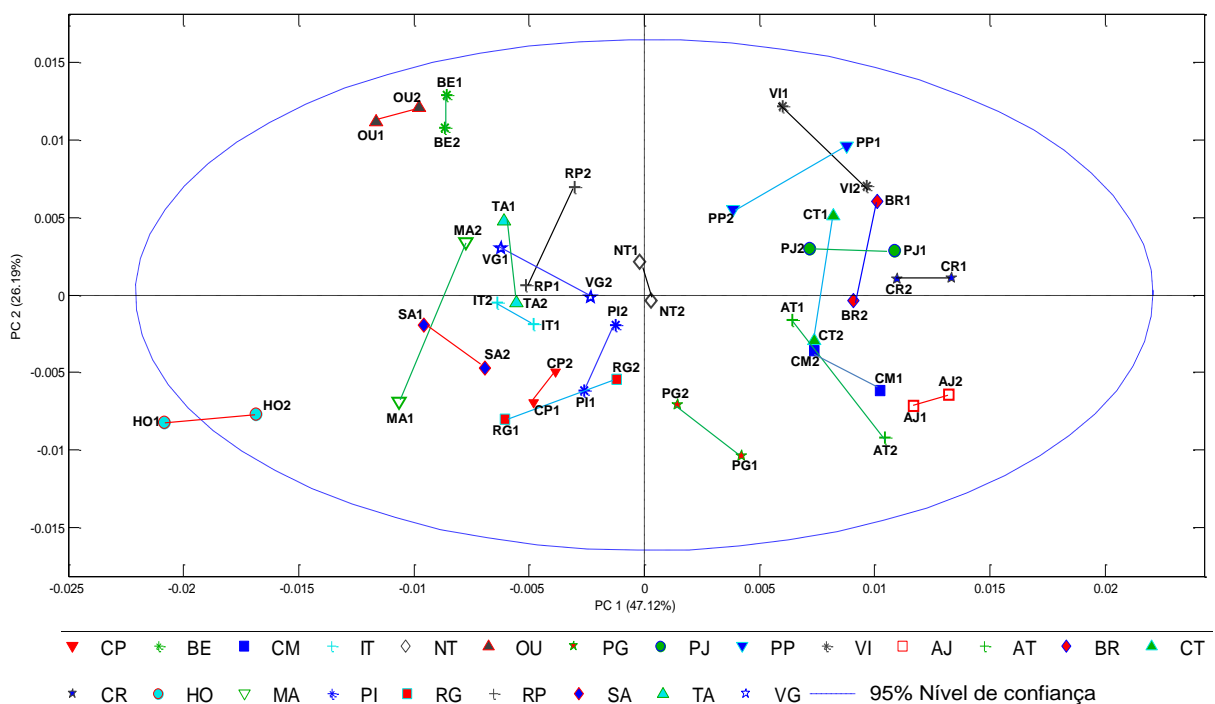


Gráfico 13 - Gráfico de *scores* da análise de componentes principais (PCA) – visualização (PC1xPC2) da distribuição dos dados de *fingerprint* UHPLC-DAD das 46 amostras de *C. icaco*, que descreve 73,31% do total de variância dos dados. Cada ponto representa uma amostra individual. As amostras de mesma procedência estão interligadas por um segmento de reta, onde as extremidades correspondem às amostras coletadas no período chuvoso (1) e menos chuvoso (2).

Em relação à análise química do solo, observou-se no Gráfico 13 uma tendência de distribuição da amostra no eixo PC2 vinculada à concentração do nutriente como, por exemplo, potássio (K), ou seja, quanto maior o teor de K na amostra de solo (Gráfico 10), mais negativa a posição da amostra de *C. icaco* em

PC2, especialmente as amostras localizadas em ambos os lados no eixo PC2: NT, BR, CT, MA, TA e VG.

As variáveis responsáveis por essa distribuição foram identificadas a partir do gráfico de *loadings* em PC2 (Gráfico 14), onde foi possível verificar que dois picos se destacaram: o primeiro (negativo) referente à variável 925 e o segundo (positivo), referente à variável 1070, que correspondem aos compostos 6 (RT = 1,91 min) e 10 (RT = 2,21 min), respectivamente, definidos como característicos do extrato de *C. icaco* por UHPLC-DAD. Portanto, a partir dessa observação, inferiu-se a correlação positiva do composto 6 (miricetina 3-O-glucuronideo) à concentração de K no solo, o que sugere a participação desse nutriente como ativador no sistema enzimático de produção desse flavonoide.

Potássio é o segundo nutriente mais requerido pelas plantas, depois do nitrogênio. Embora não desempenhe nenhum papel estrutural nas plantas, sua principal função bioquímica é exatamente a ativação enzimática, além de ser responsável também pela regulação osmótica¹⁰⁷.

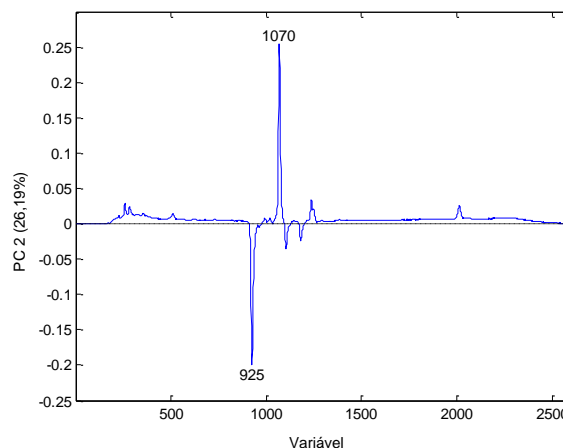


Gráfico 14 - Gráfico de *loadings* da análise de componentes principais (PCA) – visualização das variáveis responsáveis pela distribuição das amostras em PC2. As variáveis assinaladas correspondem aos compostos 6 e 10 no *fingerprint* UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. icaco*.

Em relação à análise química do tecido foliar, notou-se uma tendência similar de distribuição da amostra no eixo PC2 associada à concentração do nutriente zinco (Zn), por exemplo: quanto maior o teor de Zn na amostra de tecido

vegetal (Gráfico 12), mais positiva a posição da amostra de *C. icaco* em PC2 (Gráfico 13), especialmente as amostras localizadas em ambos os lados no eixo PC2: NT, BR, CT, MA, TA e VG. Conseqüentemente, deduziu-se a correlação do composto 10 (miricetina ligada à unidade de pentose e ramnose) à concentração de Zn na folha; cuja principal função no metabolismo das plantas é como componente e ativador enzimático¹⁰⁷.

Todavia, essas observações estão sustentadas apenas na interpretação visual desses gráficos e, portanto, necessitariam ser refinadas por meio de análises multiconjuntos, que utilizem simultaneamente todas essas variáveis para extração de informação útil, com a finalidade de permitir interpretação confiável sobre a influência desses nutrientes na produção de metabólitos secundários em *C. icaco*.

7. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR DE FLUXO INVERTIDO USANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA ANÁLISE DE *FINGERPRINT* DE *Chrysobalanus icaco* L.

7.1. Reagentes

Hidróxido de sódio (NaOH) PA 97% Synth; Ácido fosfórico (H₃PO₄) PA 85% Synth; Dodecil sulfato de sódio (SDS) 99% Sigma.

7.2. Material e métodos

7.2.1. Preparo da amostra

Alíquotas de cada extrato (tintura) foram centrifugadas durante 5 min a 9660 x g (MiniSpin[®] Eppendorf[®], HH, Alemanha). Em seguida, foram filtradas em membranas de 0,22 µm de poro Millex[®]-GV (Merck Millipore, HE, Alemanha).

7.2.2. Condições CE-DAD

Nesta etapa, utilizou-se um sistema de eletroforese capilar (CE) modelo 1600 (Agilent Technologies, CA, EUA), equipado com DAD, amostrador automático e sistema de controle de temperatura do capilar, controlados pelo software ChemStation (revisão B.04.01(481)). Os espectros foram adquiridos na faixa de 190 a 600 nm e os eletroferogramas monitorados em 230 nm, 254 nm, 280 nm, 330 nm e 350 nm. As separações foram realizadas empregando-se capilar de sílica fundida AG 160-2650-5 (Agilent Technologies, CA, EUA) de 50 µm de diâmetro interno (i.d.) e 58,5 cm de comprimento total (50,0 cm de comprimento efetivo até o detector). A janela para detecção foi aberta a 8,5 cm de uma das extremidades do capilar, mediante a queima do revestimento externo de poliimida nessa região, de maneira a obter-se abertura de 2,0 mm. Antes do primeiro uso, o capilar foi condicionado pela passagem de solução aquosa de NaOH 0,1 mol/L por 30 min. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi lavado com a mesma solução alcalina (5 min), água ultrapura (5 min) e finalmente condicionado com o eletrólito de corrida (BGE) por 20 min. Além disso, após cada corrida, o condicionamento do capilar foi realizado com NaOH 0,1 mol/L (1 min), água ultrapura (2 min) e BGE (5 min) a 950 mbar.

A fim de obter o perfil eletroforético ou *fingerprint* CE-DAD contendo o maior número de picos e maior eficiência de separação, ensaios por CE foram inicialmente avaliados, incluindo eletroforese capilar de zona. Posteriormente, a partir da adaptação do método RF-MEKC proposto por Rabanes e colaboradores para extratos vegetais¹¹⁷, foram realizados estudos univariados para otimização das condições experimentais: concentração do extrato, concentração do eletrólito, potencial de separação, tempo e pressão da injeção hidrodinâmica, temperatura e tempo de análise. Assim, foram definidos os seguintes parâmetros: concentração do extrato, concentração original da tintura (1:10); injeção hidrodinâmica, 25 mbar por 6 s; potencial de separação, -20 kV; temperatura de análise, 20 °C; tempo de análise, 30 min. No que se refere a solução de separação, Rabanes e colaboradores¹¹⁷ propuseram 50 mmol/L de H₃PO₄ a pH 2,5 e 50 mmol/L de SDS. Essa concentração de SDS foi definida após a realização de estudo sobre o efeito da concentração de SDS variando de 10 a 100 mmol/L em 50 mmol/L de H₃PO₄, onde consideraram eficiência de separação e tempo de análise, como parâmetros de avaliação.

A otimização do BGE é o procedimento mais crítico nas análises de CE¹¹⁸. Por isso, com o intuito de otimizar a solução de separação a ser empregada na obtenção do *fingerprint* CE-DAD de *C. icaco* partindo dos valores recomendados acima, utilizou-se o método de planejamento de experimentos (DOE), que avalia também as interações entre os fatores¹¹⁹. As concentrações das soluções usadas na separação foram estudadas mediante delineamento composto central (CCD) 2² contendo três pontos centrais e quatro axiais, assumindo como variável resposta o “número de picos” monitorado em 254 nm, visto que nesse comprimento de onda os picos apresentaram maior intensidade. O procedimento foi desenvolvido com três replicatas autênticas no ponto central. Cada ensaio do delineamento foi realizado em ordem aleatória e com duplicata de injeção. Nas Tabelas 4 e 5, observam-se os dados do primeiro delineamento adotado.

O valor de α foi calculado em função do número de variáveis independentes ($n = 2$) por meio da equação¹²⁰:

$$\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,41$$

A amplitude de variação entre o limite inferior e o superior de cada fator foi calculada de modo que incluísse no planejamento a concentração ótima da solução de separação proposta por Rabanes e colaboradores¹¹⁷: $[H_3PO_4] = 50$ mmol/L (pH 2,5) e $[SDS] = 50$ mmol/L; bem como o limite inferior da concentração de SDS não fosse menor que sua concentração micelar crítica (CMC = 8,2 mmol/L). A amostra de tintura de *C. icaco* utilizada nos ensaios foi a codificada como BE1, selecionada na Seção 5.3.2. Os resultados foram tratados pelo software Statistica[®] versão 10 (StatSoft, OK, EUA), realizando-se análise de variância (ANOVA) para estimar efeitos estatisticamente significativos.

Tabela 4 - Níveis codificados e reais dos fatores do primeiro delineamento composto central.

Fatores	Níveis codificados e reais dos fatores				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
H_3PO_4 (mmol/L)	30	50	100	150	171
SDS (mmol/L)	9	16	33	50	57

Tabela 5 - Ensaios do primeiro delineamento composto central.

Número de ensaios	Fatores (valores codificados)		Fatores (valores reais)	
	H_3PO_4 (mmol/L)	SDS (mmol/L)	H_3PO_4 (mmol/L)	SDS (mmol/L)
1	-1	-1	50	16
2	+1	-1	150	16
3	-1	+1	50	50
4	+1	+1	150	50
5	0	0	100	33
6	0	0	100	33
7	0	0	100	33
8	-1,41	0	30	33
9	+1,41	0	171	33
10	0	-1,41	100	9
11	0	+1,41	100	57

Diante dos resultados obtidos no primeiro delineamento, verificou-se a necessidade de realizar um novo CCD 2² contendo, igualmente, três pontos centrais e quatro axiais. Nas Tabelas 6 e 7, estão apresentados os dados do segundo delineamento empregado, onde a faixa de variação entre o limite inferior e o superior

de cada fator foi calculada de modo que incluísse nesse novo planejamento as concentrações cujo resultado no primeiro DOE tenha apresentado tendência ao maior número de picos: $[H_3PO_4] = 50$ mmol/L (pH 2,5) e $[SDS] = 16$ mmol/L; bem como o limite inferior da concentração de SDS não fosse menor que sua CMC.

Tabela 6 - Níveis codificados e reais dos fatores do segundo delineamento composto central.

Fatores	Níveis codificados e reais dos fatores				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
H_3PO_4 (mmol/L)	22	30	50	70	78
SDS (mmol/L)	9	11	16	21	23

Tabela 7 - Ensaios do segundo delineamento composto central.

Número de ensaios	Fatores (valores codificados)		Fatores (valores reais)	
	H_3PO_4 (mmol/L)	SDS (mmol/L)	H_3PO_4 (mmol/L)	SDS (mmol/L)
1	-1	-1	30	11
2	+1	-1	70	11
3	-1	+1	30	21
4	+1	+1	70	21
5	0	0	50	16
6	0	0	50	16
7	0	0	50	16
8	-1,41	0	22	16
9	+1,41	0	78	16
10	0	-1,41	50	9
11	0	+1,41	50	23

7.2.3. Análise quimiométrica

Os arquivos de dados gerados pelo DAD foram exportados usando o software ChemStation no formato CSV e convertidos para o Excel[®] 2010 (Microsoft Office, WA, EUA). Em seguida, foram importados para o MATLAB[®]. O tratamento dos dados (alinhamento dos picos) foi realizado pela implementação do algoritmo COW⁶⁸. Posteriormente, os eletroferogramas foram normalizados, autoescalados e submetidos à PCA, utilizando-se a interface gráfica PLS_Toolbox.

7.2.4. Tratamento de resíduos

Os resíduos tóxicos gerados nesta etapa do trabalho experimental foram descartados e/ou tratados conforme as normas para a gestão de resíduos químicos

do Instituto de Química da Unicamp (disponível em: <http://www.iqm.unicamp.br/sites/default/files/normasResiduos.pdf>).

7.3. Resultados e discussão

7.3.1. Primeiro delineamento composto central

Para avaliação do número de picos, considerou-se como unidade de pico o sinal no eletroferograma com resolução experimental⁵³:

$$R_s \geq 1,5$$

Sendo que, a resolução (R_s) entre dois picos adjacentes em um eletroferograma foi calculada usando a equação:

$$R_s = 2 \frac{(t_m^{k+1} - t_m^k)}{(W^{k+1} + W^k)}$$

onde t_m^{k+1} , t_m^k , W^{k+1} , W^k , são os tempos de migração e a largura do pico na base para cada dois picos consecutivos, respectivamente⁵³. Além disso, somente foi considerado como unidade de pico o sinal medido cuja relação sinal-ruído (SNR) tenha sido superior a 3.

Na Tabela 8, verificam-se os resultados da análise estatística para a variável dependente número de picos.

Tabela 8 - Efeitos e interações calculados para o número de picos no primeiro delineamento composto central.

	Efeito	Erro puro	p*
Média	17,62746	0,333320	0,000357
H ₃ PO ₄ (Linear)	-2,43983	0,408900	0,026957
H ₃ PO ₄ (Quadrático)	-1,71039	0,487930	0,072627
SDS (Linear)	-4,21317	0,408602	0,009275
SDS (Quadrático)	-1,26625	0,486959	0,121517
H ₃ PO ₄ x SDS	5,00000	0,577350	0,013072

Nota:

Os valores destacados em negrito são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%.

* Probabilidade de significância ($p \leq 0,05$).

O efeito estimado indica o quanto cada fator influencia na resposta observada. Assim, os efeitos significativos ao nível de 95% de confiança para o

número de picos no primeiro CCD foram: H_3PO_4 (Linear), SDS (Linear) e a interação $\text{H}_3\text{PO}_4 \times \text{SDS}$. O efeito da concentração de SDS (Linear) foi negativo, indicando que quanto menor a concentração de SDS, maior o número de picos.

A partir das variáveis significativas, foi realizada a ANOVA e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para o número de picos do primeiro delineamento composto central.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	77,5097	5	15,50195	1,058622	5,05 ^a
Resíduos	73,2176	5	14,64351		
Falta de Ajuste	72,5509	3	24,18363	72,5509	19,16 ^b
Erro Puro	0,6667	2	0,333333		
Total	150,7273	10			

Nota:

^a (5;5;95); ^b (3;2;95)¹²¹.

O valor obtido para o coeficiente de determinação (R^2) no primeiro CCD foi de 0,51424, indicando que apenas 51,43% da variação na resposta pode ser explicada pelo modelo. Esse valor não é considerado satisfatório para obtenção de modelo válido e útil para predição. De acordo com Barros Neto e colaboradores, quanto mais próximo de 1 o valor de R^2 melhor o ajuste do modelo¹²⁰. Além disso, para que uma regressão seja não apenas significativa, mas também útil para fins preditivos, a relação $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ deve ser superior a três. A partir dos dados da Tabela 9, verifica-se que a relação para a regressão apresentou o valor de 0,2096, ficando muito abaixo da relação esperada. Adicionalmente, o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste do modelo (72,55) foi superior ao F_{tabelado} (19,16), fornecendo uma alta relação, o que igualmente não é ideal para a validação do modelo, pois para que um modelo seja considerado bem ajustado essa relação deve ser inferior a 0,10¹²¹.

Apesar dos resultados obtidos não permitirem a geração de um modelo matemático preditivo, o gráfico de contorno (Gráfico 15) foi gerado e aponta a tendência para a obtenção do maior número de picos (> 26) na região de menor concentração tanto para H_3PO_4 quanto para SDS, região representada pela intensidade mais forte da cor vermelha.

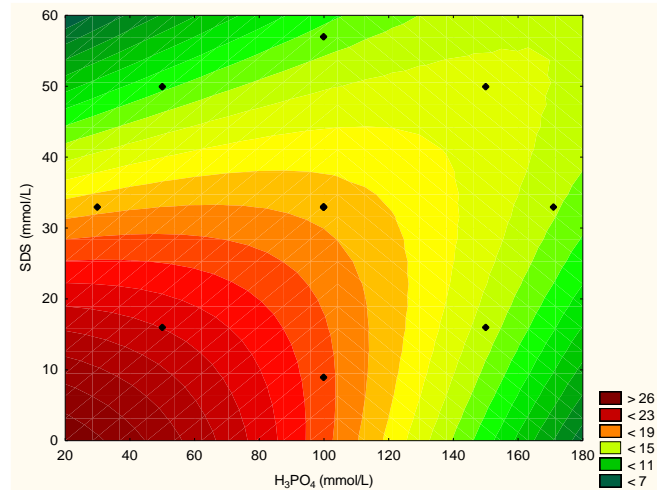


Gráfico 15 - Gráfico de contorno obtido para avaliação do número de picos em função das concentrações de ácido fosfórico [H_3PO_4] e dodecil sulfato de sódio [SDS] na solução de separação em RF-MEKC. Primeiro delineamento composto central.

7.3.2. Segundo delineamento composto central

Os valores correspondentes aos efeitos estimados para o número de picos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Efeitos e interações calculados para o número de picos no segundo delineamento composto central.

	Efeito	Erro puro	p^*
Média	16,35276	0,333288	0,000415
H_3PO_4 (Linear)	-0,55556	0,410305	0,308436
H_3PO_4 (Quadrática)	-3,14403	0,492535	0,023673
SDS (Linear)	-0,60606	0,410305	0,277685
SDS (Quadrática)	-2,63383	0,492535	0,033237
$H_3PO_4 \times$ SDS	1,50000	0,577350	0,121690

Nota:

Os valores destacados em negrito são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%.

* Probabilidade de significância ($p \leq 0,05$).

De acordo com análise dos efeitos das variáveis independentes (Tabela 10), somente H_3PO_4 (Quadrático) e SDS (Quadrático) apresentaram significância estatística sobre o número de picos ao nível de 95% de confiança.

A partir desses efeitos significativos, efetuou-se a ANOVA e os resultados para esse novo planejamento estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para o número de picos do segundo delineamento composto central.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	21,69197	5	4,3383395	1,736769	5,05 ^a
Resíduos	12,48984	5	2,497969		
Falta de Ajuste	11,82318	3	3,94106	11,82318	19,16 ^b
Erro Puro	0,66667	2	0,33333		
Total	34,18182	10			

Nota:

^a (5;5;95); ^b (3;2;95) ¹²¹.

O valor obtido para o R^2 no segundo CCD foi de 0,63461, indicando que somente 63,46% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. A partir dos dados da Tabela 11, verifica-se que como os valores da relação para regressão ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$) foi de 0,3439 e para falta de ajuste foi de 0,6171, novamente não se alcançou um modelo válido e útil para fins preditivos. Entretanto, no gráfico de contorno gerado (Gráfico 16), evidenciou-se a tendência para a obtenção do maior número de picos (> 16) quando as concentrações das soluções de H_3PO_4 e SDS foram 50 mmol/L e 16 mmol/L, respectivamente, representada pela região de intensidade mais forte da cor vermelha.

Analisando os gráficos de contorno do primeiro e do segundo CCD, verificou-se que a tendência observada em relação à concentração ótima da solução de separação indicou um número de picos superior a 26 no primeiro CCD, porém foi apenas maior que 16 no segundo. Por isso, calculou-se o ruído instrumental médio nos dois delineamentos, observando-se que o valor de ruído no segundo CCD ($0,15 \pm 0,05$ mAU) foi três vezes maior que no primeiro ($0,05 \pm 0,03$ mAU), o que provavelmente comprometeu a visualização dos picos menos intensos no segundo delineamento.

A otimização dos parâmetros concentração de H_3PO_4 e SDS mostrou que para se obter o maior número de picos na análise de *fingerprint* de *C. icaco* por CE-DAD, deve-se adotar a solução de separação composta por 50 mmol/L de H_3PO_4 (pH 2,5) e 16 mmol/L de SDS.

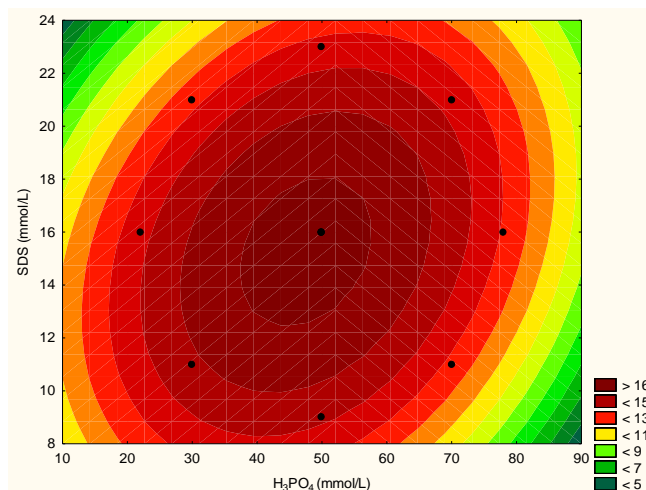


Gráfico 16 - Gráfico de contorno obtido para avaliação do número de picos em função das concentrações de ácido fosfórico [H_3PO_4] e dodecil sulfato de sódio [SDS] na solução de separação em RF-MEKC. Segundo delineamento composto central.

7.3.3. Validação do método *fingerprinting* por CE-DAD

De acordo com Cass e Cassiano¹²², não existe uma orientação final sobre validação de um método analítico e, portanto, trata-se de um processo personalizado pela seleção dos testes necessários, com base no método usado e suas exigências. Por isso, reconhecendo a necessidade de dados analíticos confiáveis para uma correta interpretação dos resultados, aliada ao fato de que CE produz resultados menos reprodutíveis que LC ou GC⁵², figuras de mérito para o método *fingerprinting* por CE-DAD foram avaliadas.

Entre os picos observados no *fingerprint*, dois foram definidos como típicos nas tinturas de *C. icaco* e encontram-se assinalados com nº 1 e 2 na Figura 17. O pico 1 (MT= 10,33 min) foi selecionado como pico de referência para estimativa do tempo de migração relativo (RMT) e da área de pico relativa (RPA). Os desvios padrão relativo (RSD) de RMT e de RPA do pico 2 (RT = 10,87 min) foram calculados para a estimativa de repetibilidade e estabilidade da amostra.

A repetibilidade foi avaliada pela análise de três extratos de uma mesma amostra (réplicas de extração), dentro de um único dia, com duplicata de injeção. Como parâmetro para avaliação da conformidade do sistema, o teste de estabilidade da amostra foi avaliado por meio da análise do mesmo extrato em diferentes tempos (0, 4, 8, 14 e 20h).

Esses testes foram realizados com extratos da amostra BE1, obtidos conforme descrito na Seção 5.2.1. Os resultados estão demonstrados na Tabela 12, na qual se observa que os valores de RSD foram inferiores a 15%, nível de aceitação estipulado pela ANVISA para métodos bioanalíticos^{97,98}. Em adição, destaca-se que nesse processo, os valores obtidos para repetibilidade representam tanto a precisão do método como também a reprodutibilidade da extração.

Tabela 12 - Figuras de mérito avaliadas para o método de *fingerprint* de extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco* (extrato BE1) por CE-DAD.

Pico nº	Estabilidade*		Repetibilidade	
	RSD (%)		RSD (%)	
	RRT	RPA	RRT	RPA
2	0,36	8,19	0,42	6,62

Nota:

* Tempo: 0, 4, 8, 14 e 20h.

Assim, pode-se dizer que o método CE-DAD para a análise de *fingerprint* de *C. icaco* foi otimizado e, com base nas figuras de mérito avaliadas, verificou-se que os parâmetros de desempenho foram satisfatórios ao escopo do estudo.

7.3.4. *Fingerprints* CE-DAD de *C. icaco*

As análises de *fingerprint* das tinturas de *C. icaco* foram realizadas a partir dos 144 extratos hidroalcoólicos e cada extrato foi injetado em duplicata. As condições experimentais utilizadas foram as descritas na Seção 7.2.2. com solução de separação composta por 50 mmol/L de H₃PO₄ (pH 2,5) e 16 mmol/L de SDS.

Visualmente, foi possível identificar a presença de aproximadamente 14 picos nos *fingerprints* por CE-DAD, sem diferenças perceptíveis além de variação nas intensidades dos mesmos. Os eletroferogramas *fingerprint* representativos de cada morfotipo estão apresentados na Figura 17.

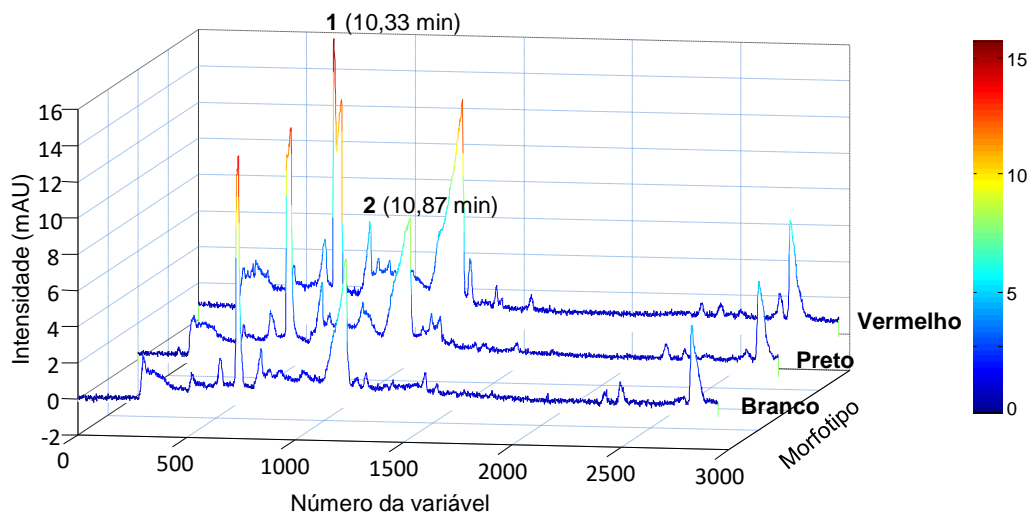


Figura 17 - *Fingerprints* CE-DAD representativos de extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco* para cada morfotipo (cor do fruto) (extratos BJ1, VI1 e BR1). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 58,7 cm x 50 μm (i.d.), 50,0 cm de comprimento efetivo. Eletrólito de corrida: 50 mmol/L H_3PO_4 (pH 2,5) e 16 mmol/L SDS; temperatura: 20 $^\circ\text{C}$; voltagem: -20 kV; injeção hidrodinâmica: 25 mbar por 6s; tempo de análise: 30 min; detecção: 254 nm. Os picos característicos utilizados nos cálculos de desvios padrão relativo no procedimento de validação do método estão identificados com os algarismos arábicos 1 e 2, seguidos por seus respectivos tempos de migração.

7.3.5. Análise exploratória dos dados

A análise de *fingerprint* das 48 amostras de *C. icaco* resultou em um total de 288 eletroferogramas (6 replicatas). Para efeito de cálculo foi considerado o intervalo útil de tempo de migração, compreendido entre 7 e 20 min e os dados foram exportados a partir do ChemStation, dando origem a matrizes com 206 colunas (comprimentos de onda) e número de linhas (tempos de migração) variável entre 2952 e 2999, o que possivelmente esteve relacionado à reprodutibilidade desses dados¹²³. Em seguida, foi calculada a matriz transposta. A maior intensidade dos picos foi verificada no comprimento de onda de 254 nm, que foi selecionado para a realização do estudo e, assim, a matriz transposta foi reduzida a um vetor de 1 linha e 2950 colunas (tempos de retenção).

Os eletroferogramas de cada amostra e suas replicatas foram usados para compor as matrizes de dados originais de dimensões 6 x 2950 para cada amostra, no geral, embora algumas dessas replicatas com desvios de tempos de

migração extremos tenham sido excluídas do conjunto de dados. Para cada matriz, os picos foram alinhados usando-se o algoritmo COW⁶⁸, que tem sido considerado a ferramenta mais efetiva para o alinhamento de eletroferogramas^{52,124}. Depois, o eletroferograma médio de cada amostra foi calculado, resultando em vetores de dimensão 1×2950 , que foram reunidos gerando a matriz $\mathbf{C}_{48 \times 2950}$. Antes de efetuar a PCA, o algoritmo COW também foi aplicado à matriz $\mathbf{C}_{48 \times 2950}$ para selecionar os parâmetros de deformação otimizada (eletroferograma de referência = 3; *segment length* = 100; *slack size* = 19), empregados no alinhamento dos *fingerprints*. Depois, os eletroferogramas foram alinhados, normalizados para área unitária e autoescalados utilizando PLS_Toolbox. Foi verificado que o autoescalamento foi a melhor alternativa para o pré-tratamento das variáveis, pois conferiu a mesma importância a todas⁵².

Na PCA aplicada à matriz $\mathbf{C}_{48 \times 2950}$ (Gráfico 17), foram selecionados três PCs que descreveram 68,23% da variância total dos dados (PC1 50,05%, PC2 11,45% e PC3 6,73%), sendo foi possível visualizar uma tendência à separação dos grupos em PC2. Cada ponto no Gráfico 17 representa uma amostra individual e foi codificado de acordo com o seu morfotipo (triângulos invertidos para morfotipo vermelho, quadrados para morfotipo preto e estrelas para morfotipo branco). Em função dos resultados, verificou-se que as amostras de *C. icaco* também foram agrupadas com base nos morfotipos: Grupo I (morfotipo vermelho) e Grupo II (morfotipo branco e morfotipo preto).

Em decorrência da menor reprodutibilidade observada para dados obtidos por CE, alguns autores chegam a considerar que dados eletroforéticos são menos adequados para análises quimiométricas que dados de cromatografia líquida, por exemplo⁶⁷. No entanto, no presente estudo, apesar da qualidade dos dados analíticos produzidos por UHPLC-DAD e por CE-DAD terem sido diferentes, foi possível evidenciar a mesma interpretação para os resultados provenientes de ambos os métodos, apenas garantindo o pré-tratamento mais adequado. Dessa maneira, do ponto de vista prático, CE-DAD pode ser considerada uma opção de menor custo para a análise de *fingerprint* de *C. icaco*, tendo como principal vantagem a análise de extrato bruto com injeção da amostra sem diluição.

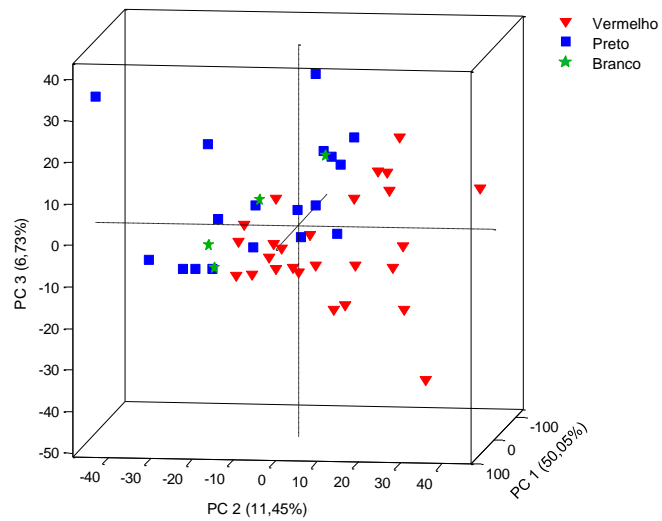


Gráfico 17 - Gráfico de scores da análise de componentes principais (PCA) – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição e agrupamento dos dados de CEDAD das 48 amostras de *C. icaco*, que descreve 68,23% do total de variância dos dados. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas).

8. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE *Chrysobalanus icaco* L. POR MEIO DE MARCADORES DE POLIMORFISMO DO DNA AMPLIFICADO AO ACASO

8.1. Reagentes

Tris ultrapuro 99,9% Invitrogen; EDTA (sal dissódico) PA ACS 99% Dinâmica; Cloreto de sódio PA ACS 99% Vetec; Brometo de cetiltrimetil amônio alta pureza Anresco; Polivinilpirrolidona Sigma-Aldrich; Polivinilpolipirrolidona Fluka; Clorofórmio PA Vetec; Álcool isoamílico PA Vetec; Azul de bromofenol PA Proquimios; Agarose Ludwig Biotec; Brometo de etídeo 98% USB; Ácido bórico PA 99,8% Panreac; EDTA ultrapuro Anresco; Taq DNA polimerase (recombinante) (5 U/ μ L) Invitrogen; Cloreto de magnésio a 50 mM Invitrogen; 10X PCR Rxn (MgCl₂) Invitrogen; DNA Lambda Invitrogen; DNA Ladder 1Kb Plus Invitrogen; dNTP Mix 1mM Invitrogen; BSA Sigma-Aldrich.

8.2. Material e métodos

Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração da Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Dra. Maria do Socorro Padilha de Oliveira (Anexo 4).

8.2.1. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle¹²⁵, com algumas modificações propostas por Costa e Oliveira¹²⁶ e utilizando-se um ou dois folíolos (aproximadamente 1 g) por planta.

Na etapa de quantificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) a 0,5X contendo brometo de etídeo. O gel foi submetido à eletroforese horizontal por 15 min a 100 V e 90 mA. As concentrações das 25 amostras de *C. icaco* foram estimadas mediante comparação com bandas produzidas pelo DNA de fago λ (marcador de concentração) em concentrações de 50, 100 e 200 ng/ μ L. As imagens foram visualizadas em fotodocumentador L-Pix (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil). A leitura e interpretação

dos géis de agarose foram realizadas com o software LabImage 1D L-340 (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil). As amostras concentradas foram armazenadas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e parte de cada amostra de DNA foi diluída em TE (Tris/EDTA) para a concentração de $10\text{ ng}/\mu\text{L}$, sendo mantidas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase).

8.2.2. PCR

A seleção de marcadores de polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) foi realizada com base em 100 *primers* (iniciadores) de quinze kits da Operon Technologies (CA, EUA), que foram aplicados em cinco das 25 amostras de *C. icaco*,

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de $200\text{ }\mu\text{L}$ contendo volume final de $15\text{ }\mu\text{L}$ para cada amostra, constituído por: $3,5\text{ }\mu\text{L}$ de DNA na concentração de $10\text{ ng}/\mu\text{L}$; $3,47\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura; $1,65\text{ }\mu\text{L}$ de tampão 10X PCR Buffer; $0,6\text{ }\mu\text{L}$ de cloreto de magnésio a 50 mM ; $1,04\text{ }\mu\text{L}$ de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos, dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 1 mM ; $1,04\text{ }\mu\text{L}$ de BSA (albumina do soro bovino) a $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$; $3,5\text{ }\mu\text{L}$ de *primer* na concentração de $0,1\text{ nmol}/\mu\text{L}$ e $0,2\text{ }\mu\text{L}$ de enzima Taq DNA polimerase ($5\text{ un.}/\mu\text{L}$); utilizando termociclador TX96 (Amplitherm) programado para 40 ciclos. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a $1,5\%$, preparados com tampão TBE 1X corado com brometo de etídeo, e submetidos à eletroforese horizontal durante $1,5\text{ h}$ a 100 V . Os géis foram visualizados em fotodocumentador e as imagens capturadas por meio digital, selecionando-se as que apresentaram nitidez de bandas.

Os *primers* selecionados foram aplicados nas 25 amostras de DNA, utilizando o mesmo volume e concentração dos reagentes, assim como a programação e as demais etapas das reações de PCR realizadas anteriormente. Os padrões dos produtos gerados pelos *primers* foram codificados com caracteres binários, 0 e 1, correspondendo à ausência e presença de bandas no perfil eletroforético de cada genótipo (amostra) para cada iniciador, respectivamente. A partir desses dados, organizados em planilha Excel[®] 2010 (Microsoft Office, WA, EUA), estimaram-se as similaridades genéticas entre os 25 genótipos com base no coeficiente de Jaccard¹²⁷. As análises genético-estatísticas foram realizados com o

auxílio dos softwares NTSYSpc versão 2.1 (Exeter Software, NY, EUA)¹²⁸ e Genes¹²⁹.

As estimativas de divergência genética entre as 25 amostras de *C. icaco* foram analisadas por dois métodos de agrupamento diferentes: o método de otimização de Tocher e o método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages*). A matriz de similaridades genéticas para os três morfotipos cor do fruto foi obtida por meio da média das similaridades das amostras representantes de cada morfotipo. A confiabilidade dos agrupamentos formados pelos dendrogramas foi avaliada por meio da correlação cofenética (Teste Z de Mantel) obtida pelo software NTSYSpc, onde quanto maior o valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC), menor será a distorção provocada ao agrupar os genótipos. O critério adotado para definição de grupos baseou-se na estimativa da similaridade genética média¹²⁷:

$$sg_m = \Sigma sg_{ij} / N$$

onde sg_{ij} corresponde à similaridade genética entre cada par de indivíduos e N é o número de pares obtidos.

8.2.3. Tratamento de resíduos

Os resíduos tóxicos gerados nesta etapa do trabalho experimental foram descartados e/ou tratados conforme as normas para a gestão de resíduos químicos nos laboratórios da Embrapa Amazônia Oriental¹⁰⁴.

8.3. Resultados e discussão

Os marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam indivíduos e são herdadas geneticamente, por isso não sofrem influência das variações ambientais¹³⁰.

Entre as diversas técnicas de marcadores moleculares, o RAPD destaca-se pela rapidez e eficácia para investigar a variabilidade genética em espécies vegetais^{131,132}, o que possibilita a obtenção de *fingerprint* genético útil para solucionar problemas de reconhecimento de padrão. Assim, agrupamentos podem ser atribuídos e correlacionados a características específicas como origem geográfica, composição nutricional, entre outras¹³³. Essa técnica consiste de iniciadores arbitrários e não

depende do sequenciamento prévio do genoma da espécie na qual vai ser aplicado, porém apresenta como desvantagem a baixa repetibilidade^{134,135}.

Dos 100 *primers* RAPD avaliados, 18 foram selecionados para a genotipagem dos 25 espécimes de *C. icaco*, pois apresentaram padrão de bandas de qualidade. Esses *primers* produziram 85 produtos de amplificação, com média de 4,7 bandas por *primer* e 99,2% de polimorfismo (Tabela 13). O maior número de bandas polimórficas foi registrado no *primer* OPA-10 (Figura 18), com 10 bandas enquanto o menor ocorreu nos *primers* OPAB-03, OPAR-11, OPB-17 e OPU-08, com duas bandas.

Tabela 13 - Identificação dos 18 *primers* RAPD selecionados e aplicados às 25 amostras de *C. icaco* com o número de bandas geradas e taxa de polimorfismo.

<i>Primer</i>	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')	Nº de bandas			Polimorfismo (%)
		Monomórficas	Polimórficas	Total	
OPA-03	5' AGTCAGCCAC 3'	0	4	4	100
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'	0	10	10	100
OPA-11	5' CAATCGCCGT 3'	0	6	6	100
OPAB-03	5' TGGCGCACAC 3'	0	2	2	100
OPAR-11	5' GGGAAAGACGG 3'	0	2	2	100
OPAZ-03	5' GGCTGTGTGG 3'	0	5	5	100
OPAZ-04	5' CCAGCCTCAG 3'	0	5	5	100
OPB-01	5'GTTTCGCTCC 3'	0	3	3	100
OPB-17	5' AGGGAACGAG 3'	0	2	2	100
OPBA-03	5'GTGCGAGAAC 3'	0	6	6	100
OPBA-05	5' TGCGTTCCAC 3'	0	5	5	100
OPBA-07	5' GGGTCGCATC 3'	0	5	5	100
OPBA-08	5' CCACAGCCGA 3'	1	6	7	85,7
OPL-07	5' AGGCGGGAAC 3'	0	7	9	100
OPM-04	5' GGCGGTTGTC 3'	0	3	3	100
OPU-02	5' CTGAGGTCTC 3'	0	5	5	100
OPU-03	5' CTATGCCGAC 3'	0	4	4	100
OPU-08	5' GGCGAAGGTT 3'	0	2	2	100
	Total	1	84	85	
	Média	0,1	4,6	4,7	99,2

As 25 amostras de *C. icaco* receberam códigos numéricos no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, que se encontram relacionados à codificação inicial das mesmas no Gráfico 18 e Tabela 14.

A análise de agrupamento obtida pelo método UPGMA permitiu a divisão dos 25 genótipos de *C. icaco* em cinco grupos (Gráfico 18), onde o grupo V foi

formado pela maioria dos genótipos, englobando genótipos dos três morfotipos de cor do fruto (branco, preto e vermelho). O alto coeficiente de correlação cofenética ($r = 0,8914$) representa o bom ajuste entre a representação gráfica das similaridades genéticas no dendrograma e a sua matriz original¹³⁶.

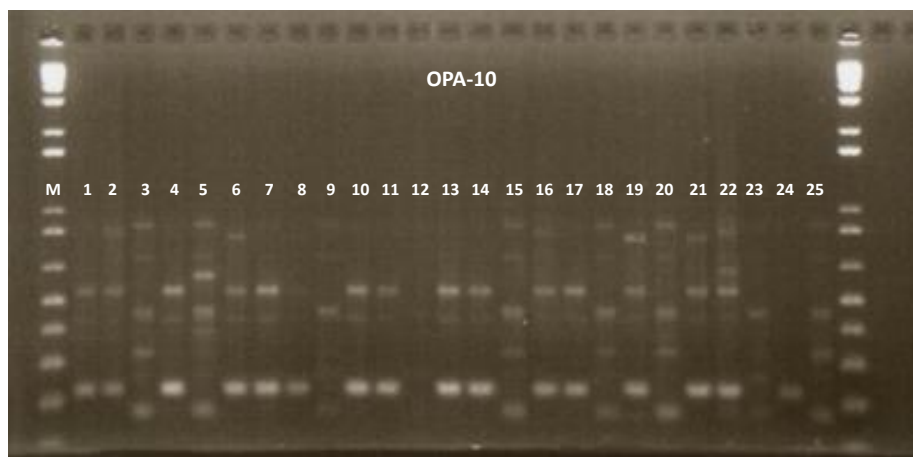
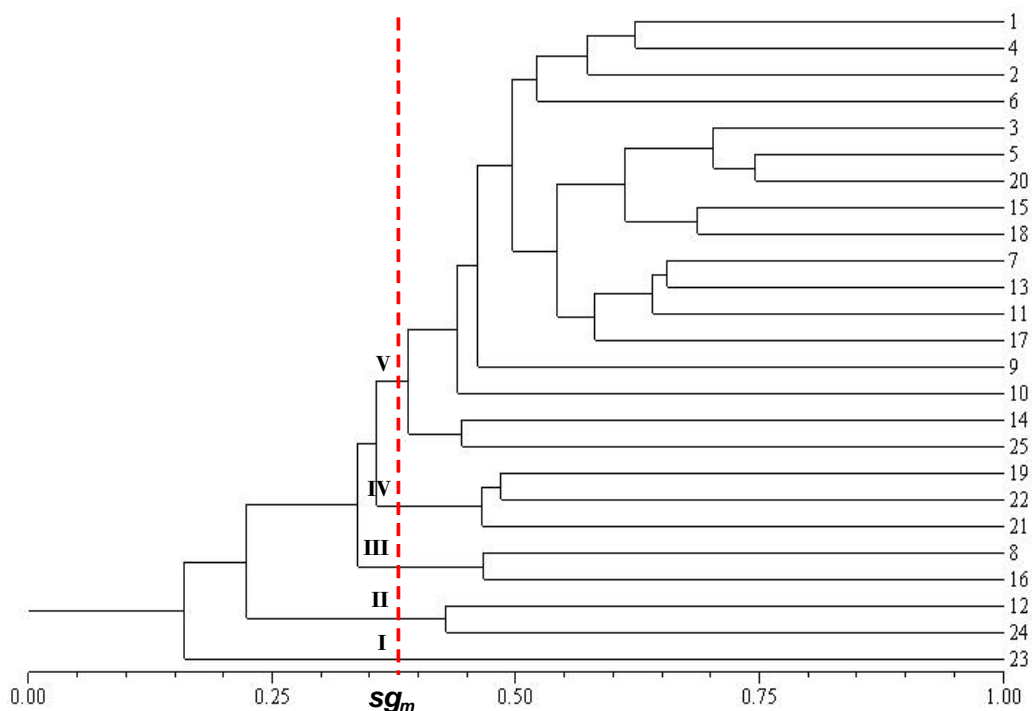


Figura 18 - Perfil do gel de agarose demonstrando o polimorfismo gerado pelo primer OPA-10 nos 25 espécimes de *C. icaco*. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produtos de amplificação do DNA (1,5 h a 100 V) corados com brometo de etídeo. M = padrão DNA Ladder 100 bp.

Na Tabela 14, pode-se visualizar que o método de agrupamento de Tocher possibilitou a separação das 25 amostras estudadas em oito grupos distintos, sendo que por esse método o Grupo II reuniu o maior número de genótipos.

Verificou-se, pelo polimorfismo identificado nos *primers* selecionados, que as amostras de *C. icaco* coletadas em diferentes locais no estado do Pará e genotipadas por marcadores RAPD são geneticamente distintas, formando agrupamentos variáveis, em número e constituição, por diferentes métodos. Observou-se que esses marcadores se mostraram eficientes na quantificação da variabilidade e da divergência genética entre as amostras.



Código amostra	PI	OU	HO	AT	MA	BR	AJ	PP	RP	BJ	PJ	VI	IT	CP	RG	PG	CM	CR	TA	CT	VG	NT	SA	BE	SC
COD GEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

Gráfico 18 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard, com base nas 84 bandas polimórficas amplificadas nas 25 amostras de *C. icaco*. Similaridade genética média (sg_m) = 0,38. Coeficiente de correlação cofenética (r) = 0,8914; $p < 0,00001$. COD GEN – relação de códigos adotados no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental.

Das características morfológicas consideradas, verificou-se tendência de separação de grupos com base na cor do fruto, onde o alto valor do CCC ($r = 0,9971$) garante a confiabilidade do agrupamento formado no dendrograma apresentado no Gráfico 19. Observou-se que, pelo critério de corte adotado (sg_m), houve a formação de dois grupos. O Grupo I constituído pelo morfotipo vermelho e o Grupo II, que reuniu os morfotipos branco e preto de *C. icaco*. Conseqüentemente, essa constatação legitimou o resultado do *fingerprint* metabólico.

Esta correlação inédita para a taxonômica de *C. icaco*, sugere a existência de base genética (cor do fruto maduro) para os perfis cromatográficos e eletroforéticos observados, ou seja, as diferenças na composição química dos extratos dependem mais do caráter genético e menos dos fatores ambientais.

Tabela 14 - Grupos formados pelo método de otimização de Tocher a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard, com base nas 84 bandas polimórficas amplificadas nas 25 amostras de *C. icaco*.

Grupos	Amostras																									
I	1	2	23																							
II	3	4	8	9	14	16	17	21	24																	
III	5	6	12																							
IV	7	10																								
V	11	13	15	18																						
VI	20	22																								
VII	25																									
VIII	19																									

Código amostra	PI	OU	HO	AT	MA	BR	AJ	PP	RP	BJ	PJ	VI	IT	CP	RG	PG	CM	CR	TA	CT	VG	NT	SA	BE	SC
COD GEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

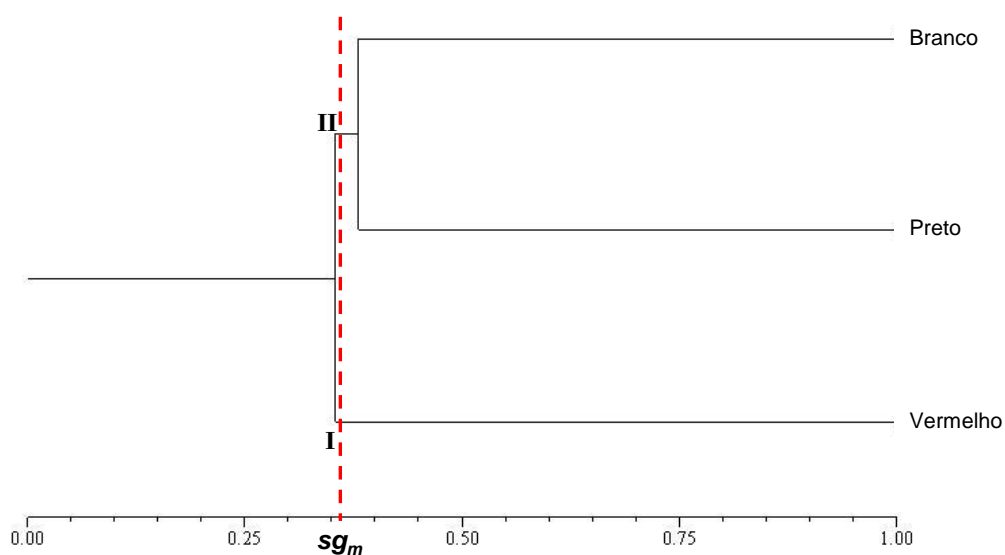


Gráfico 19 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA para os três morfotipos cor do fruto, a partir das médias das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard para as 25 amostras de *C. icaco*. Similaridade genética média (sg_m) = 0,36. Coeficiente de correlação cofenética (r) = 0,9971; $p < 0,00001$.

9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE *Chrysobalanus icaco* L. EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

9.1. Reagentes

Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 Gibco-BRL; Soro fetal bovino Gibco-BRL; Dimetilsulfóxido Synth; Penicilina:estreptomicina LGC Biotecnologia; Cloridrato de doxorubicina Eurofarma; Ácido tricloroacético Sigma; Sulforrodamina B (SRB) Sigma; Trizma[®] base Sigma.

9.2. Material e métodos

Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração da Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp, Dra. Mary Ann Foglio (Anexo 5).

9.2.1. Ensaio antiproliferativo

A atividade antiproliferativa dos extratos de *C. icaco* foi determinada pelo ensaio de inibição do crescimento celular corado com sulforrodamina B (SRB)¹³⁷, mediante avaliação de nove linhagens de células tumorais humanas (Tabela 15), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI, do inglês *National Cancer Institute*) dos Estados Unidos; e uma linhagem não tumoral humana HaCaT (queratinócitos), cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL) (meio completo).

Alíquotas dos 48 extratos de *C. icaco* foram evaporadas em banho-maria a 40 ± 2 °C, até secura. Em seguida, dissolveram-se de 5-10 mg do extrato seco em 50-100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Depois, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio completo e diluídos sucessivamente, com meio, para a preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. Com base em resultados anteriores¹³⁷, sabe-se que a concentração final de DMSO (0,25% v/v) não interfere na proliferação celular.

100 μL de suspensão celular de cada linhagem, ajustada em sua respectiva densidade de inoculação (DI) (Tabela 15), foram aplicados em placas de 96 compartimentos (T), que foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 e ambiente úmido. Foi também preparada a placa de controle celular no tempo zero (T_0), contendo as diferentes linhagens celulares utilizadas no experimento e nenhum tratamento. Essa placa indica a quantidade de células nas placas 24 horas após o plaqueamento, ou seja, o quanto as células cresceram antes de receberem qualquer tratamento. Esse dado é importante para os cálculos dos parâmetros que avaliam a atividade citocida/citostática dos extratos testados.

Tabela 15 - Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação (D.I.).

Linhagem	Órgão/Doença**	Origem embrionária	D.I. (10^4 cél/mL)
U251	SNC/glioma	Ectoderme	4,0
MCF 7	Mama/adenocarcinoma	Ectoderme	6,0
NCI-ADR/RES*	Ovário/adenocarcinoma	Ectoderme	5,0
786-0	Rim/adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
NCI-H460	Pulmão/carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
PC-3	Próstata/adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário/adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Cólon/adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K-562	Medula óssea/leucemia mieloide crônica	Mesênquima	6,0
HaCaT	Pele (queratinócito)/não tumoral	Ectoderme	4,0

Nota:

* Esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos (CellMiner);

** The Global Bioresource Center (ATCC).

Após 24 horas de incubação, as células da placa T foram expostas a quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) das amostras em teste (em triplicata), diluídas em DMSO/RPMI (100 μL /compartimento) e incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO_2 e ambiente úmido, por 48h.

Como controle positivo, usou-se o quimioterápico doxorrubicina (cloridrato de doxorrubicina) nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (em triplicata). Mais do que um padrão de comparação, o objetivo principal do uso desse controle foi o de verificar se todas as linhagens empregadas mantinham o perfil de resposta

ao quimioterápico. Isso, porque com as sucessivas passagens necessárias para a manutenção da cultura de células, existe a possibilidade de mutação da linhagem em cultivo, e essa mutação poderia ser detectada pela mudança de resposta frente à doxorrubicina. Além disso, a fim de se minimizar a ocorrência de mutações, as linhagens só são perpetuadas por no máximo 15 passagens, quando então são substituídas por novas células da mesma linhagem, que são mantidas congeladas.

No momento de aplicação das amostras nas placas T, as células inoculadas na placa T₀ foram fixadas com a adição 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e incubadas por 1 hora em geladeira a 4 °C, para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas. O TCA atua como um fixador, precipitando proteínas e permitindo que células viáveis se mantenham fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendam durante lavagem. Desta forma, a placa T₀ foi submetida a quatro lavagens consecutivas em água corrente para remoção de resíduos de TCA, meio e soro fetal bovino.

Após as 48 horas de incubação, as células da placa T foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA a 50% e incubadas por 1 hora em geladeira a 4 °C. Em seguida, as placas foram submetidas à lavagem em água corrente quatro vezes consecutivas para remoção de resíduos de TCA, meio, e metabólitos secundários.

Após secagem das placas à temperatura ambiente, foi adicionado 50 µL/compartimento do corante proteico SRB a 0,4% (m/v) dissolvido em ácido acético 1% e, a seguir, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 20 minutos. As placas foram, então, submetidas à lavagem com solução de ácido acético a 1% e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma[®] base (10 µM, pH 10,5).

A SRB é um corante proteico, que se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, maior a quantidade de células viáveis e, portanto, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste^{137,138}.

A porcentagem de crescimento celular foi determinada, então, mediante a leitura espectrofotométrica da densidade óptica a 540 nm, em leitor de microplacas (modelo VersaMax, Molecular Devices[®], CA, EUA). A média da absorbância obtida para cada amostra foi calculada, descontando-se o valor de seu respectivo branco e a porcentagem de crescimento de cada linhagem frente aos extratos foi calculada mediante as seguintes fórmulas:

Se $T > C$, o extrato estimulou o crescimento celular

Se $T \geq T_0$ e $< C$, o extrato foi citostático e a fórmula usada foi: $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

Se $T < T_0$, o extrato foi citocida e a fórmula usada foi: $100 \times [(T - T_0)/(T_0)]$

Sendo T a média da absorbância da célula tratada, C a absorbância do controle de célula e T_0 a média da absorbância da célula no tempo zero da adição dos extratos. Os dados de absorbância foram compilados na elaboração de gráficos que correlacionam a porcentagem de inibição ou morte celular com a concentração do extrato testada.

A atividade antiproliferativa dos extratos de *C. icaco* foi expressa por meio do parâmetro de concentração GI_{50} (*Growth Inhibition 50*), que indica a concentração capaz de inibir em 50% a proliferação celular e serve para comparar a potência e evidenciar a seletividade desses extratos. A GI_{50} foi calculada a partir dos dados experimentais para cada linhagem por meio de regressão não linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento¹³⁹. Para isso, utilizou-se o software OriginPro[®] 8.0 (OriginLab Corporation, MA, EUA).

9.2.2. Tratamento de resíduos

Os resíduos tóxicos gerados nesta etapa do trabalho experimental foram descartados e/ou tratados conforme orientado pela Comissão de Qualidade Total do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/Unicamp).

9.3. Resultados e discussão

9.3.1. Atividade antiproliferativa

Esta etapa foi realizada com o propósito de determinar o potencial antiproliferativo dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco*, por meio de

triagem *in vitro*, e investigar possível correlação entre a atividade biológica estimada e os quimiotipos de *C. icaco*.

Esse ensaio permitiu determinar a atividade antitumoral por meio da exposição de células tumorais humanas, em fase exponencial de crescimento, a diferentes concentrações de extratos de *C. icaco*. Foi verificado o perfil de ação e a seletividade dos extratos, isto é, se essa exposição induziu a uma interrupção na taxa de proliferação (atividade citostática) ou se provocou a morte celular (atividade citocida).

Na Tabela 16 encontram-se os resultados de atividade antiproliferativa dos extratos de *C. icaco* sobre as nove diferentes linhagens de células tumorais humanas e uma linhagem não tumoral.

Tabela 16 – Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco* sobre diferentes linhagens celulares, representada pela concentração necessária para inibir 50% (GI₅₀) do crescimento celular.

(continua)

Amostra	GI ₅₀ (µg/mL)									
	2*	m*	a*	7*	4*	p*	o*	h*	k*	q**
Dox [#]	<0,025	<0,025	0,29	<0,025	<0,025	0,10	0,11	0,72	0,05	<0,025
BJ1	29,4	29,1	29,8	32,6	69,4	55,3	30,3	>250	62,0	92,0
CP1	>250	55,2	>250	>250	207,2	>250	>250	52,6	23,4	140,8
CP2	>250	48,4	>250	240,8	100,1	161,1	>250	41,7	NC	115,0
SC1	30,4	26,2	57,6	>250	>250	>250	93,8	>250	67,4	211,8
BE1	32,7	63,5	156,9	>250	>250	>250	162,1	>250	68,0	>250
BE2	29,1	38,5	41,1	54,6	72,3	72,4	14,6	185,6	15,4	64,1
CM1	30,6	61,6	29,4	33,01	>250	>250	>250	>250	57,4	225,7
CM2	36,7	27,4	31,3	32,7	28,8	30,4	8,5	94,4	29,4	32,8
IT1	33,0	66,7	48,1	135,0	>250	>250	>250	>250	60,3	>250
IT2	>250	101,6	>250	243,3	17,3	152,1	>250	52,5	75,9	105,9
NT1	244,1	68,4	>250	248,2	182,3	181,6	>250	107,8	>250	134,6
NT2	40,2	28,9	102,4	105,9	28,6	28,9	40,6	138,5	78,9	57,6
OU1	28,3	35,7	32,5	224,1	>250	180,2	44,2	>250	45,8	101,5
OU2	31,1	32,0	26,9	209,4	>250	78,1	55,0	124,2	24,5	76,5
PG1	28,5	30,9	49,4	29,8	18,0	33,8	5,00	61,4	31,9	76,5
PG2	30,8	28,0	59,7	220,4	>250	121,0	86,6	>250	28,5	126,6
PJ1	27,0	30,4	62,0	161,0	>250	117,8	172,7	>250	74,0	176,5
PJ2	28,2	29,7	39,5	30,0	45,1	49,9	8,6	187,4	45,0	63,5
PP1	29,9	31,9	55,9	89,6	>250	217,7	188,2	>250	58,0	151,4
PP2	30,3	30,0	57,6	31,4	114,4	31,6	71,2	>250	64,1	120,4

Tabela 16 - Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. icaco* sobre diferentes linhagens celulares, representada pela concentração necessária para inibir 50% (GI₅₀) do crescimento celular.

(conclusão)

Amostra	GI ₅₀ (µg/mL)									
	2*	m*	a*	7*	4*	p*	o*	h*	k*	q**
VI1	29,4	29,5	60,2	54,3	28,5	29,4	28,5	22,7	35,2	31,3
VI2	28,7	38,5	29,6	196,8	>250	83,3	18,5	150,9	52,3	59,0
AJ1	61,7	30,8	69,9	95,0	>250	52,9	64,8	203,9	203,8	140,9
AJ2	29,9	29,7	28,9	29,6	190,4	241,5	14,9	212,9	43,0	76,6
AT1	29,5	32,7	30,5	33,1	121,8	112,4	36,4	>250	28,4	74,6
AT2	29,5	29,4	63,1	206,4	>250	226,3	54,3	>250	29,7	227,6
BR1	40,9	30,5	52,9	93,5	>250	>250	75,3	>250	88,6	189,8
BR2	26,8	26,9	59,5	206,1	>250	>250	61,3	>250	30,2	>250
CT1	32,7	31,1	71,0	107,6	132,7	>250	51,6	>250	64,5	107,5
CT2	28,8	51,2	29,3	36,1	5,1	64,3	4,1	98,5	5,4	76,8
CR1	34,9	29,7	64,7	87,2	>250	73,6	62,4	>250	>250	184,6
CR2	31,5	30,4	27,6	98,5	>250	>250	15,3	>250	24,8	159,4
HO1	37,9	30,3	68,5	90,0	243,5	65,0	92,2	>250	46,3	140,9
HO2	27,0	29,4	44,2	123,6	7,7	143,2	20,0	>250	51,7	108,0
MA1	28,2	27,8	41,0	42,0	14,2	30,4	45,1	>250	78,9	85,9
MA2	30,6	32,3	64,7	73,3	>250	30,6	73,7	>250	64,7	132,4
PI1	28,0	31,1	44,3	196,8	>250	30,3	69,8	56,6	62,3	50,9
PI2	32,8	31,6	47,2	67,0	215,8	157,5	38,8	>250	43,6	108,3
RG1	30,3	31,4	29,0	147,0	>250	145,6	46,4	>250	28,9	88,7
RG2	30,5	28,7	29,2	55,6	5,1	30,0	29,5	107,4	46,6	40,8
RP1	>250	167,4	>250	>250	231,6	>250	>250	50,3	9,9	148,1
RP2	29,6	30,5	57,4	29,4	>250	>250	19,6	>250	57,7	123,8
SA1	27,2	28,7	60,6	29,5	26,2	34,3	11,3	183,0	28,6	64,9
SA2	30,8	41,2	62,1	59,4	>250	>250	118,6	>250	63,5	234,8
TA1	29,1	33,3	81,5	213,9	>250	>250	31,5	240,1	6,5	144,3
TA2	30,8	31,4	57,7	193,7	28,6	30,2	36,4	243,2	68,0	63,7
VG1	31,4	29,1	74,2	72,7	25,9	93,2	20,1	>250	60,6	91,6
VG2	34,4	29,0	104,6	226,0	27,8	78,4	36,1	125,9	72,2	68,6

Nota:

*Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); h = HT-29 (cólon); k = K-562 (leucemia); NC = não calculado.

**Linhagem não tumoral humana: q = HaCaT (pele).

#Dox: doxorubicina (quimioterápico de referência).

Em negrito: GI₅₀ inferior a 10 µg/mL.

Para melhor visualização das atividades dos extratos, utilizou-se a curva concentração-resposta, onde é possível verificar se o extrato possui efeito citostático (pontos da curva acima do ponto zero), efeito citocida (pontos da curva abaixo do ponto zero) ou inibição total do crescimento (TGI), que é a concentração de extrato que promove 100% de inibição celular e corresponde ao valor no eixo da abscissa onde a curva corta o eixo das ordenadas. O Gráfico 20 ilustra a representação dos pontos relacionados à GI_{50} e TGI. Além disso, demonstra a atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorubicina, que apresentou valores baixos de GI_{50} , sendo as linhagens de cólon (HT-29) e ovário (NCI-ADR/RES) as mais resistentes.

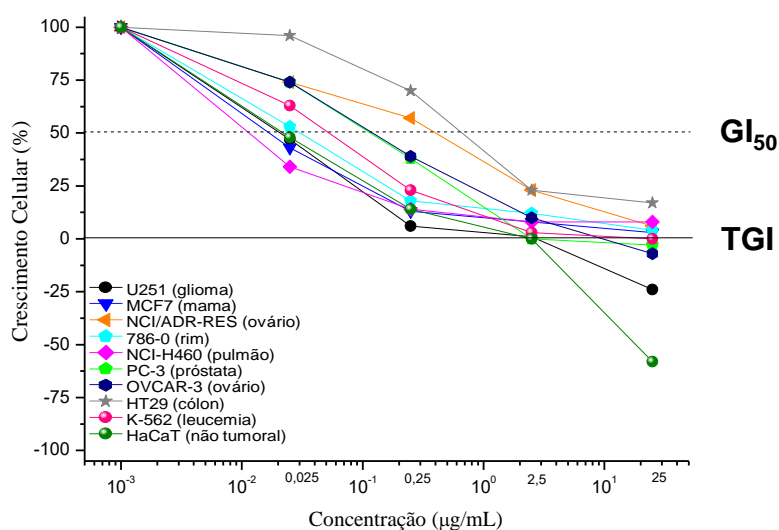


Gráfico 20 - Atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorubicina em cultura de células tumorais humanas, relacionando a porcentagem de crescimento celular à concentração da droga, após 48 horas de incubação.

De maneira geral, verificou-se que os valores de GI_{50} para os extratos hidroalcoólicos de *C. icaco* foram elevados demonstrando atividade citostática de baixa potência contra as linhagens avaliadas. Os resultados de GI_{50} inferiores a 10 µg/mL estão representados em negrito na Tabela 16. Alguns desses extratos também exibiram atividade citocida sobre algumas das linhagens, porém somente na concentração mais alta testada (Gráfico 21).

Foi possível observar que os extratos CM2 e PJ2 apresentaram atividade antiproliferativa seletiva na concentração de 25 µg/mL, com efeito citostático sobre a linhagem de ovário (OVCAR-3) (Gráficos 21 e 22). O extrato CM2 (Gráfico 21)

também foi seletivo, com efeito citostático sobre a linhagem de cólon (HT-29), na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, verificou-se que o extrato RG2 (25 $\mu\text{g/mL}$) apresentou atividade citostática sobre células tumorais de pulmão (NCI-H460) (Gráfico 23) e o extrato RP1 (2,5 $\mu\text{g/mL}$), sobre a linhagem de leucemia mieloide crônica (K-562) (Gráfico 24).

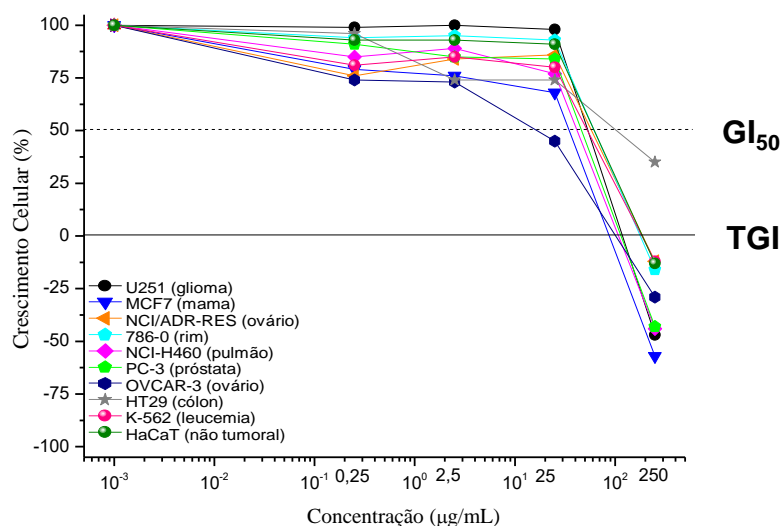


Gráfico 21 - Atividade antiproliferativa do extrato CM2 de *C. icaco* em cultura de células tumorais humanas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48 h.

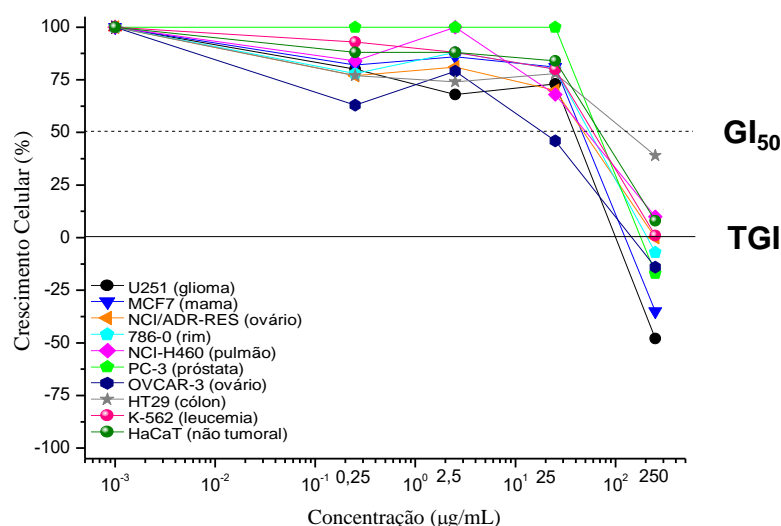


Gráfico 22 - Atividade antiproliferativa do extrato PJ2 de *C. icaco* em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48 h.

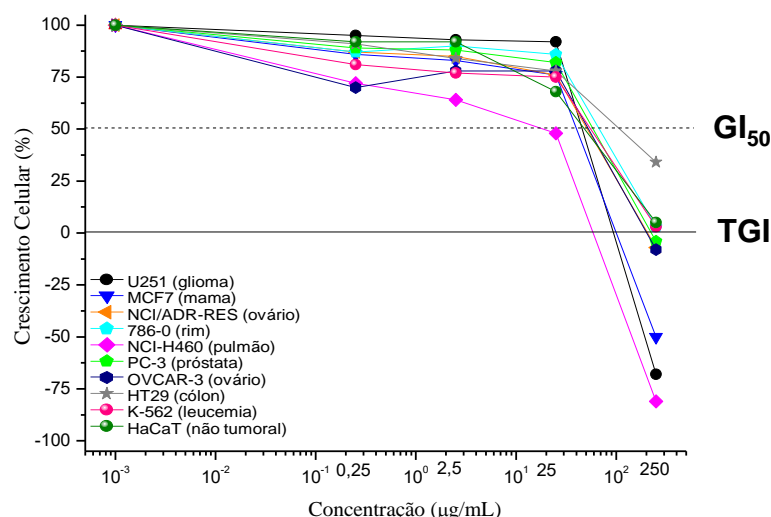


Gráfico 23 - Atividade antiproliferativa do extrato RG2 de *C. icaco* em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.

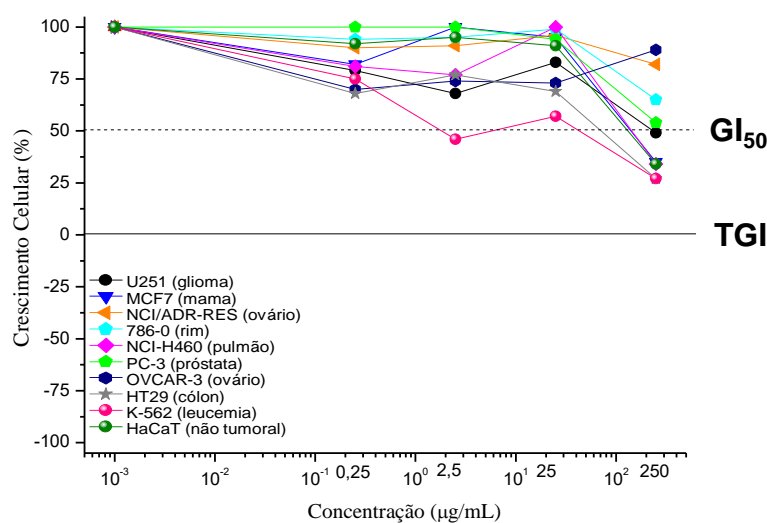


Gráfico 24 - Atividade antiproliferativa do extrato RP1 de *C. icaco* em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.

Esses resultados são animadores para a continuidade da pesquisa sobre a relevância farmacológica desses extratos, visto que podem fornecer vantagem terapêutica no tratamento de pacientes com câncer de ovário, cólon, pulmão ou leucemia.

Ainda, foi observado que os extratos CM2 e VI1 induziram a linhagem de queratinócito (HaCaT) à morte celular, indicando um perfil citotóxico desses extratos sobre células não tumorais (Gráficos 21 e 25). Os gráficos do potencial antiproliferativo dos demais extratos de *C. icaco*, que relacionam a porcentagem de crescimento celular com a concentração do extrato, encontram-se no Apêndice D.

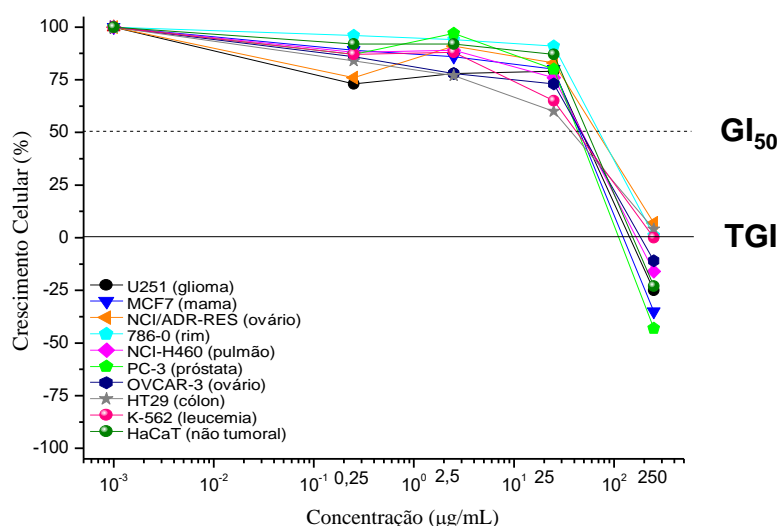


Gráfico 25 - Atividade antiproliferativa do extrato VI1 de *C. icaco* em cultura de células tumorais humanas, expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48 h.

Resultados sobre a atividade antiproliferativa de derivado de *C. icaco* já haviam sido relatados, como o efeito do ácido pomólico isolado das folhas contra a linhagem de leucemia mieloide crônica (K-562), além da ação antiproliferativa contra uma linhagem de leucemia resistente a múltiplas drogas e do potencial para superar a resistência à apoptose²⁹, conforme citado na Seção 3.4.1. Adicionalmente, a citotoxicidade desse triterpeno contra a linhagem de carcinoma cervical e melanoma também já foi descrita⁷⁶.

9.3.2. Análise exploratória dos dados

A planilha Excel[®] contendo os dados de GI₅₀ referentes à atividade antiproliferativa dos extratos de *C. icaco* foi convertida para arquivo do MATLAB[®]. Em seguida, no PLS_Toolbox, os dados dessa matriz de dimensão 48 x 10 foram

autoescalados e foi aplicada a PCA para identificar a existência de possível correlação entre a atividade biológica estimada e os quimiotipos de *C. icaco*.

Na PCA, não foi possível reconhecer nenhum padrão de distribuição em relação aos morfotipos cor do fruto, conforme ilustra o Gráfico 26 (PC1 42,65%, PC2 29,50%, PC3 8,33%), nem mesmo quando um número maior de PCs foi considerado significativo. Em adição, foram avaliadas as variáveis centradas na média e, ainda, outras características da planta (hábito, procedência, solo, entre outras), contudo nenhuma tendência foi observada para esse conjunto de dados.

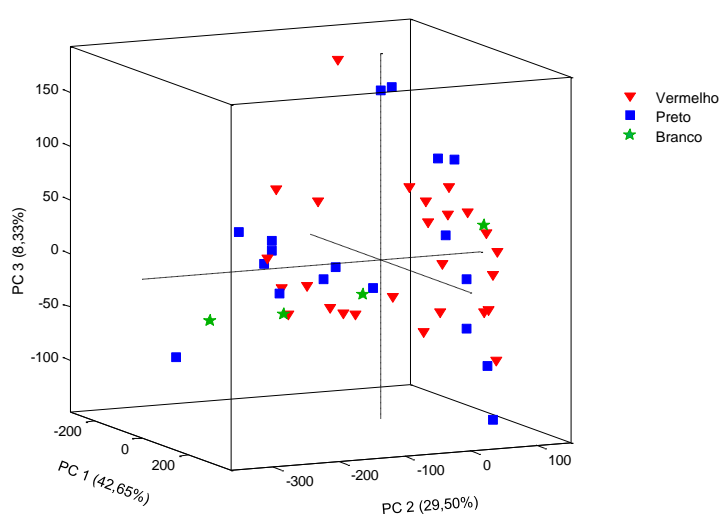


Gráfico 26 - Gráfico de *scores* da análise de componentes principais (PCA) – visualização 3D (PC1xPC2xPC3) da distribuição dos dados de GI₅₀ (µg/mL) referentes à atividade antiproliferativa das 48 amostras de *C. icaco*. Os símbolos indicam morfotipo vermelho (triângulos invertidos), morfotipo preto (quadrados) e morfotipo branco (estrelas).

Em função dos resultados obtidos, deduziu-se que os extratos dos dois quimiotipos de *C. icaco* apresentam potencial antiproliferativo semelhante contra as linhagens de células tumorais humanas avaliadas.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

10.1. Conclusões

O *fingerprint* UHPLC-DAD associado à quimiometria foi utilizado neste trabalho como uma estratégia ao estudo quimiotaxonômico de *C. icaco*. Trata-se de um método analítico qualitativo simples e eficaz, que pode ser usado no controle de qualidade de extratos de *C. icaco*.

Taxonomicamente, não é possível classificar indivíduos de *C. icaco* em qualquer categoria significativa. Contudo, os métodos quimiométricos PCA e PLS-DA demonstraram a existência de dois quimiotipos. Assim, espécimes de três morfotipos distinguidos pela cor do fruto maduro foram reunidos em duas classes: Classe 1 (morfotipo vermelho) e Classe 2 (morfotipos branco e preto). Ademais, verificou-se que o efeito sazonal e/ou ambiental pareceu não afetar essa classificação.

A possível relação entre nutrientes e metabólitos secundários em *C. icaco* foi visualmente identificada, mediante avaliação dos gráficos referentes ao *fingerprint* do extrato, análise de fertilidade do solo e de tecido vegetal.

O *fingerprint* genético de *C. icaco* legitimou o resultado do *fingerprint* químico, sugerindo que as diferenças entre os dois quimiotipos dependem mais do caráter genético que de fatores ambientais.

O *fingerprint* CE-DAD pode ser uma alternativa de baixo custo ao controle de qualidade de extratos de *C. icaco*.

De maneira geral, os extratos de *C. icaco* apresentaram efeito citostático, contudo dois dos extratos foram também seletivos contra células tumorais de ovário (OVCAR-3). Além disso, os dois quimiotipos de *C. icaco* apresentam potencial antiproliferativo semelhante contra as linhagens de células tumorais humanas testadas.

Quimiotaxonomicamente, a constatação mais importante deste trabalho foi a de que os três morfotipos de *C. icaco* não são todos fitoequivalentes uns aos outros, o que é especialmente interessante para estudos farmacológicos, visto que fitoequivalência é fundamental para a equivalência em eficácia e segurança.

10.2. Perspectivas futuras

Estudos futuros, considerando o aumento da área de amostragem ou sobre o cultivo experimental dos diferentes morfotipos em condições ambientais controladas, provavelmente contribuirão para uma base satisfatória em relação ao status taxonômico de *C. icaco*.

Oportunamente, a realização de análises multiconjuntos nos dados de *fingerprint* UHPLC-DAD, análise de fertilidade do solo e de tecido foliar poderá subsidiar pesquisas sobre sistema de cultivo para *C. icaco*.

A identificação inequívoca dos constituintes químicos do extrato de *C. icaco*, certamente facilitará a compreensão de seu espectro de ação terapêutica.

Também são desejáveis estudos farmacológicos que avaliem extratos dos três morfotipos, em especial sobre o efeito hipoglicemiante, como forma de retorno melhorado da informação etnodirigida.

11. GLOSSÁRIO

Os verbetes apresentados neste glossário foram extraídos das fontes bibliográficas citadas ao final de cada definição, porém os que aparecerem sem qualquer citação são de responsabilidade da autora.

Amostra rasurada	É a amostra ou droga vegetal que passou por rasura, isto é, por cortes em pedaços menores.
Derivado vegetal	Produto da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contenha as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, podendo ocorrer na forma de extrato, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros (ANVISA. <i>Resolução RDC nº 26, 2014</i>).
Droga vegetal	Planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (ANVISA. <i>Resolução RDC nº 26, 2014</i>).
<i>Fingerprint</i>	Padrão específico de reconhecimento de uma espécie vegetal, obtido mediante análise de múltiplas amostras da mesma espécie (Donno, D. <i>et al. J. Food Sci. Technol.</i> , 2016).
Fitocomplexo	Conjunto de todas as substâncias, originadas do metabolismo primário ou secundário, responsáveis, em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de seus derivados (ANVISA. <i>Resolução RDC nº 26, 2014</i>).
Fitoequivalência	Este conceito foi desenvolvido a fim de assegurar a consistência de produtos à base de plantas e estabelece que um perfil químico de um derivado vegetal deve apresentar alta similaridade ao de um padrão específico (Liang, Y.-Z. <i>et al. Comb. Chem. High Throughput Screen.</i> , 2010).

Fitomedicamento	Designação dada apenas aos medicamentos fitoterápicos que apresentarem estudos clínicos de eficácia e segurança (com posologia, indicação, efeitos colaterais e reações adversas bem definidos), realizados com o medicamento em questão (ANVISA. <i>Consulta Pública nº 8</i> , 2002).
Fitoproduto	São plantas medicinais e seus derivados (Zuanazzi, J. A., Mayorga, P. <i>Quím. Nova</i> , 2010).
Fitoterápico	Produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (ANVISA. <i>Resolução RDC nº 26</i> , 2014).
Quimiotipos	Mesmas espécies, subespécies ou variedades de um organismo que contêm diferentes metabólitos secundários ou os mesmos metabólitos secundários em diferentes concentrações (Polatoglu, K. <i>The Nat. Prod. J.</i> , 2013).
Perfil cromatográfico	Padrão cromatográfico de constituintes característicos, obtido em condições definidas, que possibilite a identificação da espécie vegetal em estudo e a diferenciação de outras espécies (ANVISA. <i>Resolução RDC nº 26</i> , 2014).
Planta medicinal	A planta medicinal usada logo após a colheita/coleta sem passar por qualquer processo de secagem (ANVISA. <i>Resolução RDC nº 26</i> , 2014).
Tintura	É a preparação alcoólica ou hidroalcoólica resultante da extração de drogas vegetais ou animais ou da diluição dos respectivos extratos. É classificada em simples e composta, conforme preparada com uma ou mais matérias-primas. A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual, 10 mL de tintura simples correspondem a 1 g de droga seca (ANVISA. <i>Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira</i> , 1ª ed., 2011).

Uso tradicional

Aquele alicerçado no longo histórico de utilização no ser humano demonstrado em documentação técnico-científica, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário (ANVISA. *Resolução RDC nº 26, 2014*).

12. REFERÊNCIAS

1. Fernandes, J. da R., Zhang, P. Cost-Effective and Cost-Saving Interventions for Prevention and Control of Diabetes. *Diabetes Voice* **62**, 16–20 (2016).
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação*. Rio de Janeiro, IBGE (2014).
3. World Health Organization (WHO). *Global Report on Diabetes*. Geneva, WHO (2016).
4. Cascaes, M. M., Guilhon, G. M. S. P., Andrade, E. H. de A., Zoghbi, M. das G. B., Santos, L. da S. Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 23881–23904 (2015).
5. Pereira, A. C., Pereira, A. B. D., Moreira, C. C. L., Botion, L. M., Lemos, V. S., Braga, F. C., Cortes, S. F. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. *J. Ethnopharmacol.* **161**, 30–35 (2015).
6. Wyrepkowski, C. C., Costa, D. L. M. G. da, Senhorin, A. P., Vilegas, W., Gradis, R. A. de, Resende, F. A., Varanda, E. A., Santos, L. C. dos. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. *Molecules* **19**, 16039–16057 (2014).
7. Montefusco-Pereira, C. V., Carvalho, M. J. de, Boleti, A. P. de A., Teixeira, L. S., Matos, H. R., Lima, E. S. Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**, 1367–1378 (2013).
8. Barbalho, S. M., Souza, M. da S. S. de, Bueno, P. C. dos S., Guiguer, E. L., Farinazzi-Machado, F. M. V., Araújo, A. C., Meneguim, C. O., Silveira, E. P., Oliveira, N. de S., Silva, B. C. da, Barbosa, S. da S., Mendes, C. G., Gonçalves, P. R. *Annona montana* fruit and leaves improve the glycemic and lipid profiles of Wistar rats. *J. Med. Food* **15**, 917–22 (2012).
9. Vasconcelos, C. F. B., Maranhão, H. M. L., Batista, T. M., Carneiro, E. M., Ferreira, F., Costa, J., Soares, L. A. L., Sá, M. D. C., Souza, T. P., Wanderley, A. G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* **137**, 1533–1541 (2011).
10. Bopp, A., Bona, K. S. de, Bellé, L. P., Moresco, R. N., Moretto, M. B. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **23**, 501–507 (2009).

11. Novaes, A. P., Rossi, C., Poffo, C., Pretti-Júnior, E., Oliveira, A. E., Schlemper, V., Niero, R., Cechinel-Filho, V., Bürger, C. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie* 427–430 (2001).
12. Prance, G. T. *Flora Neotropica Monografia No. 9*. New York, Flora Neotropica (1972).
13. Flora do Brasil. *Chrysobalanus icaco* L. *Flora do Brasil 2020*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16759>> (acessado em 04.04.16).
14. Coelho-Ferreira, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J. Ethnopharmacol.* **126**, 159–175 (2009).
15. Agra, M. de F., Freitas, P. F. de, Barbosa-Filho, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Braz. J. Pharmacog.* **17**, 114–140 (2007).
16. Barbosa, W. L. R., Peres, A., Gallori, S., Vincieri, F. F. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. *Braz. J. Pharmacog.* **16**, 333–337 (2006).
17. White, P. A. S., Cercato, L. M., Batista, V. S., Camargo, E. A., Lucca-Júnior, W. de, Oliveira, A. S., Silva, F. T., Goes, T. C., Oliveira, E. R. A., Moraes, V. R. S., Nogueira, P. C. L., Silva, A. M. de O. e, Quintans-Júnior, L. J., Lima, B. S., Araújo, A. A. S., Santos, M. R. V. Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice. *J. Ethnopharmacol.* **179**, 92–100 (2016).
18. White, P. A. S., Araújo, J. M. D., Cercato, L. M., Souza, L. A., Barbosa, A. P. O., Quintans-Júnior, L. J., Machado, U. F., Camargo, E. A., Brito, L. C., Santos, M. R. V. *Chrysobalanus icaco* L. leaves normalizes insulin sensitivity and blood glucose and inhibits weight gain in high-fat diet-induced obese mice. *J. Med. Food* **19**, 155–60 (2016).
19. Ferreira-Machado, S. C., Gagliardi, R. F., Nunes, A. P. M., Rodrigues, M. P., Dantas, F. J. S., Mattos, J. C. P. de, Peregrino, C. A. F., Moura, E. G., Caldeira-de-Araújo, A. Antidiabetic and genotoxic effects on Wistar rats treated with aqueous extract from *Chrysobalanus icaco* L. *J. Med. Plants Res.* **8**, 52–57 (2014).
20. Barbosa, A. P. de O., Silveira, G. de O., Menezes, I. A. C. de, Rezende-Neto, J. M., Bitencurt, J. L. C., Estavan, C. dos S., Lima, A. do C. B. de, Thomazzi, S. M., Guimarães, A. G., Quintans-Júnior, L. J., Santos, M. R. V. dos. Antidiabetic effect of the *Chrysobalanus icaco* L. aqueous extract in rats. *J. Med. Food* **16**, 538–43 (2013).

21. Oliveira, T. B. de, Carvalho-Júnior, C. H. R. de, Mota, F. V. B., Araújo, L. C. C. de, Maia, M. B. S., Randau, K. P., Nascimento, S. C. do, Silva, T. G. da. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the aqueous extract of the bark of *Chrysobalanus icaco* Linnaeus. *Br J Pharm Res* **4**, 1253–1268 (2014).
22. Ribeiro, T. G., Chávez-Fumagalli, M. A., Valadares, D. G., Franca, J. R., Lage, P. S., Duarte, M. C., Andrade, P. H. R., Martins, V. T., Costa, L. E., Arruda, A. L. A., Faraco, A. A. G., Coelho, E. A. F., Castilho, R. O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp. Parasitol.* **143**, 60–68 (2014).
23. Port's, P. da S., Chisté, R. C., Godoy, H. T., Prado, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Res. Int.* **53**, 875–881 (2013).
24. Presta, G. A., Santos-Filho, S. D., Paoli, S. de, Giani, T. S., Maiworm, A. I., Brandão-Neto, J., Medeiros, A. da C., Fonseca, A. de S. da, Bernardo-Filho, M. Effects of *Chrysobalanus icaco* on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the shape of the red blood cells. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **50**, 145–152 (2007).
25. Ferreira-Machado, S. C., Rodrigues, M. P., Nunes, A. P. M., Dantas, F. J. S., Mattos, J. C. P. de, Silva, C. R., Moura, E. G., Bezerra, R. J. A. C., Caldeira-de-Araújo, A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. *Toxicol. Lett.* **151**, 481–487 (2004).
26. Castilho, R. O., Kaplan, M. A. C. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Chrysobalanus icaco*. *Chem. Nat. Compd.* **47**, 436–437 (2011).
27. Gustafson, K. R., Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Cardellina-II, J. H., McMahon, J. B., Gulakowski, R. J., Gragg, G. M., Cox, P. A., Brinen, L. S., Clardy, J., Boyd, M. R. HIV inhibitory natural products. 3. Diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. *Tetrahedron* **47**, 4547–4554 (1991).
28. Paulo, S. A. de, Balassiano, I. T., Silva, N. H., Castilho, R. O., Kaplan, M. A. C., Cabral, M. C., Carvalho, M. da G. da C. *Chrysobalanus icaco* L. extract for antiangiogenic potential observation. *Int. J. Mol. Med.* **5**, 667–669 (2000).
29. Fernandes, J., Castilho, R. O., Costa, M. R. da, Wagner-Souza, K., Kaplan, M. A. C., Gattass, C. R. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett.* **190**, 165–169 (2003).
30. Vargas, C. E., Mendes, M. F., Azevedo, D. A., Pessoa, F. L. P., Uller, A. C. Extraction of the essential oil of abajeru (*Chrysobalanus icaco*) using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* **54**, 171–177 (2010).
31. Coradin, L., Giannasi, D. E., Prance, G. T. Chemosystematic studies in the *Chrysobalanaceae*. I. Flavonoids in *Parinari*. *Brittonia* **37**, 169–178 (1985).
32. Sampaio, B. L., Edrada-Ebel, R., Costa, F. B. da. Effect of the environment on

- the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Nat. Publ. Gr.* 1–11 (2016).
33. Liang, Y.-Z., Xie, P., Chan, K. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B* **812**, 53–70 (2004).
 34. Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova* **30**, 374–381 (2007).
 35. Aquino, D. de, Silva, R. B. L. da, Gomes, V. F., Araújo, E. C. de. Nível de conhecimento sobre riscos e benefícios do uso de plantas medicinais e fitoterápicos de uma comunidade do Recife - PE. *Rev. Enf.* **1**, 107–110 (2007).
 36. Antonioli, A. R., Santos, M. R. V., Carvalho, A. A., Meneses, I. A. C., Bitencurt, J. L. C. Avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais com atividade anti-hipertensiva e antidiabética utilizadas no Povoado Colônia Treze em Lagarto/SE e implantação de uma Farmácia Viva. (2003). Disponível em: <<http://fapitec.se.gov.br/?q=documento/avalia%C3%A7%C3%A3o-do-potencia-l-terap%C3%AAutico-de-plantas-medicinais-com-atividade-anti-hipertensiva-e>> (acessado em 04 .04.16).
 37. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília, Ministério da Saúde (2009).
 38. Toledo, A. C. O., Hirata, L. L., Buffon, M. da C. M., Miguel, M. D., Miguel, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Rev. Lecta* **21**, 7–13 (2003).
 39. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RDC nº 26, 13 de maio de 2014*. Brasília, ANVISA, (2014).
 40. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). *Informação ao Consumidor. Requeijão e especialidade láctea à base de requeijão*. Disponível em: <<http://www.sitedoconsumidor.gov.br/consumidor/produtos/requeijao.asp>> (acessado em: 22.03.17).
 41. Alonso, J. *Fitomedicina: curso para profissionais da área da saúde*. São Paulo, Pharmabooks (2008).
 42. Junio, H. A., Sy-Cordero, A. A., Etefagh, K. A. , Burns, J. T., Micko, K. T., Graf, T. N., Richter, S. J., Cannon, R. E., Oberlies, N. H., Cech, N. B. Synergy Directed Fractionation of Botanical Medicines: A Case Study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J Nat Prod.* **74**, 1621–1629 (2011).
 43. Satheeshkumar, N., Paul, D., Lingesh, A. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS): Approaches to Adulterant Detection in Herbal Products. In: Tsay, H.-S., Shyur, L.-F., Agrawal, D. C., Wu, Y.-C., Wang, S.-Y. *Medicinal Plants: Recent Advances in Research and Development*. Singapore, Springer

- Nature (2016).
44. Donno, D., Boggia, R., Zunin, P., Cerutti, A. K., Guido, M., Mellano, M. G., Prgomet, Z., Beccaro, G. L. Phytochemical fingerprint and chemometrics for natural food preparation pattern recognition: an innovative technique in food supplement quality control. *J. Food Sci. Technol.* **53**, 1071–1083 (2016).
 45. Liang, Y.-Z., Xie, P.-S., Chan, K. Chromatographic Fingerprinting and Metabolomics for Quality Control of TCM. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **13**, 943–953 (2010).
 46. Funari, C. S., Castro-Gamboa, I., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. da S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Quim. Nova* **36**, 1605–1609 (2013).
 47. Demirezer, L. Ö., Büyükkaya, A., Uçaktürk, E., Kuruüzüm-Uz, A., Güvenalp, Z., Palaska, E. Adulteration Determining of Pharmaceutical Forms of *Ginkgo biloba* Extracts from Different International Manufacturers. *Rec. Nat. Prod.* **8**, 394–400 (2014).
 48. Mok, D. K. W., Chau, F-T. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. *Chemometr. Intell. Lab. Sys.* **82**, 210–217 (2006).
 49. Tistaert, C., Dejaegher, B., Heyden, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Anal. Chim. Acta* **690**, 148–161 (2011).
 50. Chawla, G., Ranjan, C. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry J.* **1**–16 (2016).
 51. Maldaner, L., Jardim, I. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quím. Nova* **32**, 214–222 (2009).
 52. García-Pérez, I., Vallejo, M., García, A., Legido-Quigley, C., Barbas, C. Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1204**, 130–139 (2008).
 53. Felhofer, J. L., Garcia, C. D. Optimization of micellar electrokinetic chromatography separation conditions by chemometric methods. In: Hanrahan, G., Gomez, F. A. *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*. Hoboken, John Wiley & Sons (2010).
 54. Dubber, M.- J., Kanfer, I. Application of reverse-flow micellar electrokinetic chromatography for the simultaneous determination of flavonols and terpene trilactones in *Ginkgo biloba* dosage forms. *J. Chromatogr. A* **1122**, 266–274 (2006).
 55. Tonin, F. G., Jager, A. V., Micke, G. A., Farah, J. P. S., Tavares, M. F. M. Optimization of the separation of flavonoids using solvent-modified micellar

- electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **26**, 3387–3396 (2005).
56. Vaz, F. A. S., Oliveira, C. L. M. de, Oliveira, M. A. L. de. Fundamentos de eletroforese capilar: uma abordagem por animações. *Quim. Nova* **38**, 732–737 (2015).
 57. Prasain, J. K., Jones, K., Kirk, M., Wilson, L., Smith-Johnson, M., Weaver, C., Barnes, S. Profiling and Quantification of Isoflavonoids in Kudzu Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4213–4218 (2003).
 58. Faccin, H., Viana, C., Nascimento, P. C. do, Bohrer, D., Carvalho, L. M. de. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1427**, 111–124 (2016).
 59. Ferreira, M. M. C. *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*. Campinas, Universidade Estadual de Campinas (2015).
 60. Março, P. H., Valderrama, P., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., Tauler, R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações. *Quim. Nova* **37**, 1525–1532 (2014).
 61. Xiong, H., Yu, L. X., Qu, H. A weighting approach for chromatographic fingerprinting to ensure the quality consistency of botanical drug products. *Anal. Methods* **6**, 476–481 (2014).
 62. Yongyu, Z., Shujun, S., Jianye, D., Wenyu, W., Huijuan, C., Jianbing, W., Xiaojun, G. Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. In: Shoyama, Y. *Quality control of herbal medicines and related areas*. Rijeka, InTech (2011).
 63. Martins, L. R. R., Pereira-Filho, E. R., Cass, Q. B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: A proposition of classification using chemometric models. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 469–481 (2011).
 64. Farias, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões, M. C. O., Schenkel, E. P., Gosman, G., Mello, J. C. P. de, Mentz, L. A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre, UFRGS (2007).
 65. Nikam, P. H., Kareparamban, J., Jadhav, A., Kadam, V. Future trends in standardization of herbal drugs. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2**, 38–44 (2012).
 66. Brereton, R. G., Lloyd, G. R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemom.* **28**, 213–225 (2014).
 67. Dumarey, M., Dejaegher, B., Durand, A., Heyden, Y. V. Exploratory data analysis and classification of capillary electrophoretic data. In: Hanrahan,

- G., Gomez, F. A. *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*. Hoboken, John Wiley & Sons (2010).
68. Skov, T., Berg, F. van den, Tomasi, G., Bros, R. Automated alignment of chromatographic data. *J. Chemom.* **20**, 484–497 (2006).
69. Santana, L. M. de, Rêgo, F. A., Silva, A. F. Características de frutos e morfológicas de plantas de guajuru (*Chrysobalanus icaco* L.) desenvolvidas no litoral paraibano. *Rev. Ceres* **47**, 181–187 (2000).
70. Bastos, M. de N. do. Importância das formações vegetais da restinga e do manguezal para as comunidades pesqueiras. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, ser. Antropol.* **11**, 41–56 (1995).
71. Fenner, R., Betti, A. H., Mentz, L. A., Rates, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **42**, 369–394(2006).
72. Jardim, M. A. G., Silva, J. C. da, Costa-Neto, S. V. Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodão, Município de Maracanã, Estado do Pará, Brasil – Resultados preliminares. *Rev. Bras. Farm.* **86**, 117–118 (2005).
73. Silva, I. M., Peixoto, A. L. O abajuru (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **19**, 325–332 (2009).
74. Presta, G. A., Fonseca, A. S., Bernardo-filho, M. A *Chrysobalanus icaco* extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids. *Rev. Bras. Farmacogn.* **17**, 331–335 (2007).
75. Silva, J. P. B., Peres, A. R. M. N., Paixão, T. P., Silva, A. S. B., Baetas, A. C., Barbosa, W. L. R., Monteiro, M. C., Andrade, M. A. Antifungal activity of hydroalcoholic extract of *Chrysobalanus icaco* against oral clinical isolates of *Candida* Species. *Pharmacognosy Res.* **9**, 96–100 (2017).
76. Fernandes, J., Weinlich, R., Castilho, R. O., Kaplan, M. A. C., Amarante-Mendes, G. P., Gattass, C. R. Pomolic acid triggers mitochondria-dependent apoptotic cell death in leukemia cell line. *Cancer Letters* **219**, 49–55 (2005).
77. Presta, G. A., Pereira, N. A. Atividade do Abagerú (*Chrysobalanus icaco* Lin, Chrysobalanaceae) em modelos experimentais para o estudo de plantas hipoglicemiantes. *Rev. Bras. Farm.* **68**, 91–101 (1987).
78. Souza, V. H., Barbosa, A. P. O., Cardoso, G. C., Marreto, R. N., Barreto-Filho, J. A. S., Antonioli, A. R., Santos, M. R. V. Avaliação do Potencial Antidiabético de Cinco Plantas Medicinais em Ratos. *Lat. Am. J. Pharm.* **28**, 609–612 (2009).
79. Aguiar, T. M. de. Caracterização química e física de folhas, frutos e sementes

- do bajuru (*Chrysobanalus icaco* L.) e avaliação do chá dessas folhas em camundongos (swiss) normais e diabéticos. 85 f. Dissertação - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica (2010).
80. Aguiar, T. M. de, Sabaa-Srur, A. U. de O., Samico, G. F. Potencial nutritivo e características físicas e químicas do abajeru. *Pesq. Agropec. Trop.* **41**, 102–109 (2011).
 81. Souza, T. R. de, Soares, L. de S., Marinho, B. G., Kaplan, M. A. C., Carvalho, M. G. de, Suzart, L. R. Metabolitos especiais e avaliação da atividade antinociceptiva da fração butanólica de folhas de *C. icaco* (Chrysobalanaceae). In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 38 (2015).
 82. Araújo-Filho, H. G., Dias, J. D. S., Quintans-Júnior, L. J., Santos, M. R. V., White, P. A. S., Barreto, R. S. S., Barreto, A. S., Estevam, C. S., Araujo, S. S., Almeida, J. R. G. S., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., Quintans, J. S. S. Phytochemical screening and analgesic profile of the lyophilized aqueous extract obtained from *Chrysobalanus icaco* leaves in experimental protocols. *Pharm. Biol.* **54**, 3055–3062 (2016).
 83. Araújo, A. A. de S., Barbosa, A. P. de O., Menezes, I. A. C. de, Bonjardim, L. R., Quintans-Júnior, L. J., Serafini, M. R., Santos, M. R. V. dos. *Preparação farmacêutica contendo Chrysobalanus icaco para o tratamento de diabetes*. BR1020120187345. 27 jul 2012.
 84. Valente, P. P., Amorim, J. M., Castilho, R. O., Leite, R. C., Ribeiro, M. F. B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* **113**, 417–423 (2014).
 85. Vargas-Simón, G., Soto-Hernández, R. M., Rodríguez-González, M. T., Escalante-Estrada, J. A. Análisis fitoquímico preliminar del fruto de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.): flavonoles y flavonas. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* **VI**, 195–198 (2000).
 86. Simón, G. V., Hernández, R. M. S., González, M. T. R. Análisi preliminar de antocianinas em fruto de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.). *Rev. Fitotec. Mex.* **25**, 261–264 (2002).
 87. Brito, E. S. de, Araújo, M. C. P. de, Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., Novotny, J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9389–9394 (2007).
 88. Nayak, B. S., Marshall, R. J., Milne, D., Kanhai, J., Kantikar, S. M., Raju, S. S. Hypoglycaemic Activity of *Chrysobalanus icaco* (Fat-pork) Fruit Extract in Diabetes Induced Rats. *Asian J. Pharm. Biol. Res.* **1**, 512–517 (2011).
 89. Venancio, V. P., Marques, M. C., Almeida, M. R., Mariutti, L. R. B., Souza, V. C. de O., Barbosa-Júnior, F. *Chrysobalanus icaco* L. fruits inhibit NADPH

- oxidase complex and protect DNA against doxorubicin-induced damage in Wistar male rats. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* **79**, 885–893 (2016).
90. Venancio, V. P., Cipriano, P. A., Kim, H., Antunes, L. M. G., Talcott, S. T., Mertens-Talcott, S. U. Cocoplum (*Chrysobalanus icaco* L.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food Funct.* **8**, 307–314 (2017).
 91. Gunstone, F. D., Subbarao, R. New tropical seed oils. Part I. Conjugated trienoic and tetraenoic acids and their oxo derivatives in the seed oils of *Chrysobalanus icaco* and *Parinarium Laurinum*. *Chem. Phys. Lipids* **1**, 349–359 (1967).
 92. Martins-da-Silva, R. C. V. *Coleta e identificação de espécimes botânicos. Documentos 143*. Belém, Embrapa Amazônia Oriental (2002).
 93. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Farmacopeia Brasileira*, **1**. 5ª ed. Brasília, ANVISA (2010).
 94. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*. 1ª ed. Brasília, ANVISA (2011).
 95. World Health Organization (WHO). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, WHO (1998).
 96. Dejaegher, B., Heyden, Y. V. Chromatographic Development, Validation and Data Handling of Tea Fingerprints. In: Preedy, V. R. *Tea in Health and Disease Prevention*. London, Elsevier (2013).
 97. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003*. Brasília, ANVISA, (2003).
 98. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012*. Brasília, ANVISA, (2012).
 99. Food and Drug Administration (FDA). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services FDA (2001).
 100. Swartz, M. E., Krull, I. S. HPLC Method Development and Optimization with Validation in Mind. In: Swartz, M. E., Krull, I. S. *Handbook of Analytical Validation*. Boca Raton, CRC Press (2012).
 101. Cuyckens, F. & Claeys, M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 2341–2348 (2002).
 102. Edgar, M. Traditional Chinese Medicines: Regulatory and Scientific

- Challenges. In: Lin, Y. *Drug Discovery and Traditional Chinese Medicine: Science, Regulation, and Globalization*. New York, Springer Science+Business Media (2001).
103. Silva, F. C. da. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica (2009).
 104. Silveira-Neta, J. de J. da, Paracampo, N. E. N. P. *Orientações Técnicas para a Gestão de Resíduos Químicos nos Laboratórios da Embrapa Amazônia Oriental. Documentos 384*. Belém, Embrapa Amazônia Oriental (2012).
 105. Marques, R. Caracterização Química da Fertilidade do Solo. In: Lima, M. R. de, Sirtoli, A. E., Motta, A. C. V., Oliveira, A. C. de, Serrat, B. M., Wisniewski, C., Ferreira, F. V., Almeida, L. S. de, Almeida, L. de, Krieger, K. I., Machado, M. A. de M., Favaretto, N., Cogo, N. P., Bertol, O. J., Marques, R. *Diagnóstico e Recomendações de Manejo do Solo: Aspectos Teóricos e Metodológicos*. Curitiba, Universidade Federal do Paraná (2006).
 106. Reissmann, C. B., Almeida, L. S. de, Serrat, B. M. Amostragem para análise de plantas de importância agrícola e florestal. In: Lima, M. R. de, Sirtoli, A. E., Motta, A. C. V., Oliveira, A. C. de, Serrat, B. M., Wisniewski, C., Ferreira, F. V., Almeida, L. S. de, Almeida, L. de, Krieger, K. I., Machado, M. A. de M., Favaretto, N., Cogo, N. P., Bertol, O. J., Marques, R. *Diagnóstico e Recomendações de Manejo do Solo: Aspectos Teóricos e Metodológicos*. Curitiba, Universidade Federal do Paraná (2006).
 107. Faquin, V. *Nutrição Mineral de Plantas*. Lavras, Universidade Federal de Lavras (2005).
 108. Santana, L. M. de, Silva, A. F. Características de solos do litoral onde ocorre o guajuru (*Chrysobalanus icaco* L.) e teores de N, P, K e Na nos órgãos desta espécie. *Rev. Ceres* **47**, 169–179 (2000).
 109. Lopes, A. S., Guilherme, L. R. G. *Uso eficiente de fertilizantes e corretivos agrícolas: aspectos agrônômicos. Boletim Técnico 4*. São Paulo, Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA) (2000).
 110. Silva, F. C. da, Eira, P. A. da, Barreto, W. de O., Pérez, D. V. & Silva, C. A. *Análises Químicas para Avaliação da Fertilidade do Solo: Métodos Usados na Embrapa Solos. Documentos N°3*. (Embrapa Solos, 1998).
 111. Soni, U., Brar, S., Gauttam, V. D. Effect of Seasonal Variation on Secondary Metabolites of Medicinal. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **6**, 3654–3662 (2015).
 112. Wang, G., Cao, F., Chang, L., Guo, X., Wang, J. Temperature has more effects than soil moisture on biosynthesis of flavonoids in Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) leaves. *New For.* **45**, 797–812 (2014).
 113. Radosavljevic-Stevanovic, N., Markovic, J., Agatonovic-Kustrin, S., Razic, S. Metals and organic compounds in the biosynthesis of cannabinoids: a

- chemometric approach to the analysis of *Cannabis sativa* samples. *Nat. Prod. Res.* **28**, 511–516 (2014).
114. Pirie, A. Parsons, D., Renggli, J., Narkowicz, C., Jacobson, G. A., Shabala, S. Modulation of flavonoid and tannin production of *Carpobrotus rossii* by environmental conditions. *Environ. Exp. Bot.* **87**, 19–31 (2013).
 115. Freitas, M. S. M. Flavonóides e nutrientes minerais em folhas de maracujazeiro amarelo e deficiência de macronutrientes e boro em maracujazeiro doce. 106 f. Tese - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campo dos Goytacazes (2006).
 116. Nissim-Levi, A., Kagan, S., Ovadia, R., Oren-Shamir, M. Effects of temperature, UV-light and magnesium on anthocyanin pigmentation in cocoplum leaves. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **78**, 61–64 (2003).
 117. Rabanes, H. R., Guidote, A. M., Quirino, J. P. Micellar electrokinetic chromatography of the constituents in *Philippine lagundi* (*Vitex negundo*) herbal products. *Microchem. J.* **112**, 153–158 (2014).
 118. Liu, Y., Sun, G., Wang, Y., Yang, L., Yang, F. Monitoring the quality consistency of Weibizhi tablets by micellar electrokinetic chromatography fingerprints combined with multivariate statistical analyses, the simple quantified ratio fingerprint method, and the fingerprint–efficacy relationship. *J. Sep. Sci.* **38**, 2174–2181 (2015).
 119. Li, S.-P., Chen, X.-J., Yang, F.-Q. Application of chemometrics in capillary electrophoresis analysis of herbal medicines. In: Hanrahan, G., Gomez, F. A. *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*. Hoboken, John Wiley & Sons (2010).
 120. Barros-Neto, B. de, Scarminio, I. S., Bruns, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 4ª ed. Porto Alegre, Artmed Editora (2010).
 121. Box, G. E. P., Hunter, J. S., Hunter, W. G. *Statistics for Experimenters*. 2ª ed. Hoboken, John Wiley & Sons (2005).
 122. Cass, Q. B., Cassiano, N. *Cromatografia Líquida: novas tendências e aplicações*. Rio de Janeiro, Elsevier (2015).
 123. Li, B., Petersen, N. J., Andersen, L. H., Hansen, S. H. Easy peak tracking in CE-UV and CE-UV-ESI-MS by incorporating temperature-correlated mobility scaling. *Electrophoresis* **34**, 1787–1795 (2013).
 124. Szymańska, E. Markuszewski, M. J., Capron, X., Nederkassel, A.-M. van, Heyden, Y. V., Markuszewski, M., Krajka, K., Kaliszan, R. Evaluation of different warping methods for the analysis of CE profiles of urinary nucleosides. *Electrophoresis* **28**, 2861–2873 (2007).

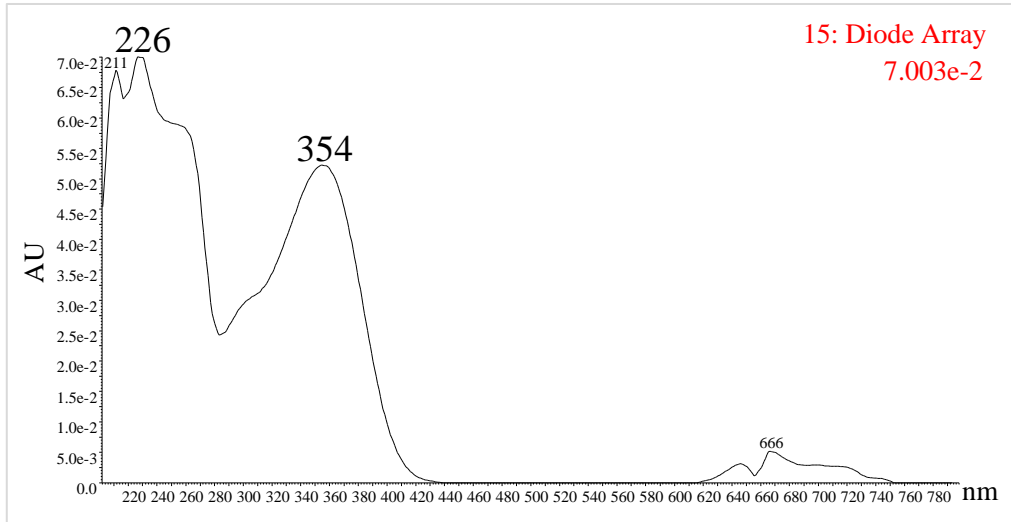
125. Doyle, J. J., Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison)*. **12**, 13–15 (1990).
126. Costa, M. R., Oliveira, M. do S. P. de. *Extração de DNA de Acaizeiro a partir de Folhas*. Documentos 127. Belém, Embrapa Amazônia Oriental (2002).
127. Cruz, C. D., Carneiro, P. C. S. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa (2003).
128. Rohlf, F. J. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. User Guide*. New York, Applied Biostatistics Inc. (2004).
129. Cruz, C. D. *Programa GENES - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa (1997).
130. Milach, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: Milach, S. C. K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1998).
131. Vieira, E. A. Vieira, E. A., Zimmer, P. D., Oliveira, A. C. de, Carvalho, F. I. F. de, Malone, G., Benin, G. Emprego de modelos gráficos na seleção de genitores de milho para hibridização e mapeamento genético. *Ciência Rural* **35**, 986–994 (2005).
132. Gantait, S., Debnath, S., Nasim Ali, M. Genomic profile of the plants with pharmaceutical value. *3 Biotech* **4**, 563–578 (2014).
133. Tedeschi, P., Bonetti, G., Maietti, A., Brandolini, V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint and antioxidants profile as markers for Tropea red onion (*Allium cepa* L.) authenticity. *J. Food Compos. Anal.* **36**, 98–103 (2014).
134. Dutra-Filho, J. A., Resende, L. V., Bastos, G. Q., Simões-Neto, D. E., Machado, P. R. Utilização de marcadores moleculares RAPD e EST 's SSR para estudo da variabilidade genética em cana-de-açúcar. *Rev. Ciência Agronômica* **44**, 141–149 (2013).
135. Millach, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: Queiroz, M. A. de; Goedert, C. O.; Ramos, S.R.R. *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro (on line)*. Petrolina, Embrapa Semi-Árido (1999).
136. Silva, J. A. G. da, Carvalho, F. I. F. de, Hartwig, I., Caetano, V. da R., Bertan, I., Maia, L. C. da, Schimidt, D. A. M., Finatto, T., Valério, I. P. Distância morfológica entre genótipos de trigo com ausência e presença do caráter “stay-green”. *Ciência Rural* **37**, 1261–1267 (2007).
137. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug

- Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757–766 (1991).
138. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer - Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107–1112 (1990).
 139. Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev.* **6**, 813–823 (2006).

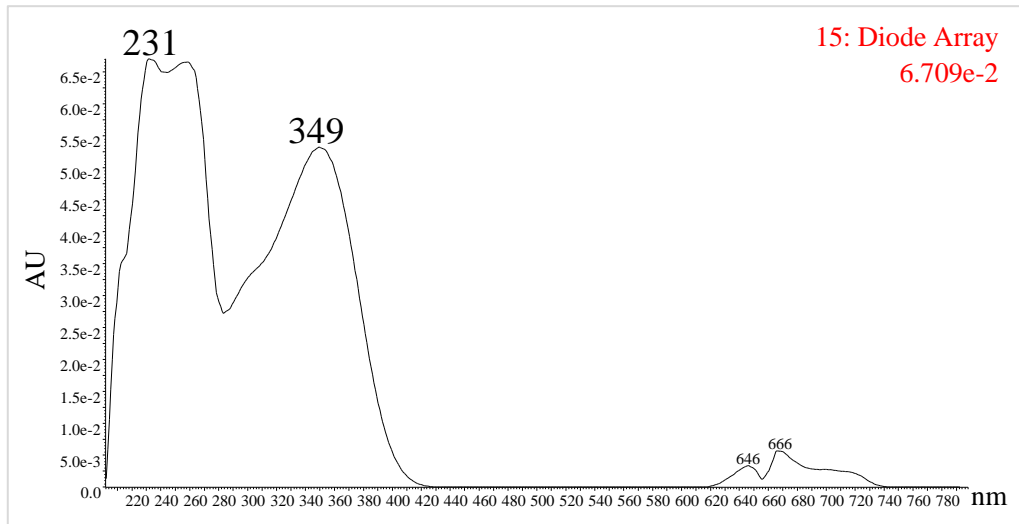
APÊNDICE A

Espectros no UV-Vis, adquiridos na faixa de 202 a 798 nm, dos picos majoritários do *fingerprint* UHPLC-DAD de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. icaco*.

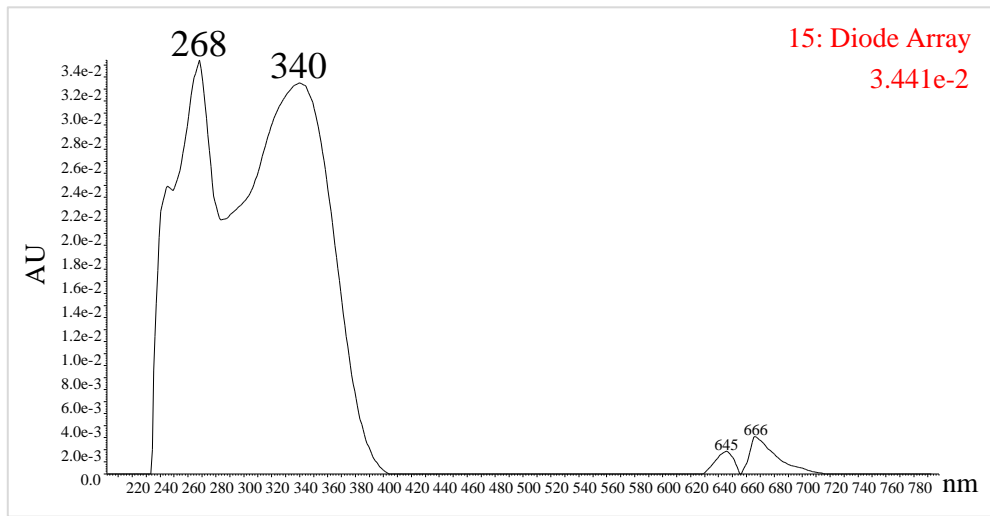
Pico 6



Pico 10



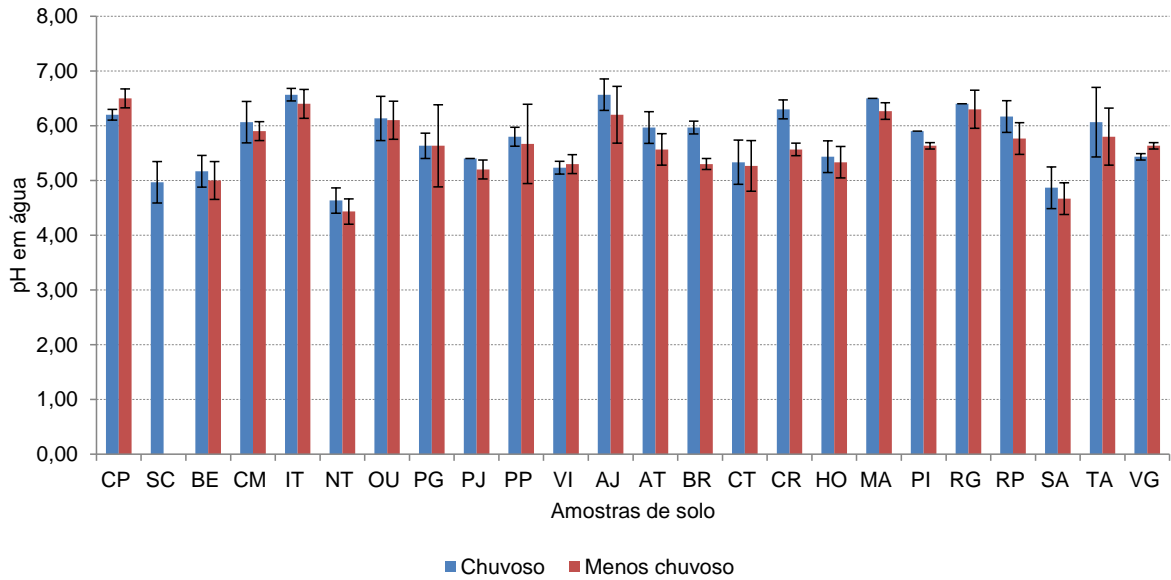
Pico 16



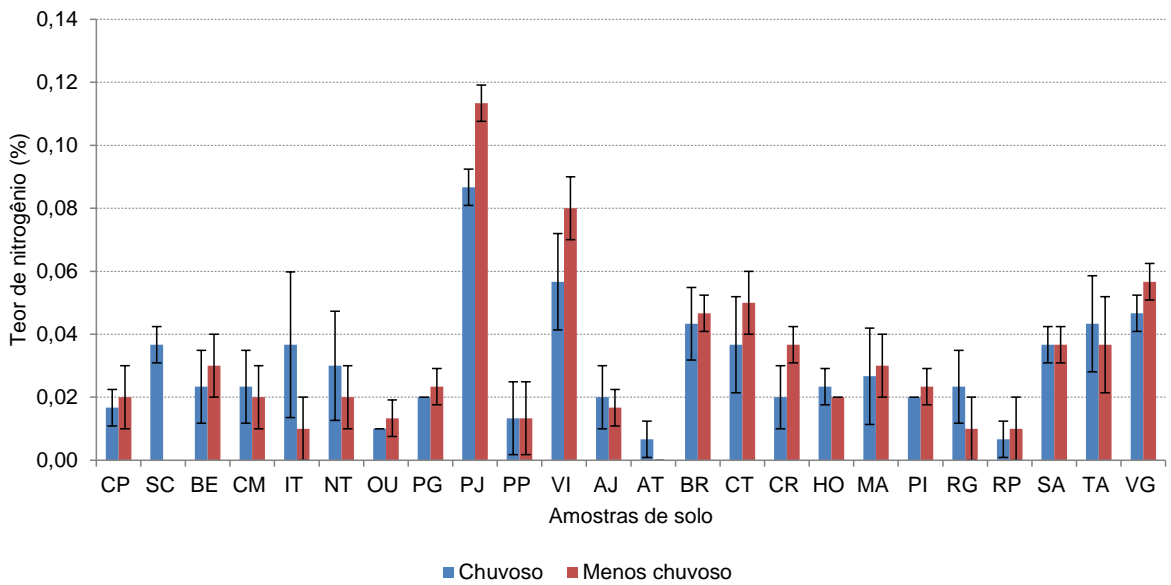
APÊNDICE B

Resultados da análise de fertilidade do solo das 47 amostras coletadas no habitat dos espécimes de *C. icaco*, durante o período chuvoso e menos chuvoso.

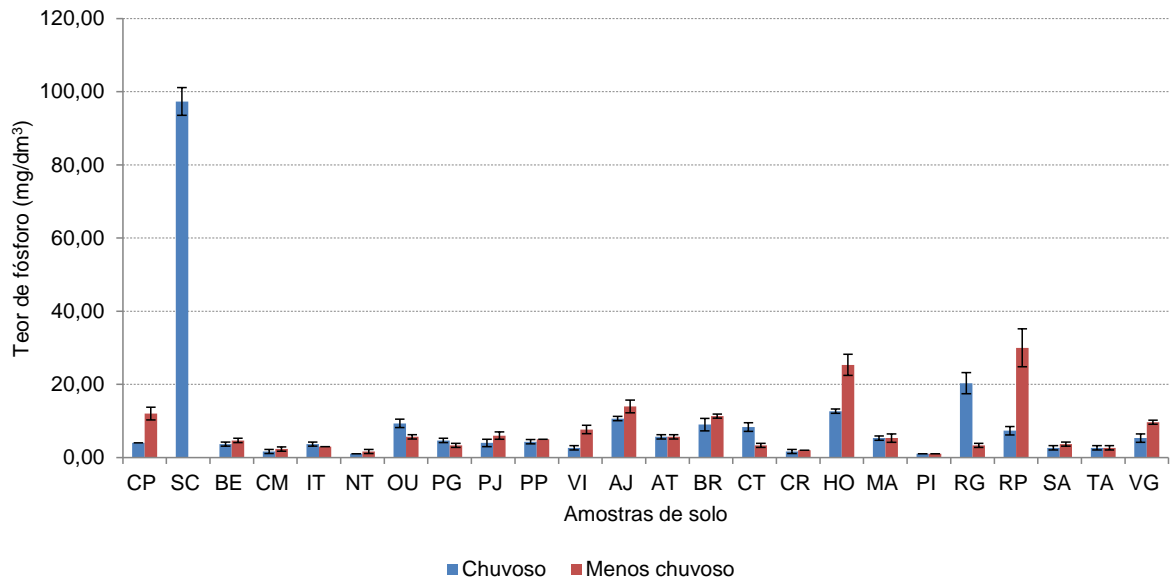
pH em água, determinado por potenciometria.



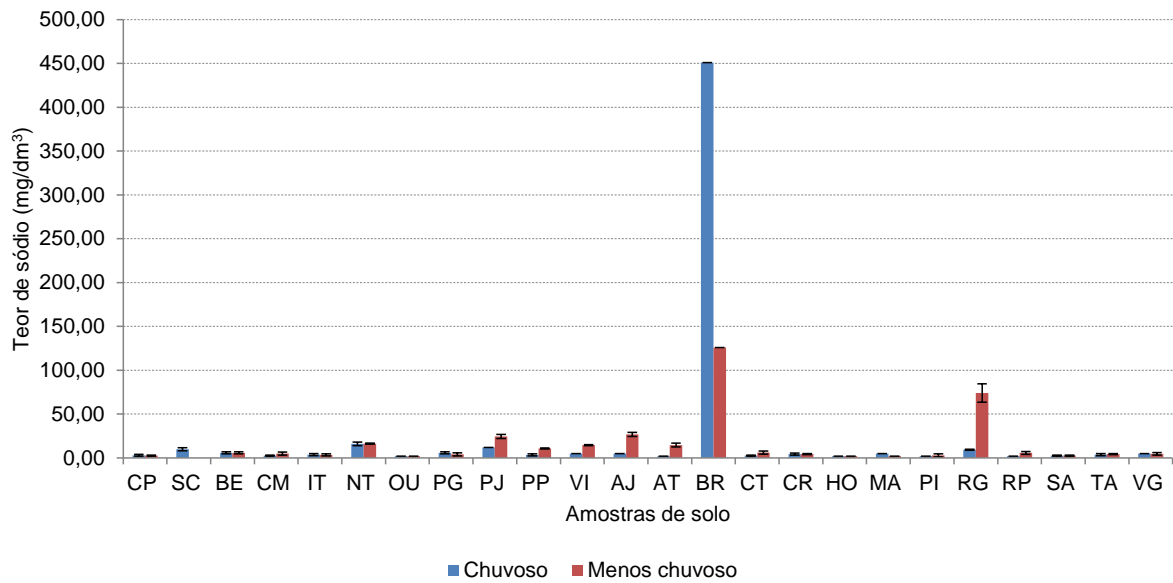
Teor de nitrogênio (N), determinado por volumetria.



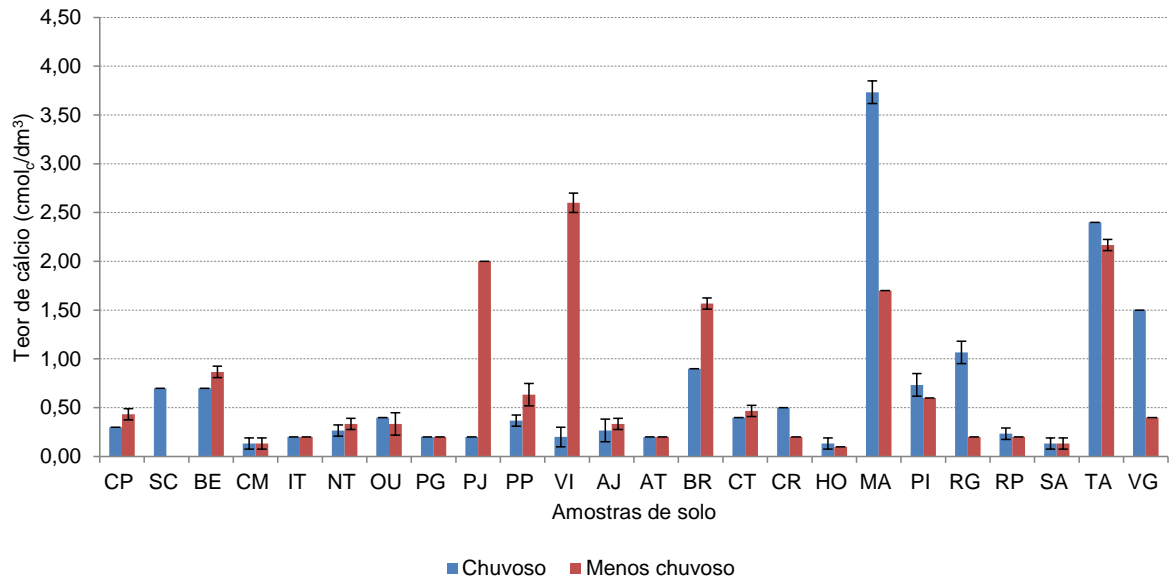
Teor de fósforo (P), determinado por espectrofotometria no UV-VIS.



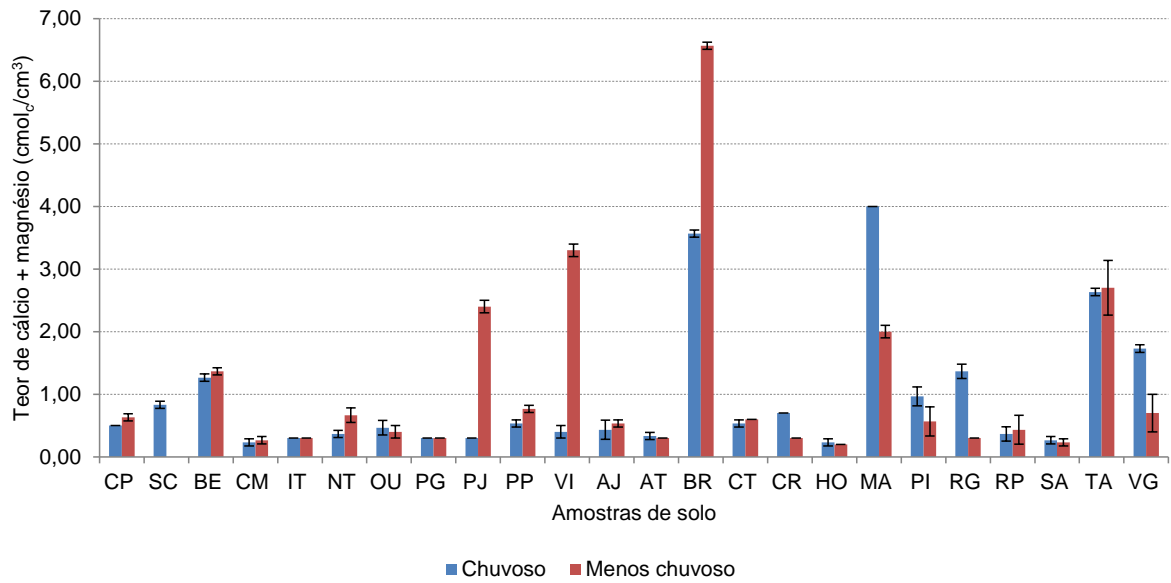
Teor de sódio (Na), determinado por fotometria de chama.



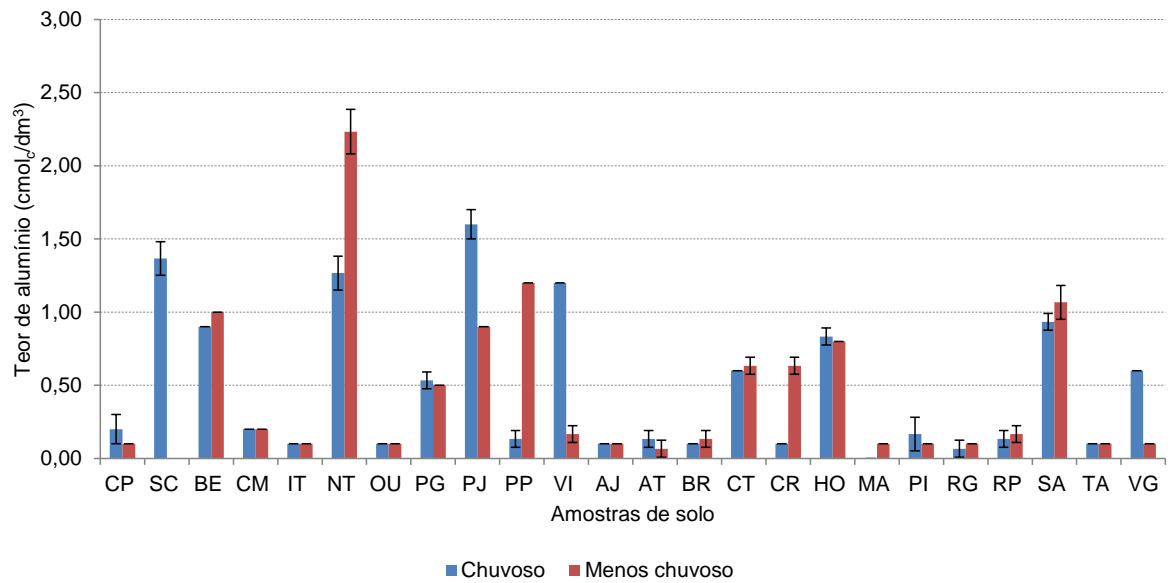
Teor de cálcio (Ca), determinado por volumetria.



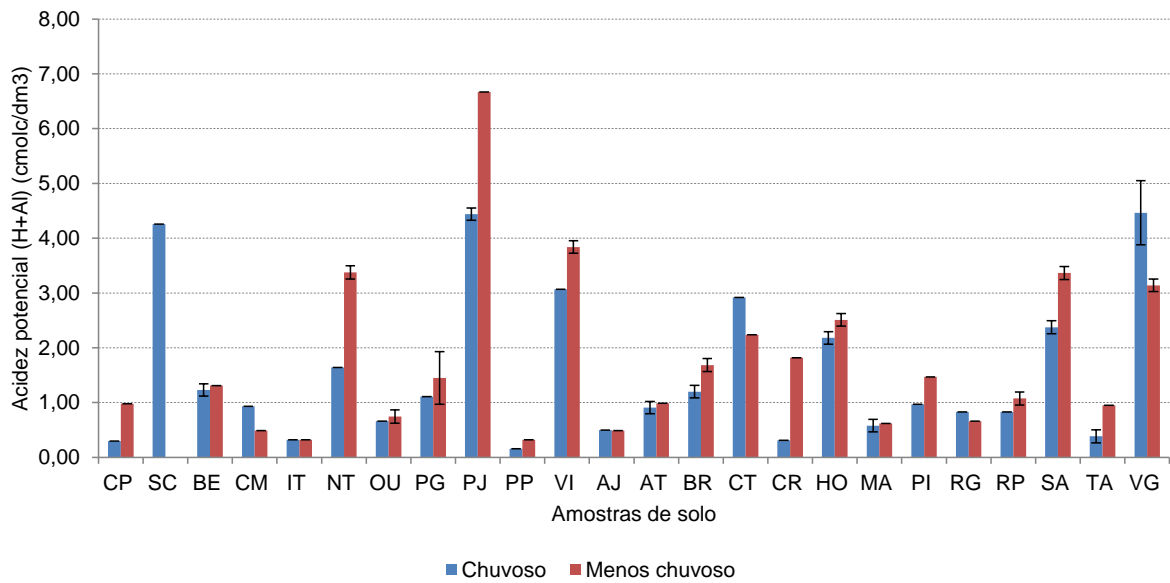
Teor de cálcio + magnésio (Ca + Mg), determinado por volumetria.



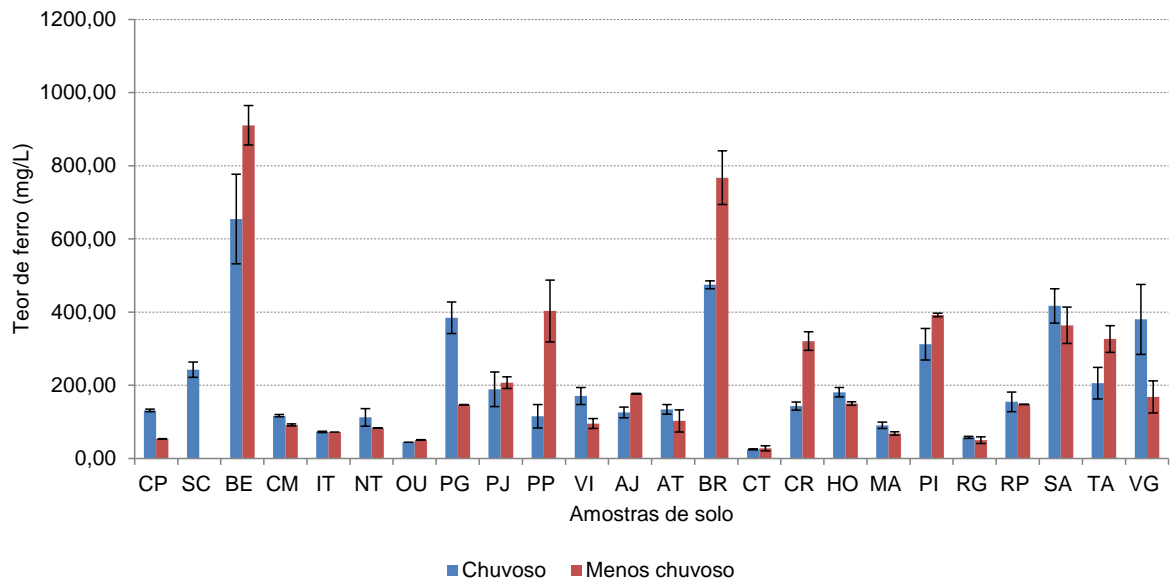
Teor de alumínio (Al), determinado por volumetria.



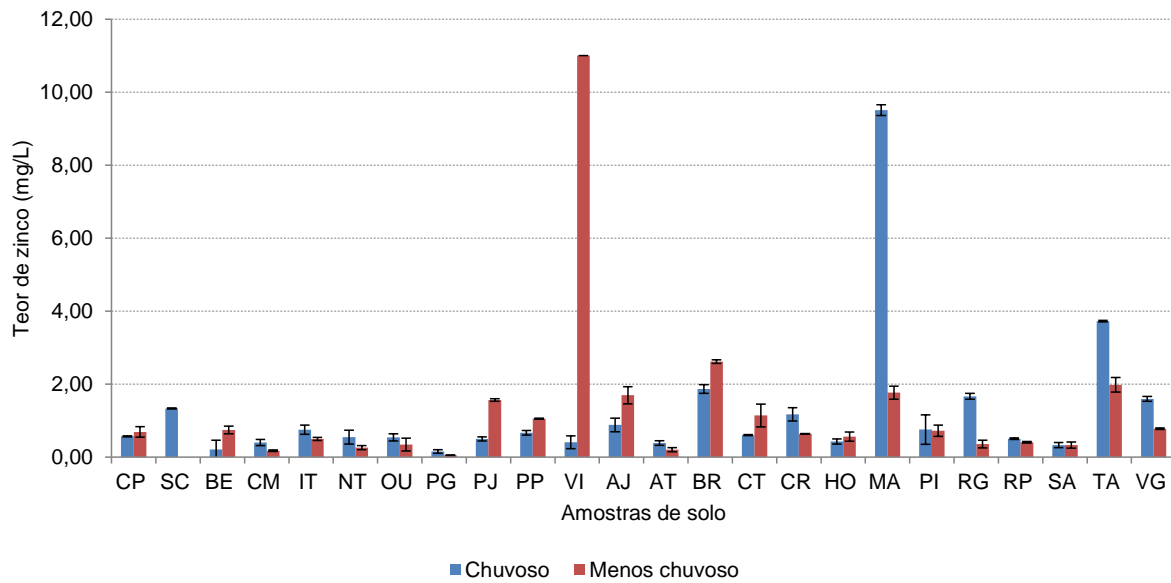
Acidez potencial (H + Al), determinado por volumetria.



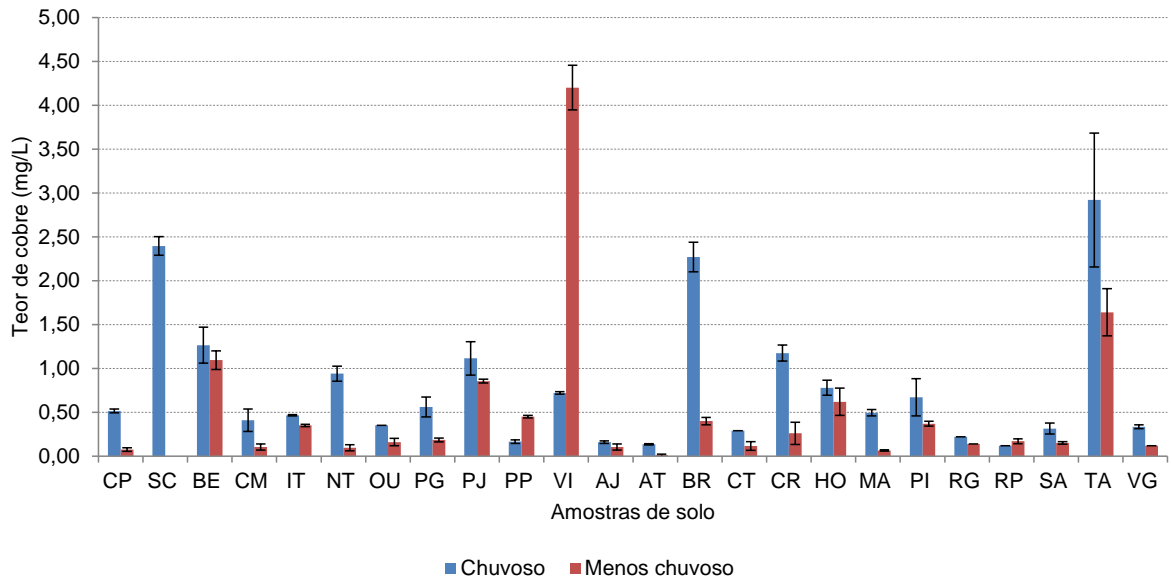
Teor de ferro (Fe), determinado por MP-AES.



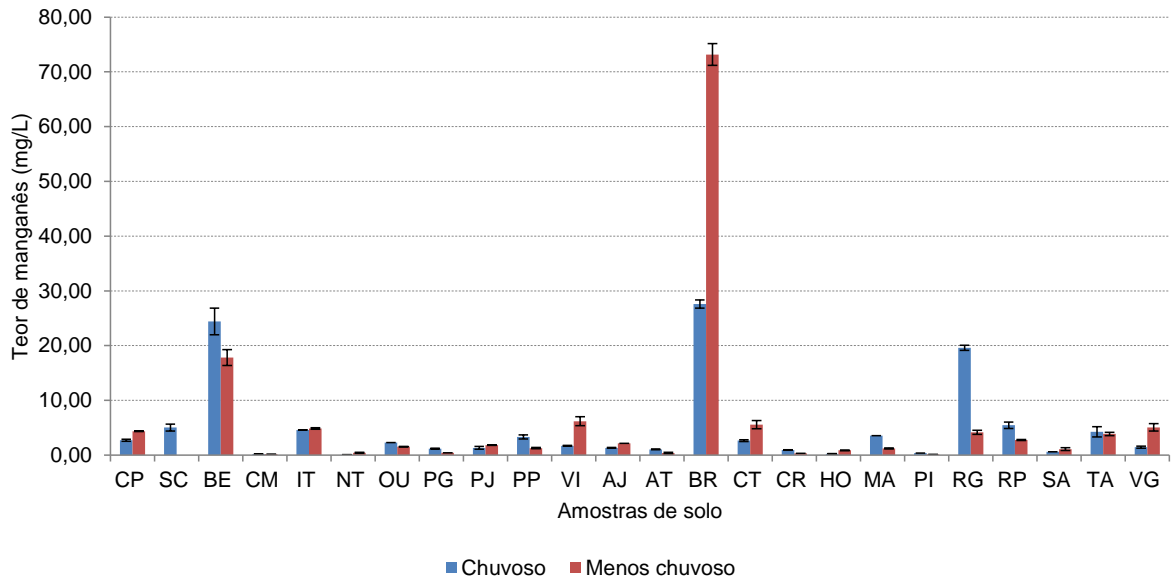
Teor de zinco (Zn), determinado por MP-AES.



Teor de cobre (Cu), determinado por MP-AES.



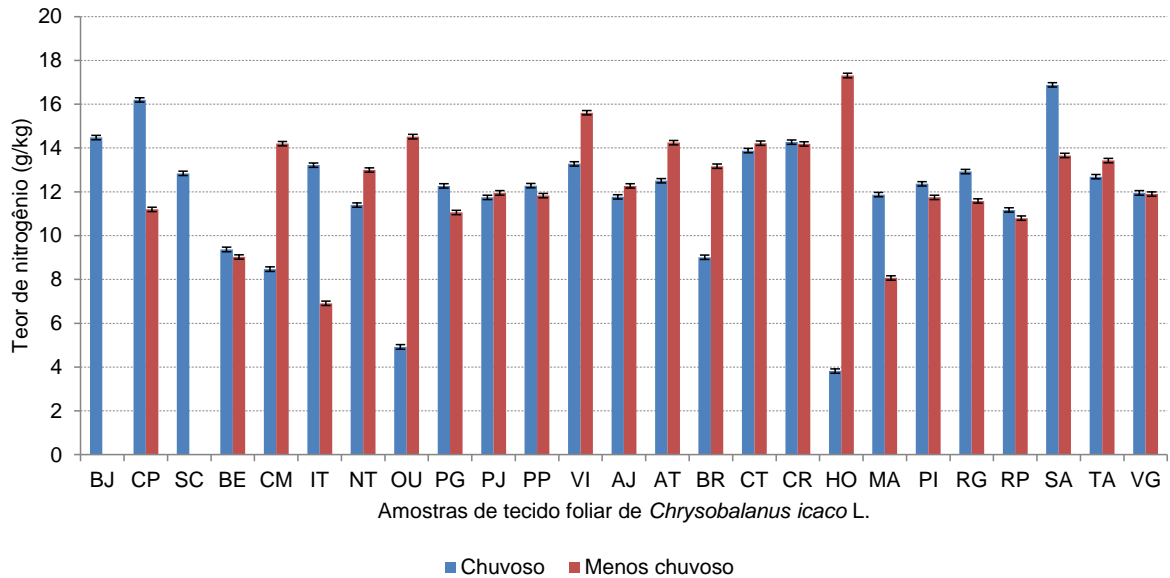
Teor de manganês (Mn), determinado por MP-AES.



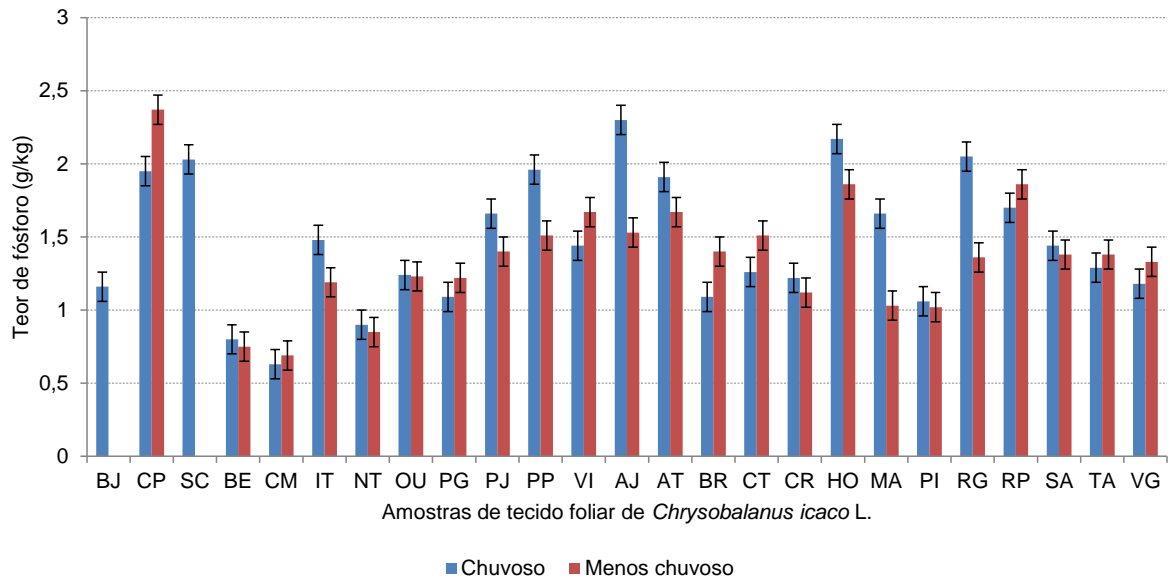
APÊNDICE C

Resultados da análise de tecido foliar das 48 amostras de folhas de *C. icaco*, coletadas durante o período chuvoso e menos chuvoso.

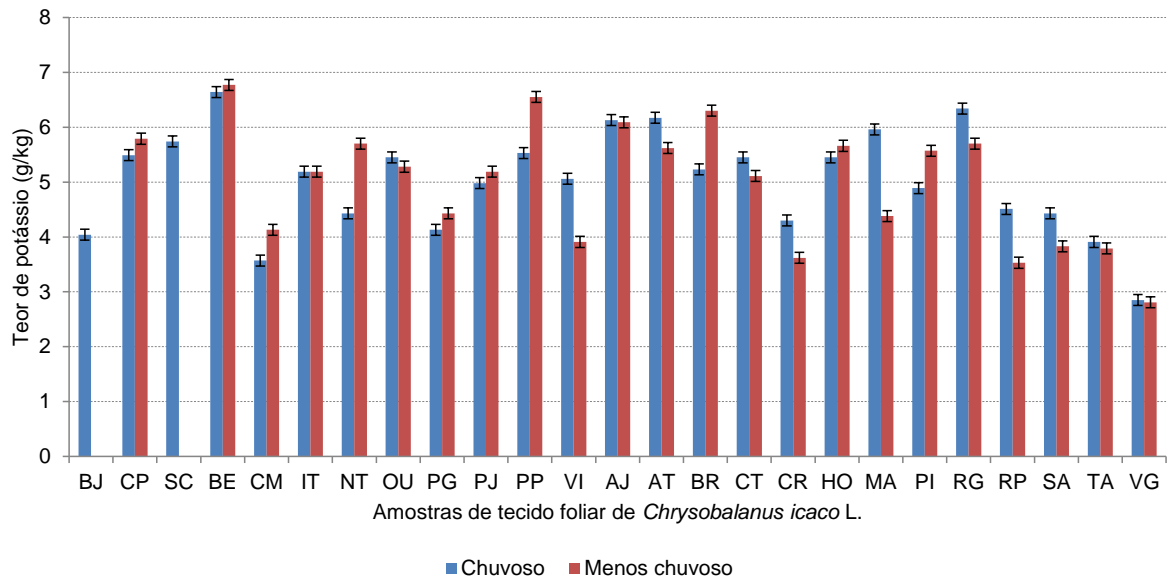
Teor de nitrogênio (N), determinado por volumetria.



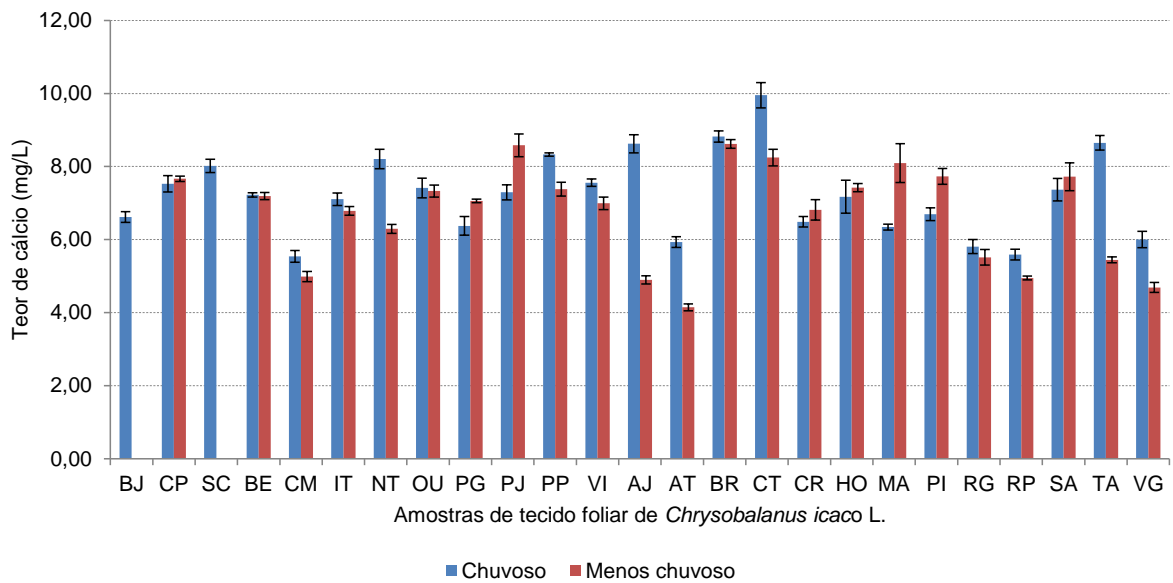
Teor de fósforo (P), determinado por espectrofotometria no UV-VIS.



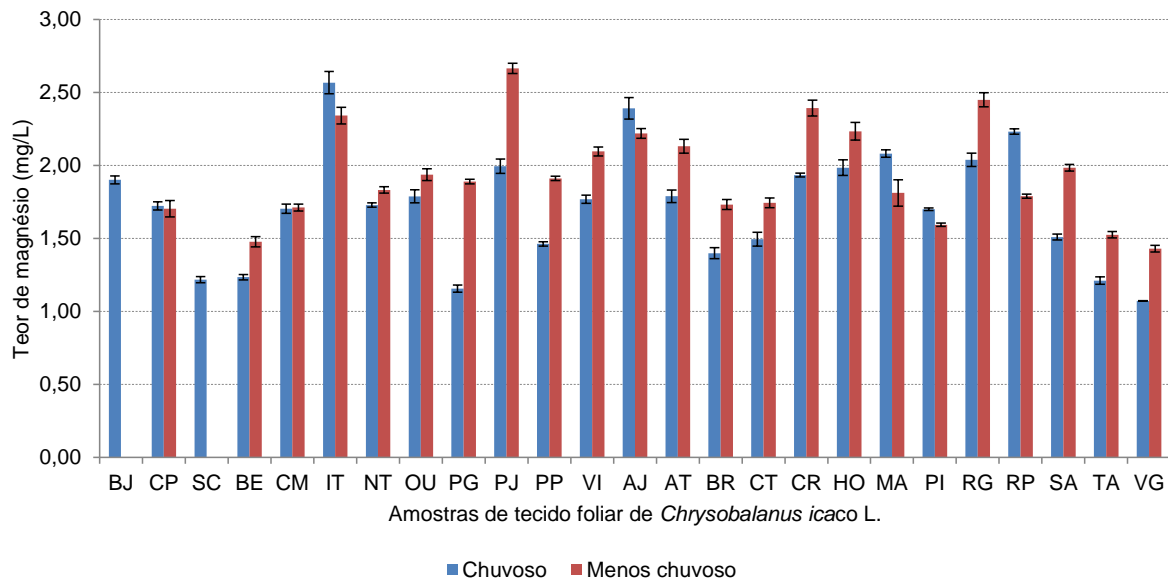
Teor de potássio (K), determinado por fotometria de chama.



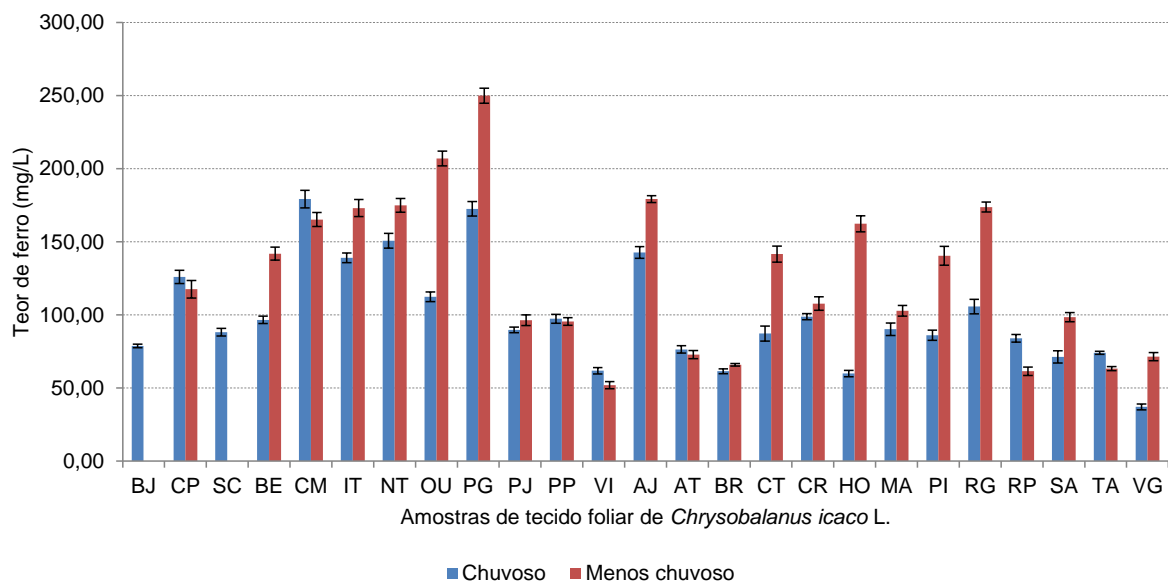
Teor de cálcio (Ca), determinado por MP-AES.



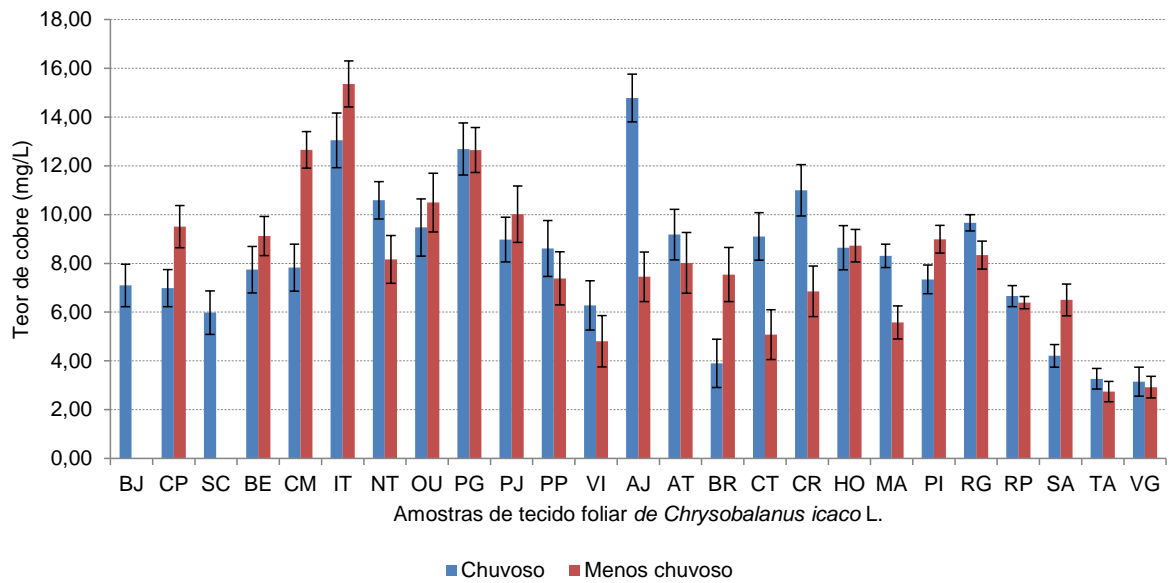
Teor de magnésio (Mg), determinado por MP-AES.



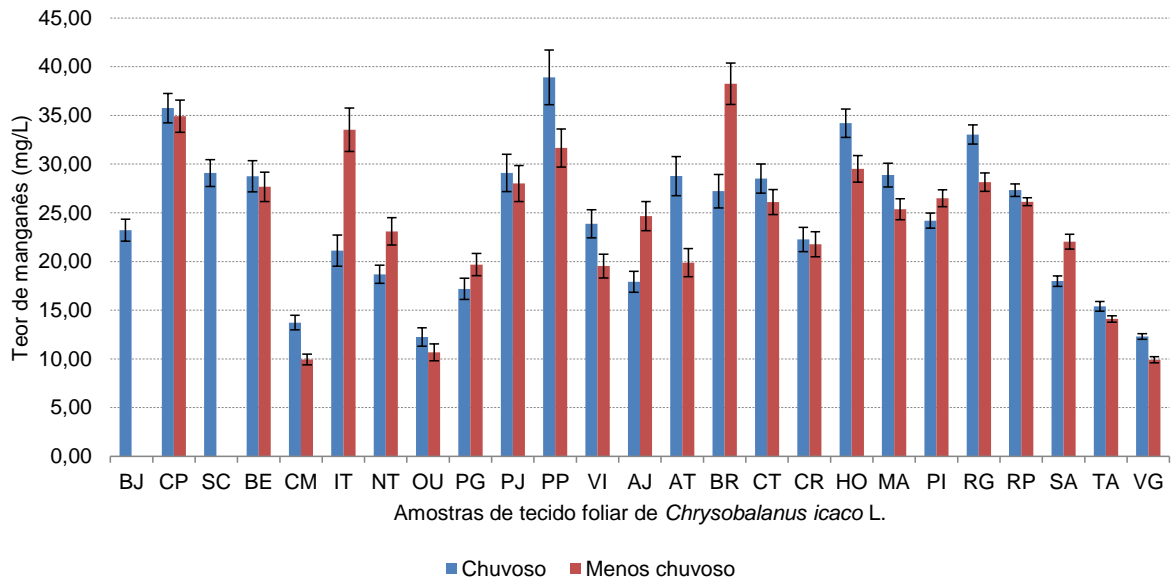
Teor de ferro, determinado por MP-AES.



Teor de cobre (Cu), determinado por MP-AES.



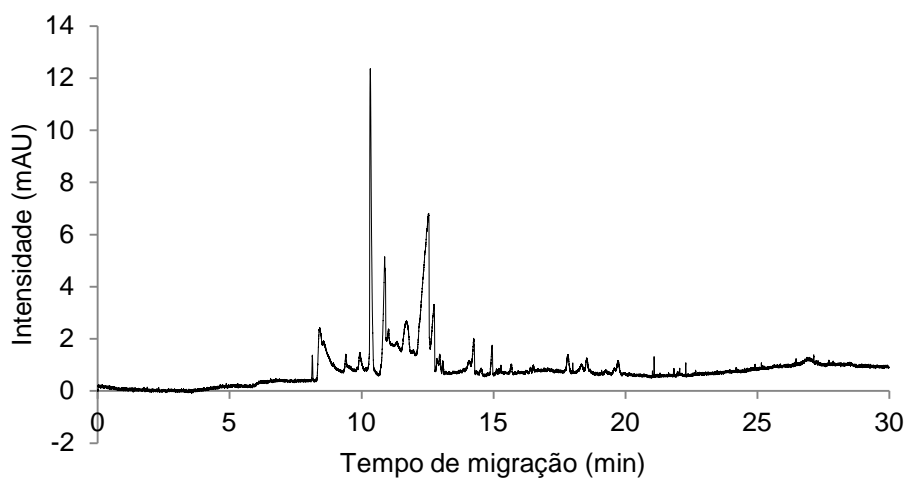
Teor de manganês (Mn), determinado por MP-AES.



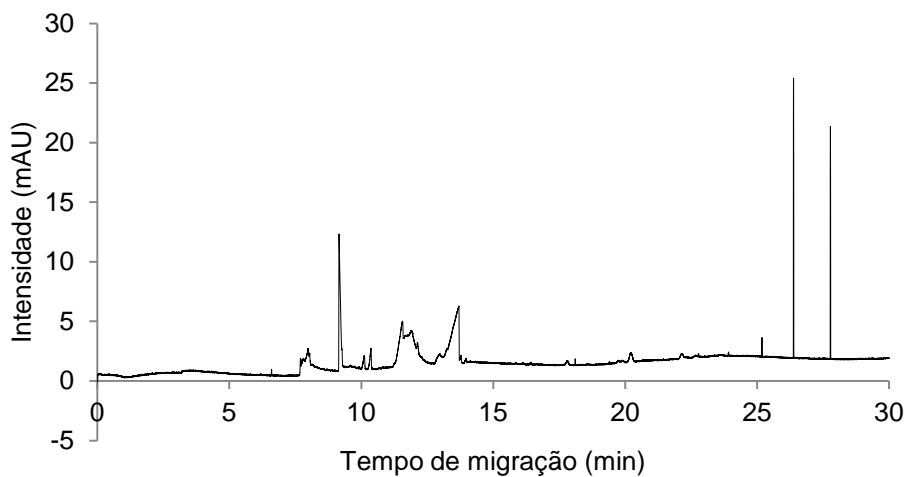
APÊNDICE D

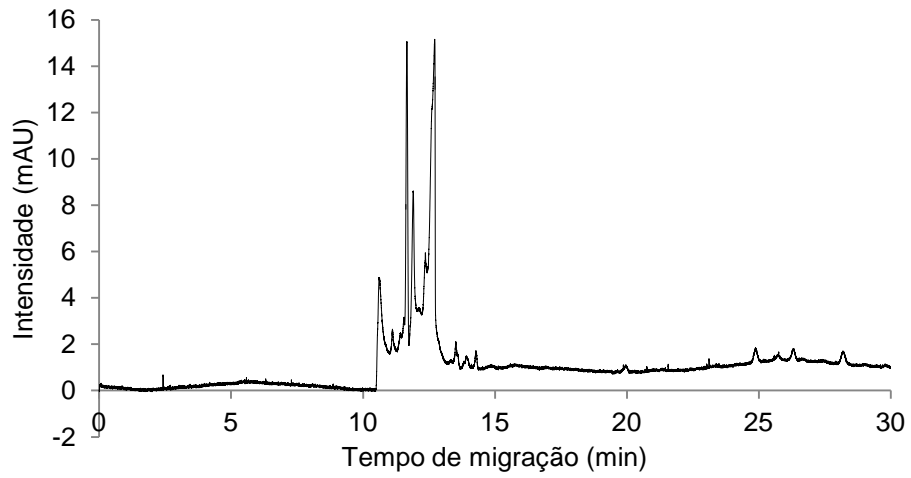
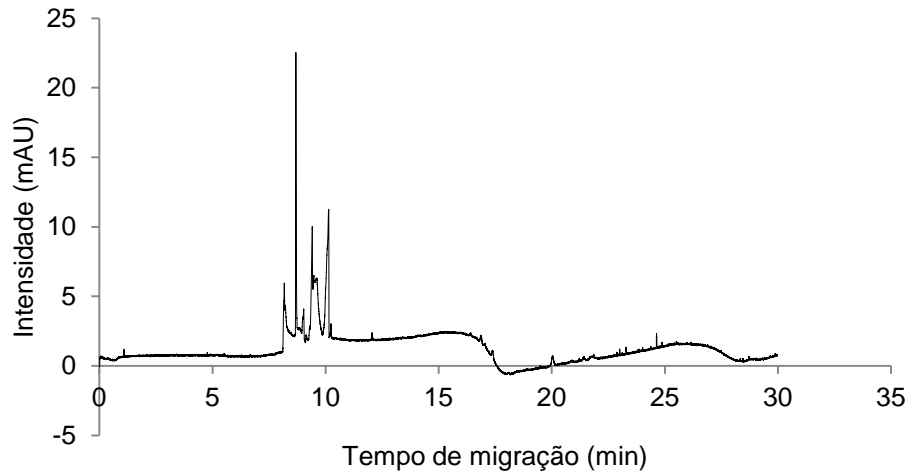
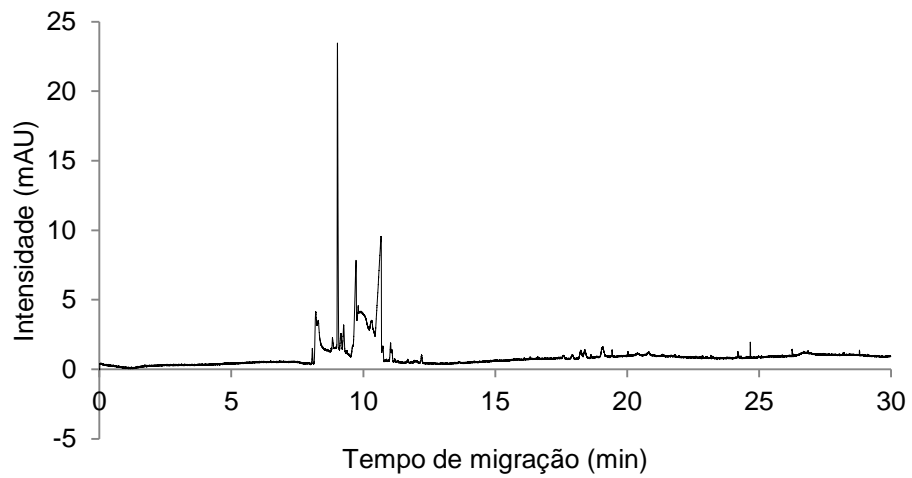
Eletoferogramas ilustrativos do primeiro e segundo delineamento composto central (CCD) realizados para otimizar as concentrações de H_3PO_4 e SDS na solução de separação utilizada na análise de *fingerprint* do extrato hidroalcoólico de *C. icaco* por CE-DAD.

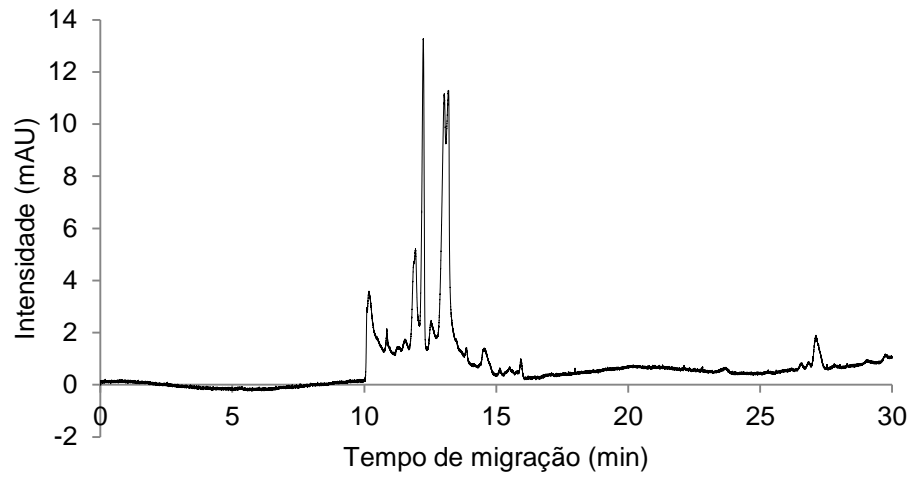
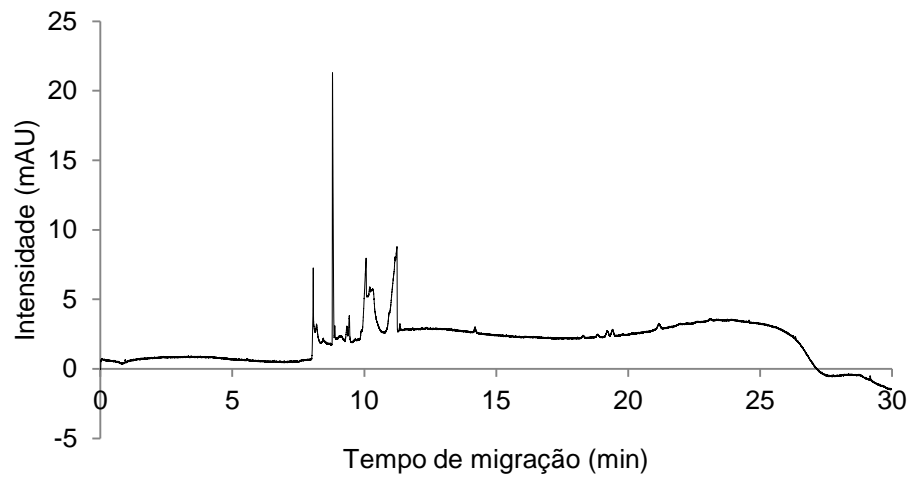
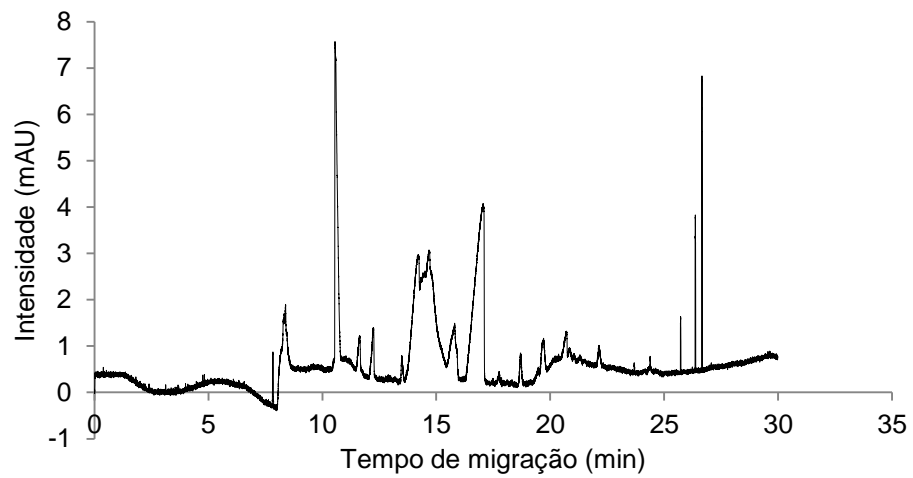
1º CCD: 50 mmol/L H_3PO_4 - 16 mmol/L SDS

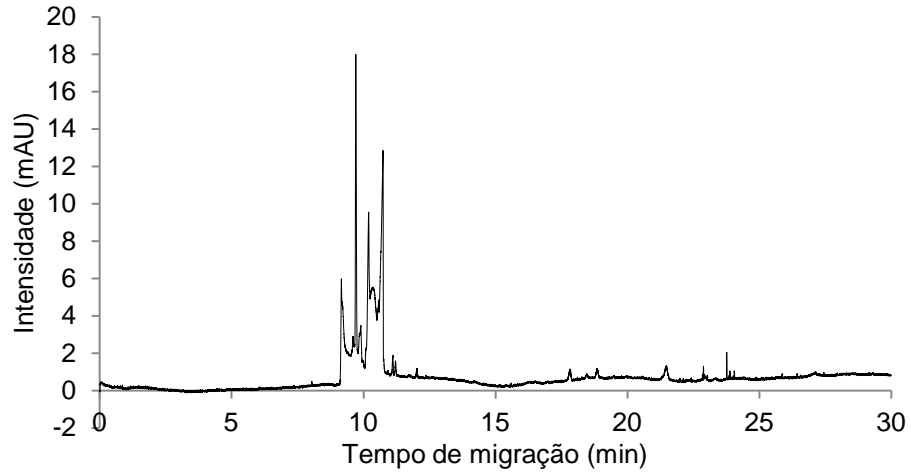
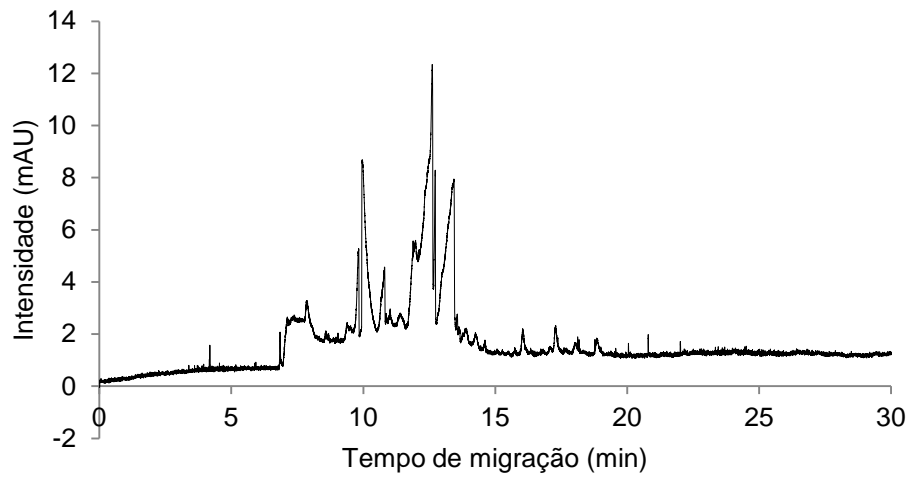
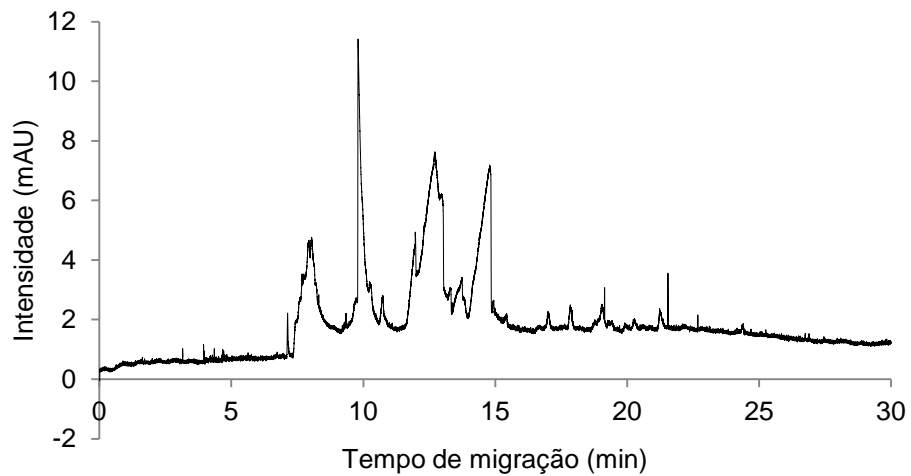


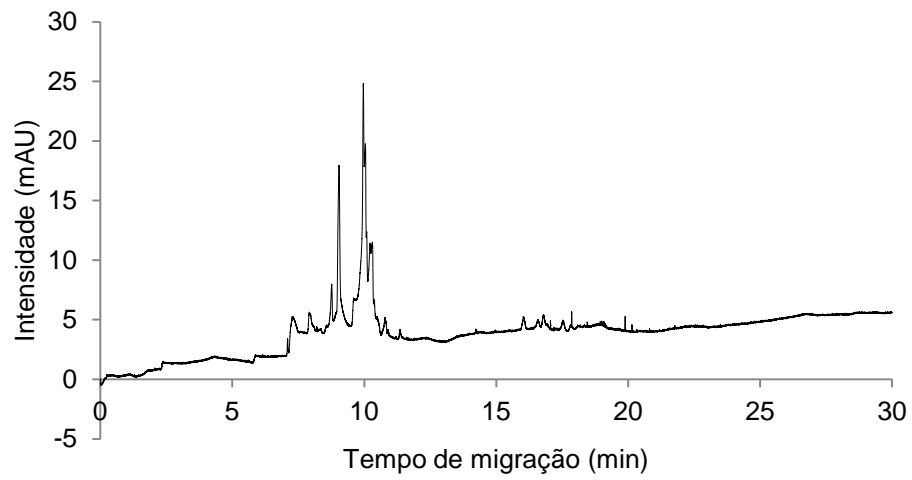
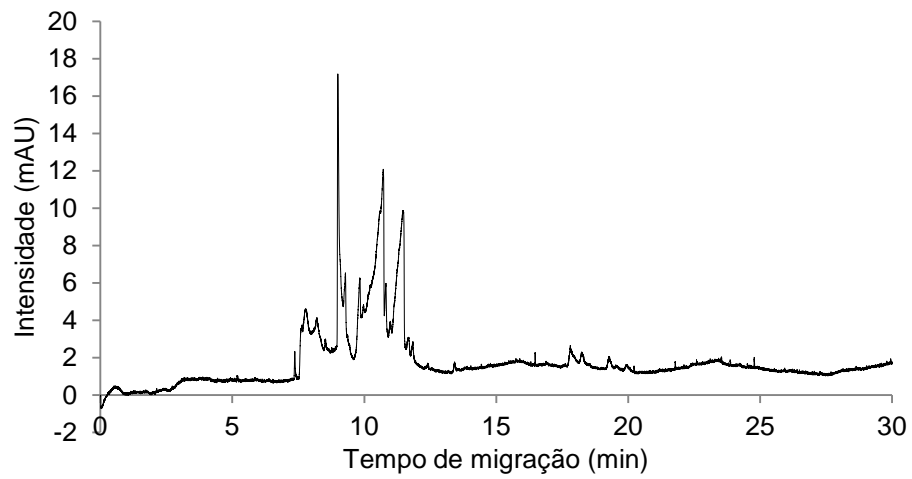
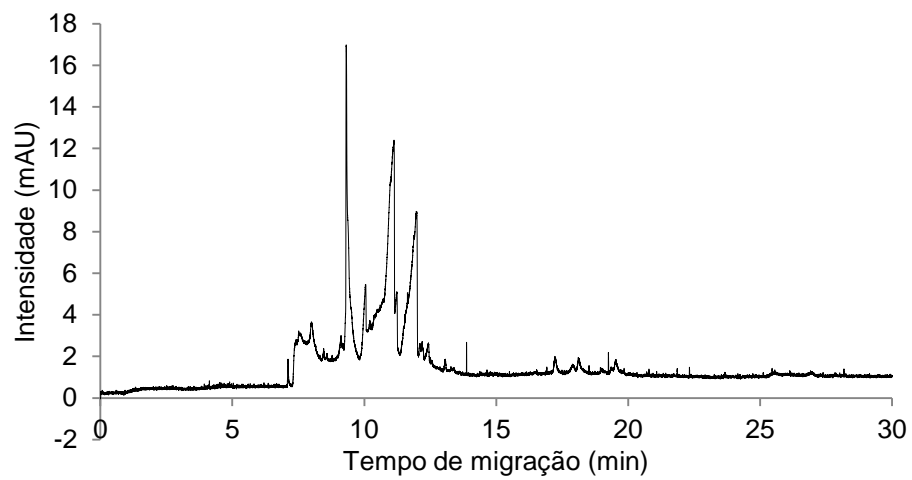
1º CCD: 150 mmol/L H_3PO_4 - 16 mmol/L SDS



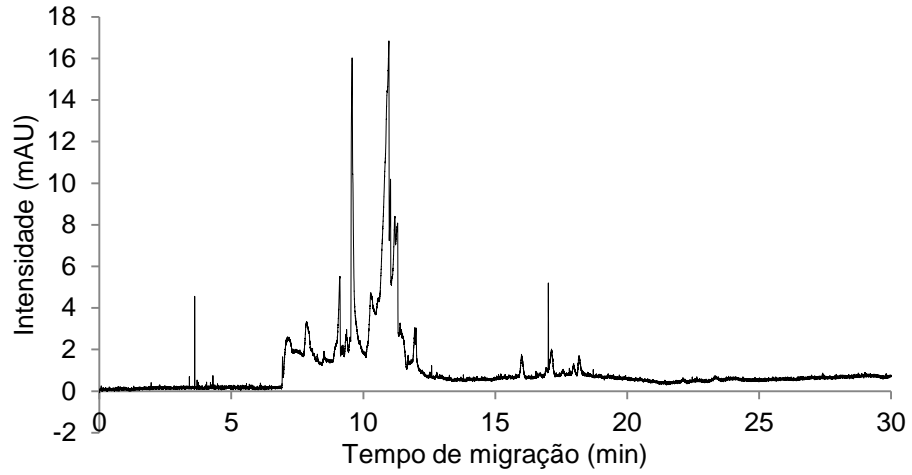
1º CCD: 50 mmol/L H₃PO₄ - 50 mmol/L SDS**1º CCD: 150 mmol/L H₃PO₄ - 50 mmol/L SDS****1º CCD: 100 mmol/L H₃PO₄ - 33 mmol/L SDS**

1º CCD: 30 mmol/L H₃PO₄ - 33 mmol/L SDS**1º CCD: 171 mmol/L H₃PO₄ - 33 mmol/L SDS****1º CCD: 100 mmol/L H₃PO₄ - 9 mmol/L SDS**

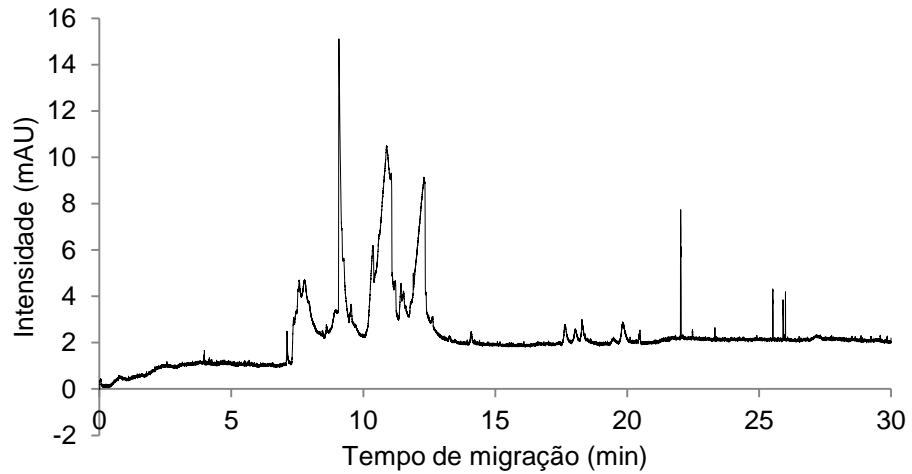
1º CCD: 100 mmol/L H₃PO₄ - 57 mmol/L SDS**2º CCD: 30 mmol/L H₃PO₄ - 11 mmol/L SDS****2º CCD: 70 mmol/L H₃PO₄ - 11 mmol/L SDS**

2º CCD: 30 mmol/L H₃PO₄ - 21 mmol/L SDS**2º CCD: 70 mmol/L H₃PO₄ - 21 mmol/L SDS****2º CCD: 50 mmol/L H₃PO₄ - 16 mmol/L SDS**

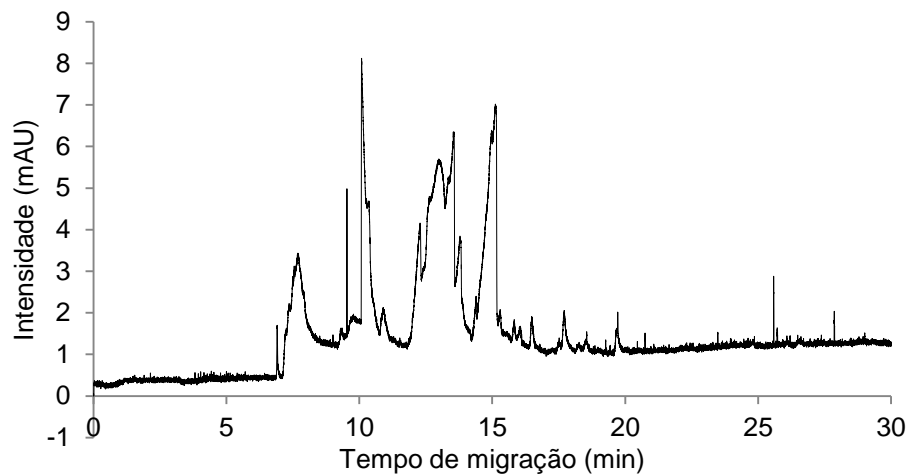
2º CCD: 22 mmol/L H₃PO₄ - 16 mmol/L SDS

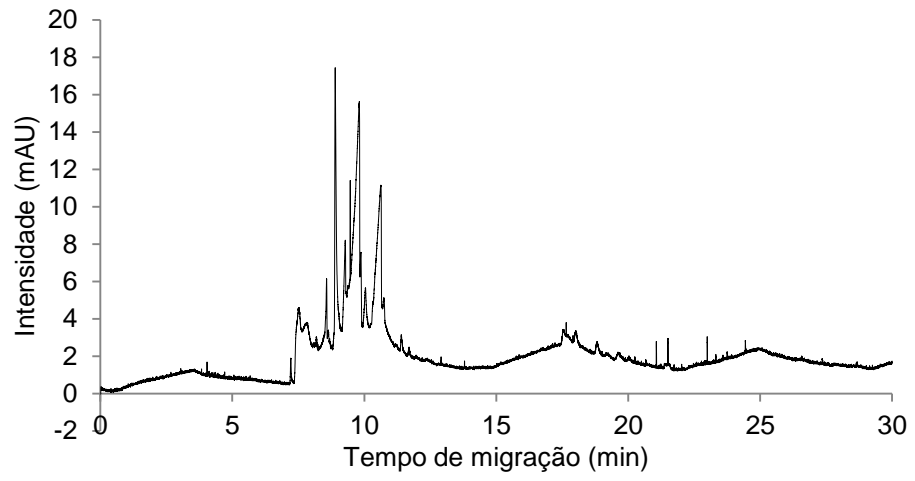


2º CCD: 78 mmol/L H₃PO₄ - 16 mmol/L SDS



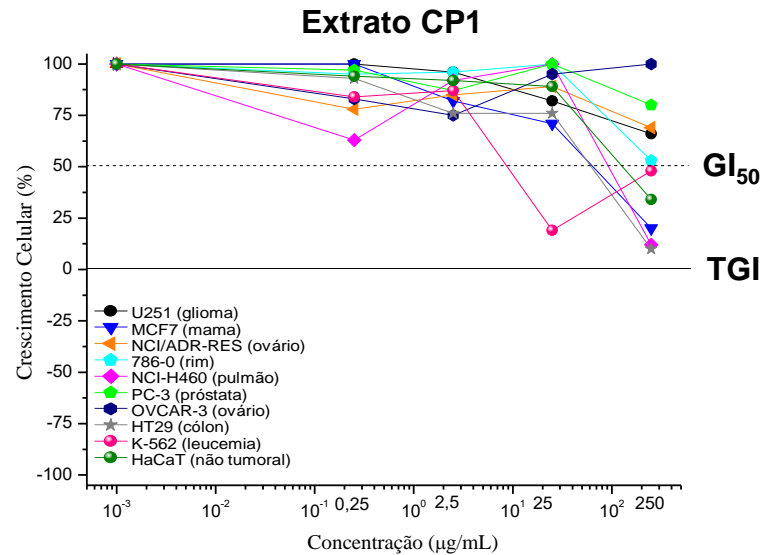
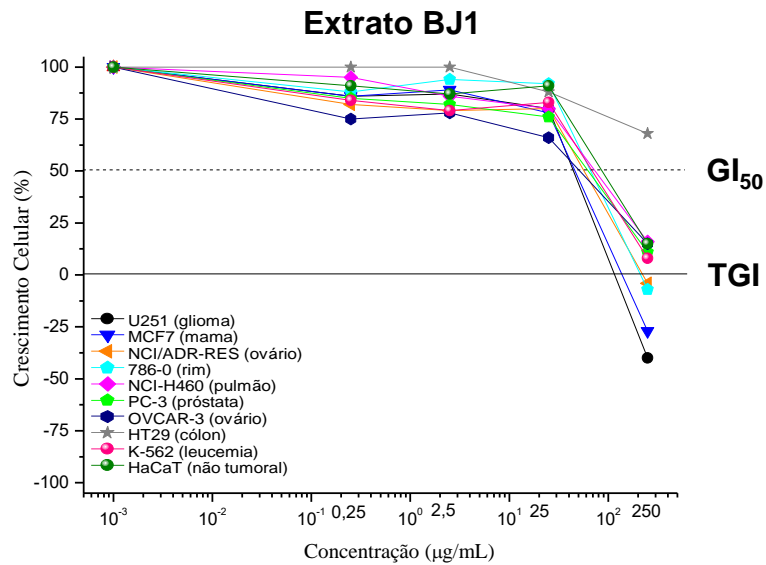
2º CCD: 50 mmol/L H₃PO₄ - 9 mmol/L SDS

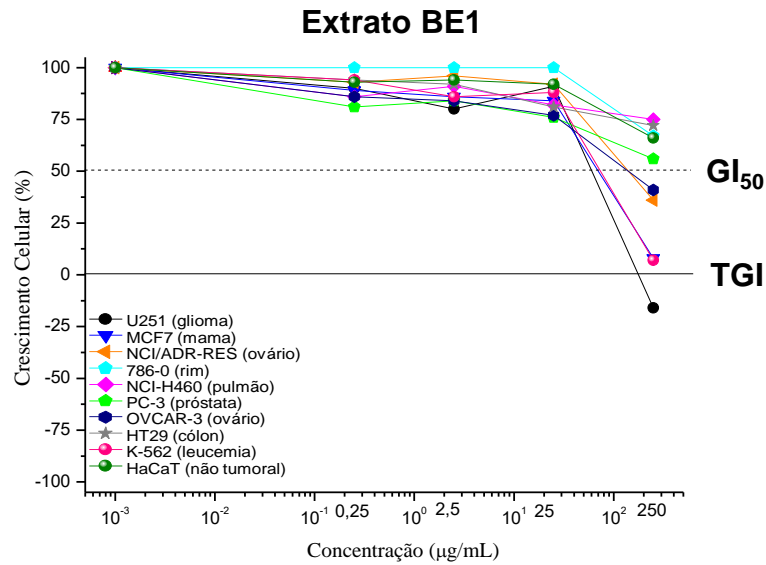
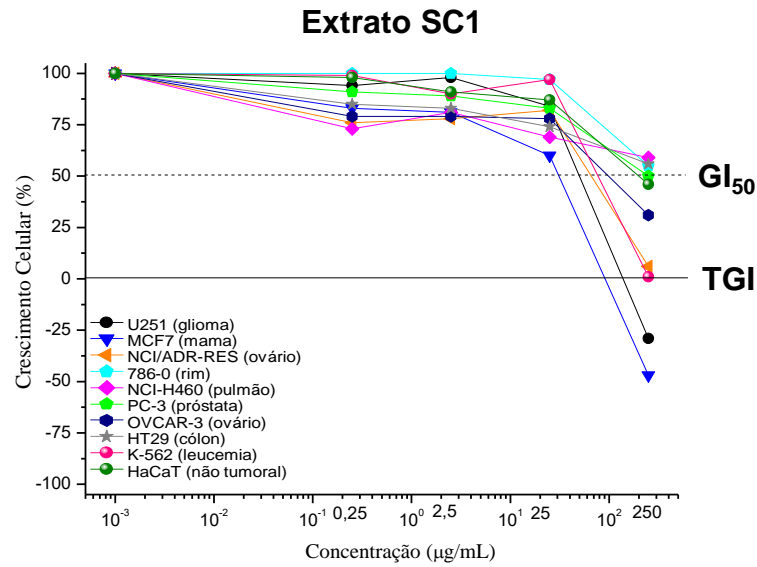
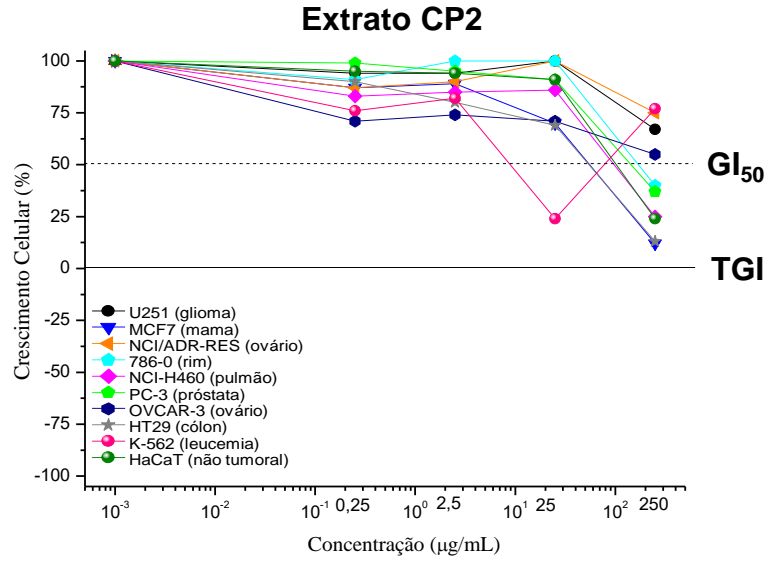


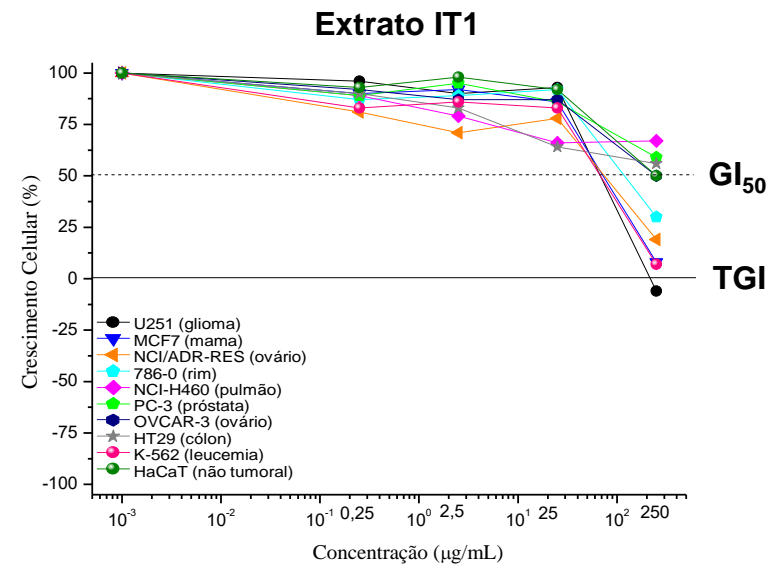
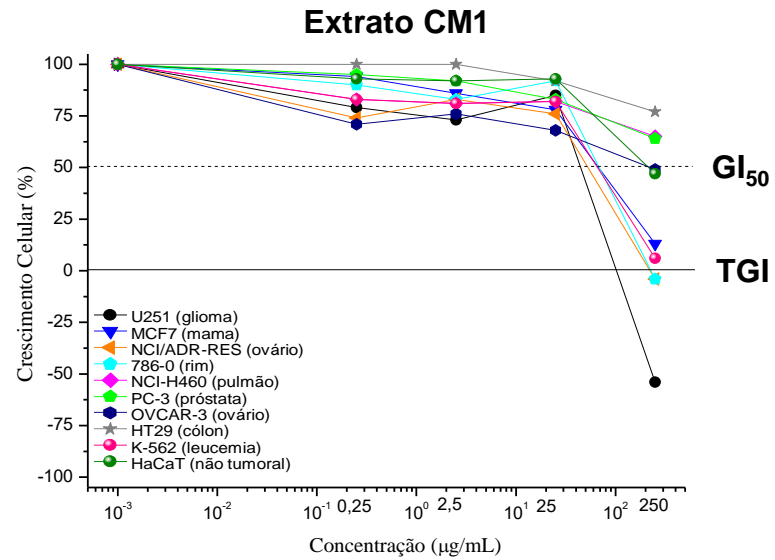
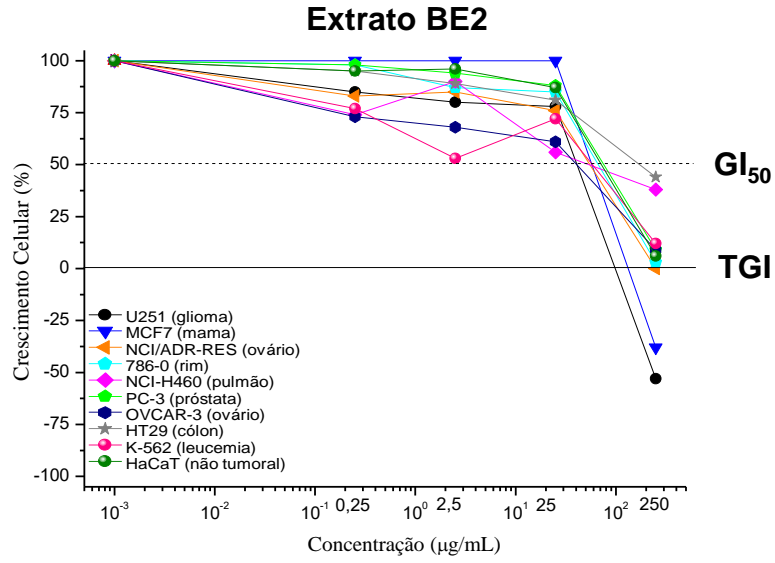
2º CCD: 50 mmol/L H₃PO₄ - 23 mmol/L SDS

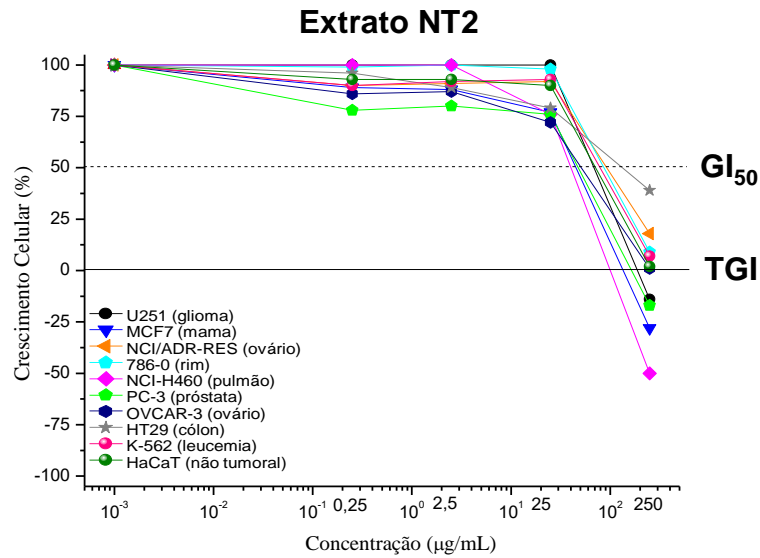
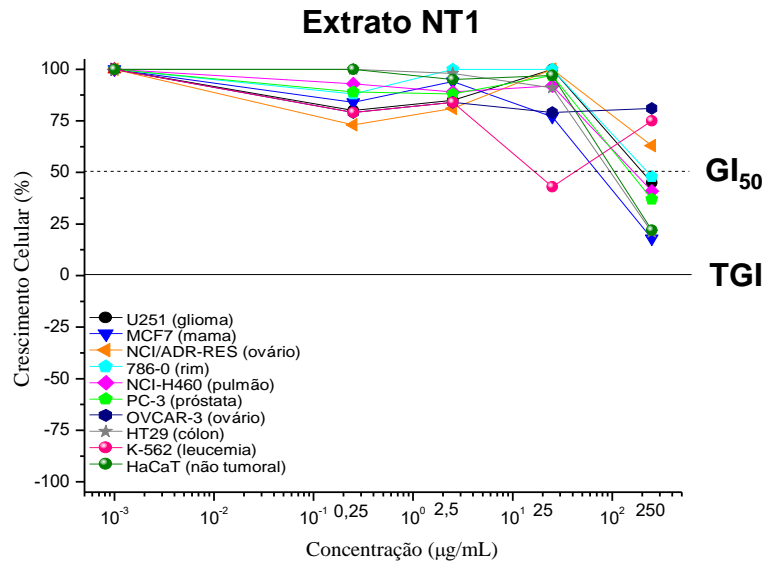
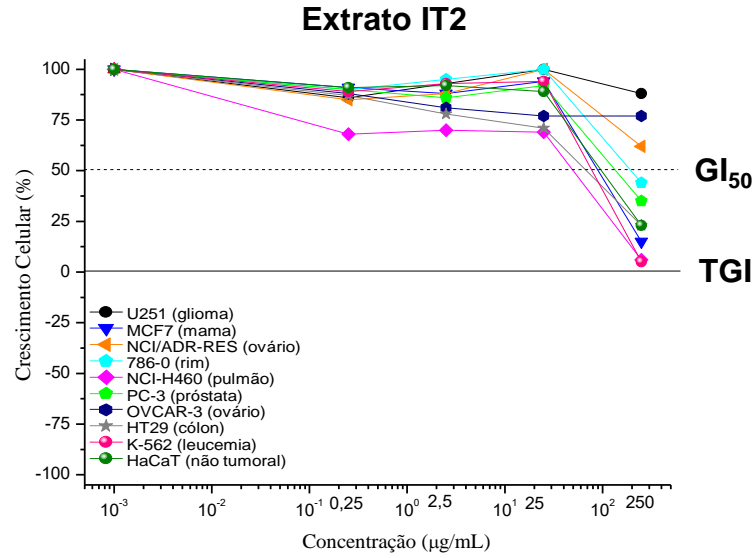
APÊNDICE E

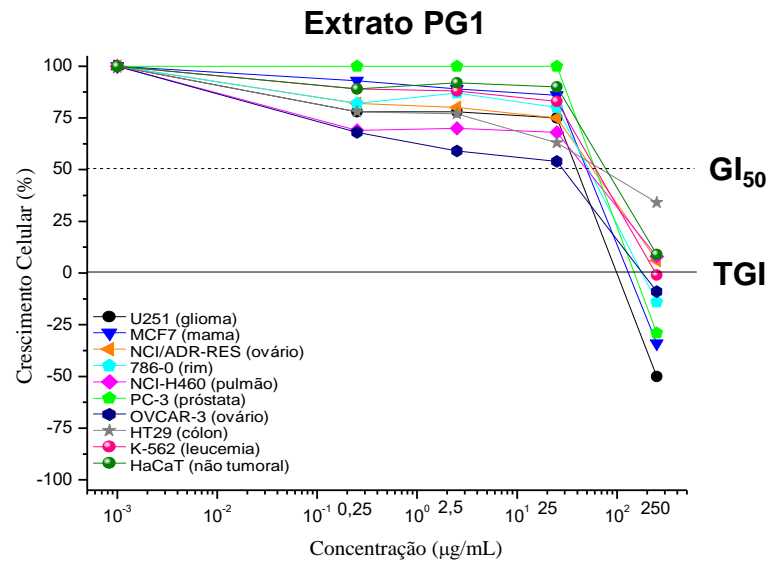
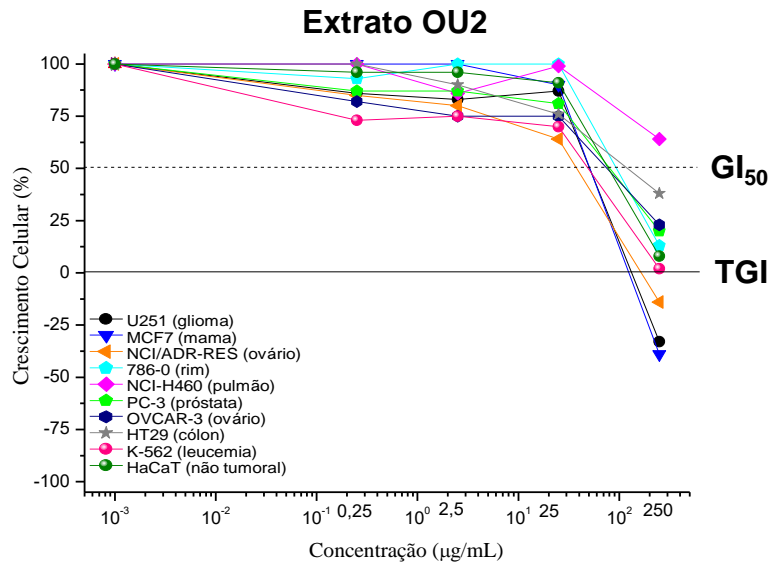
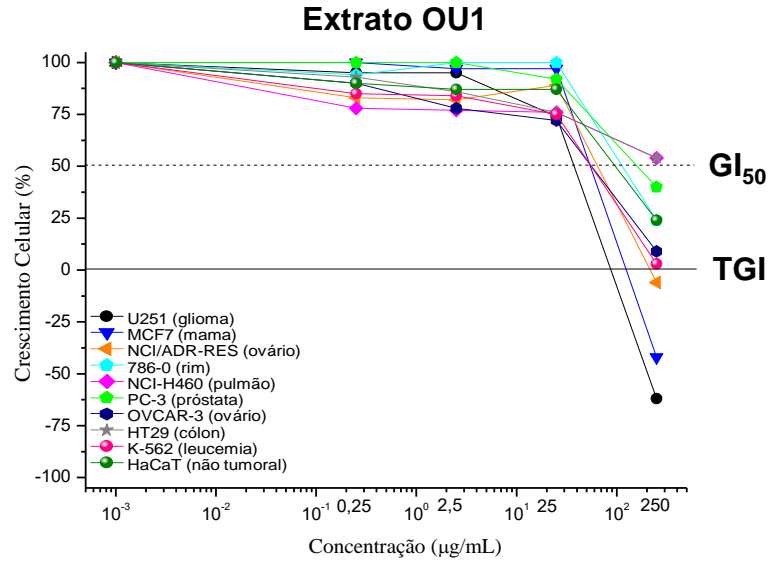
Resultados da atividade antiproliferativa *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das 48 amostras de *C. icaco* em cultura de células tumorais humanas. Os gráficos relacionam porcentagem de crescimento celular *versus* concentração do extrato (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), após 48 h de incubação. Valores positivos em relação ao eixo y correspondem à atividade citostática, enquanto os negativos se referem à atividade citocida (morte celular).

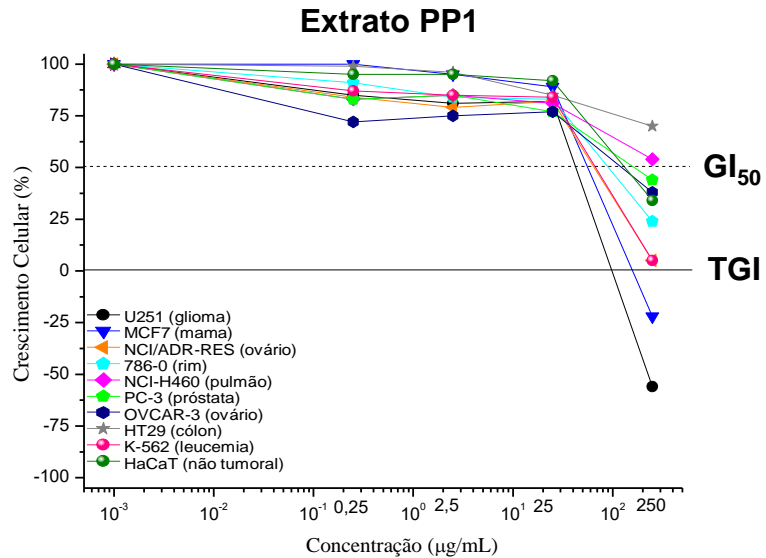
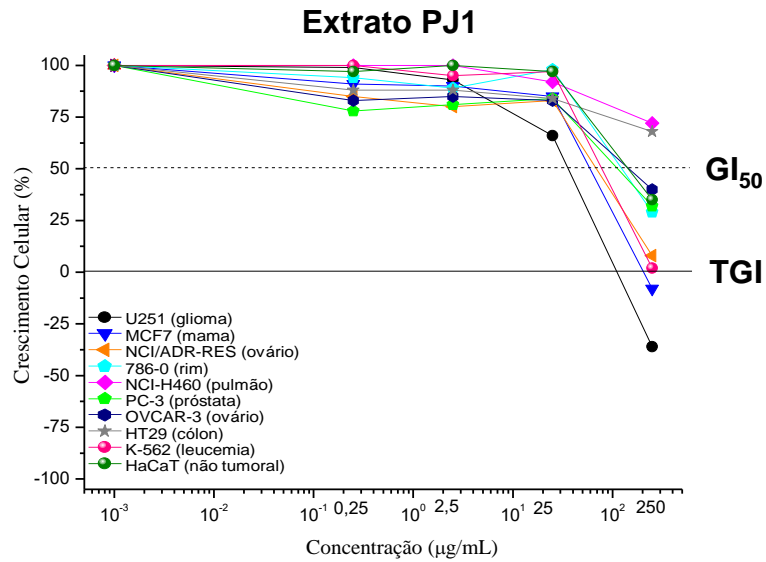
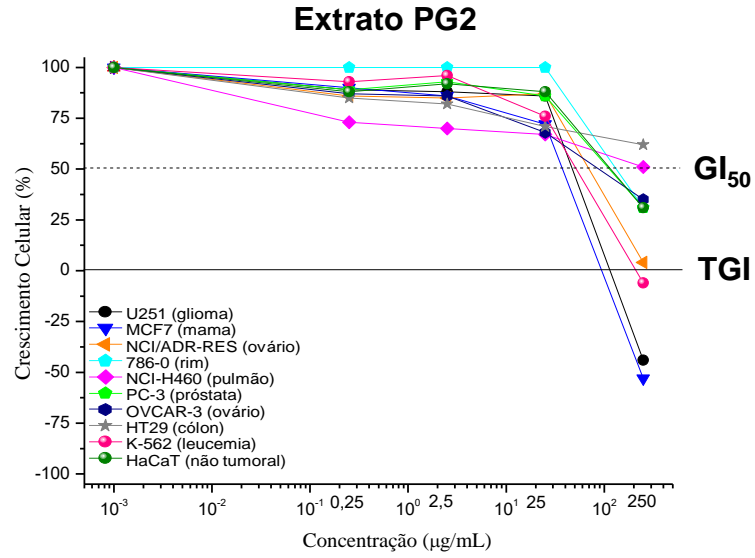


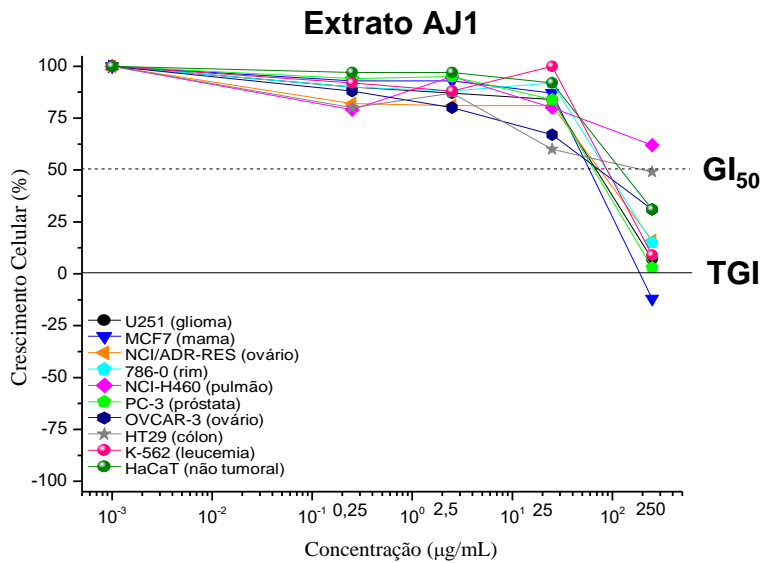
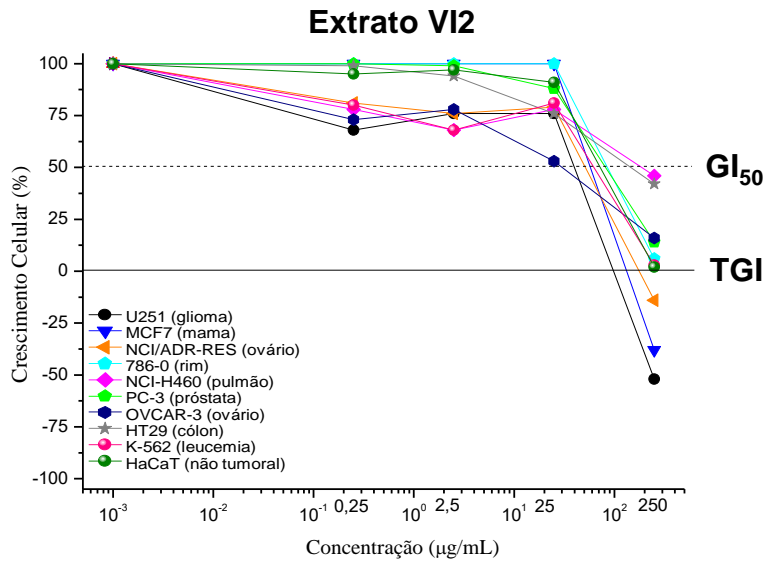
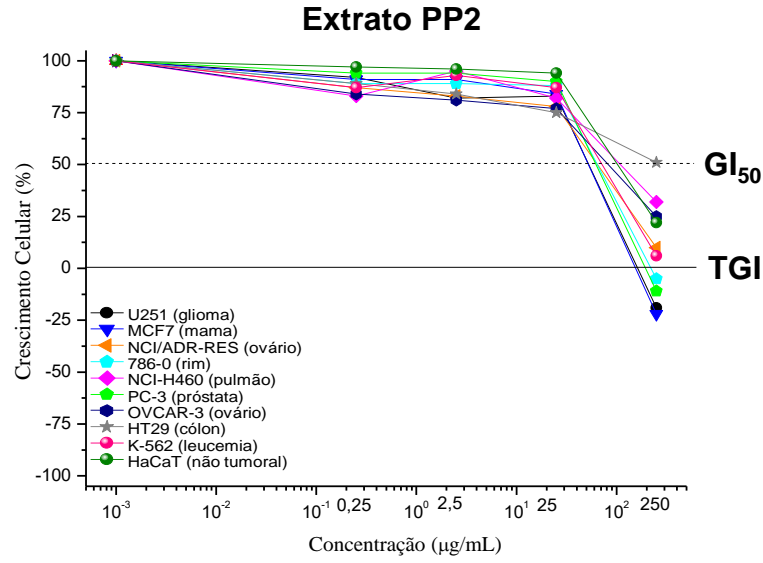


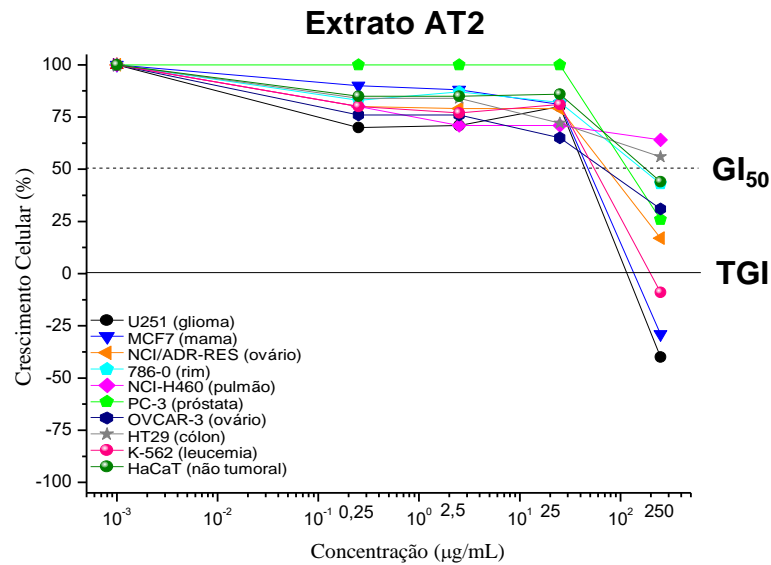
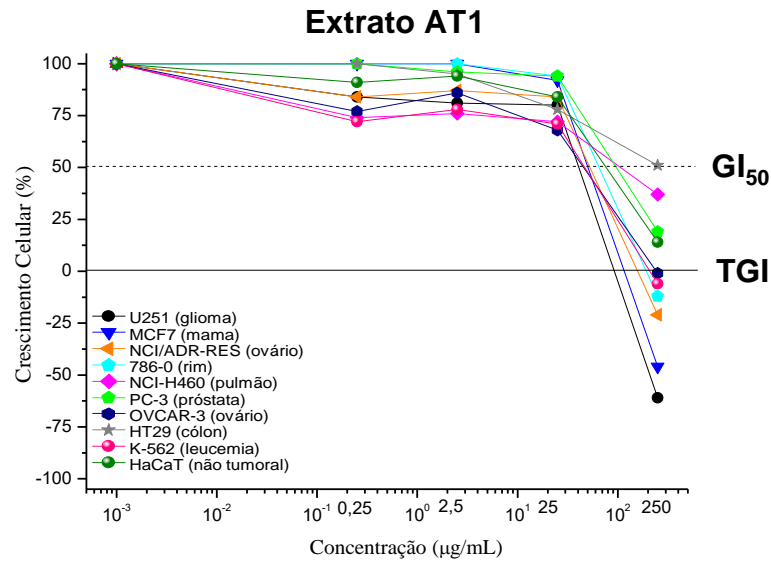
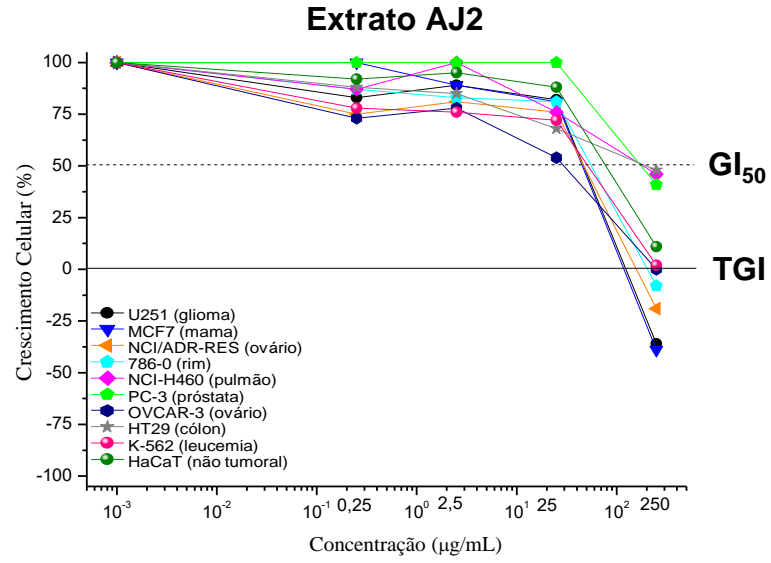


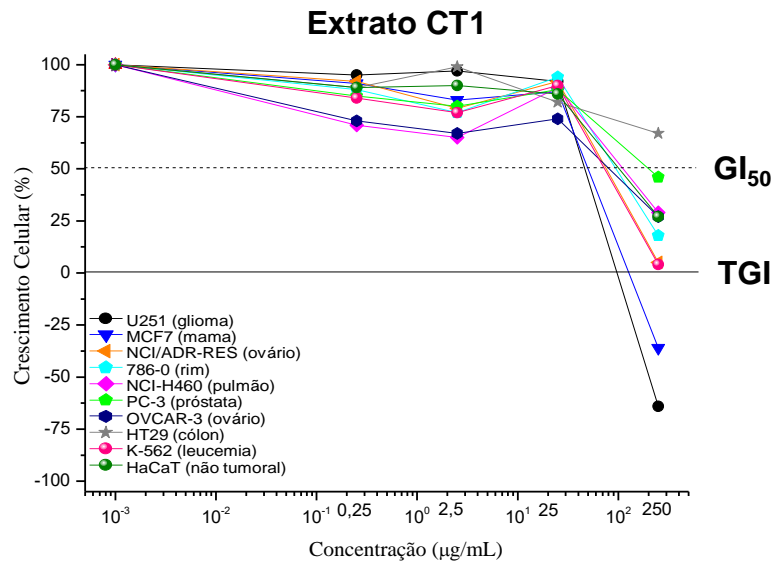
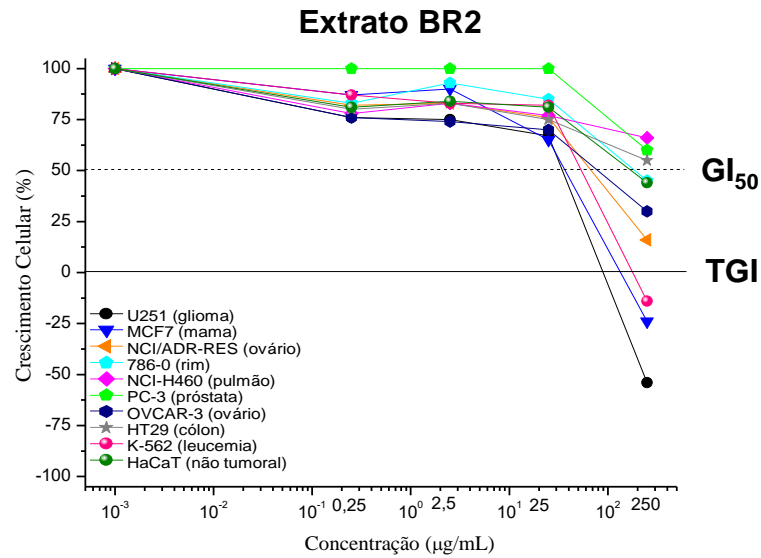
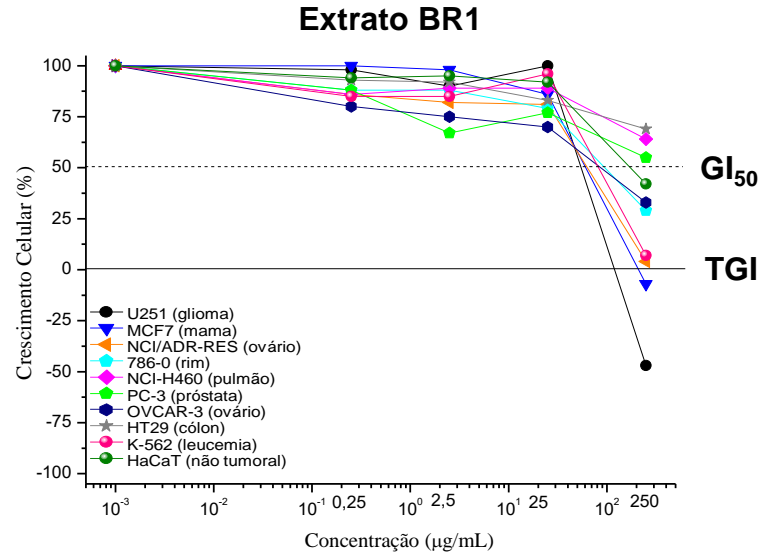


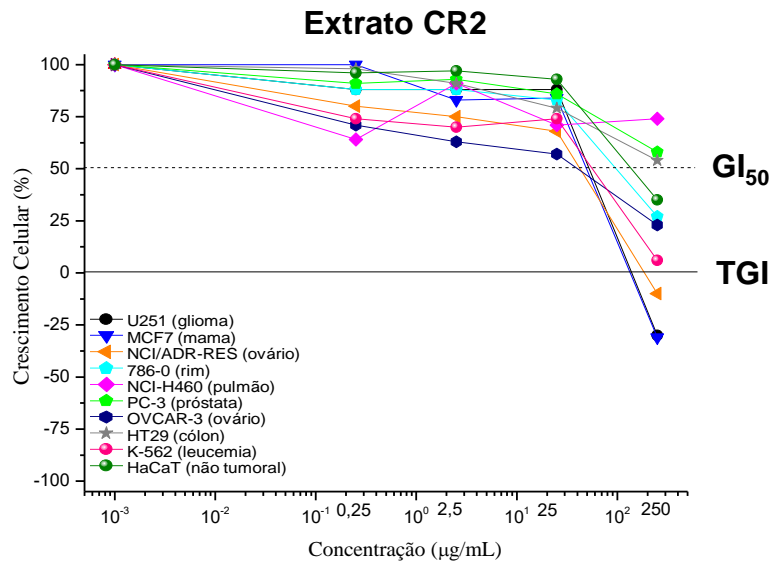
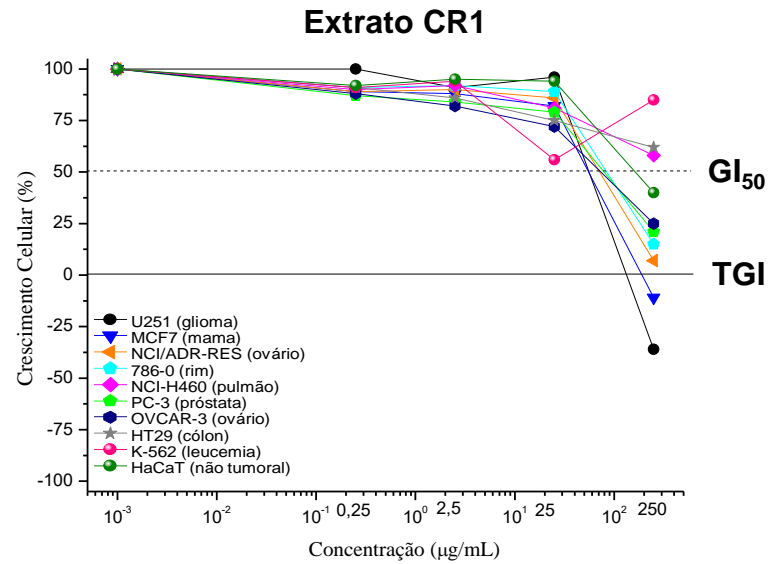
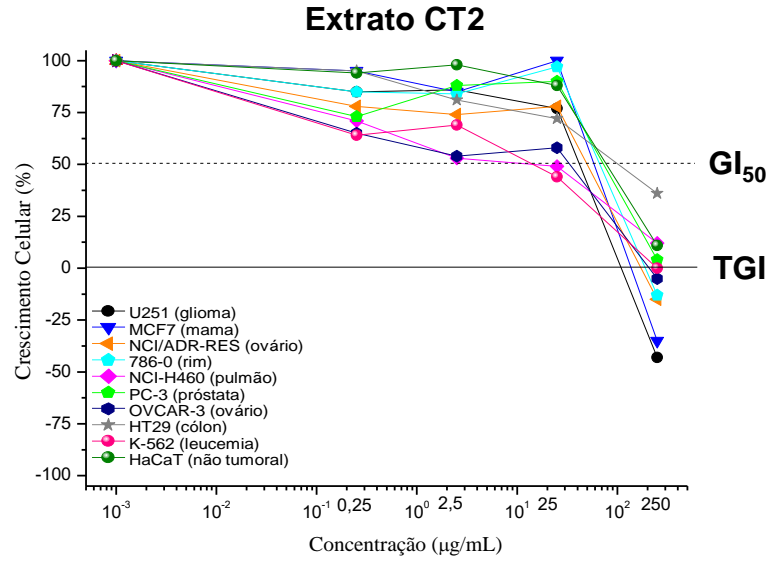


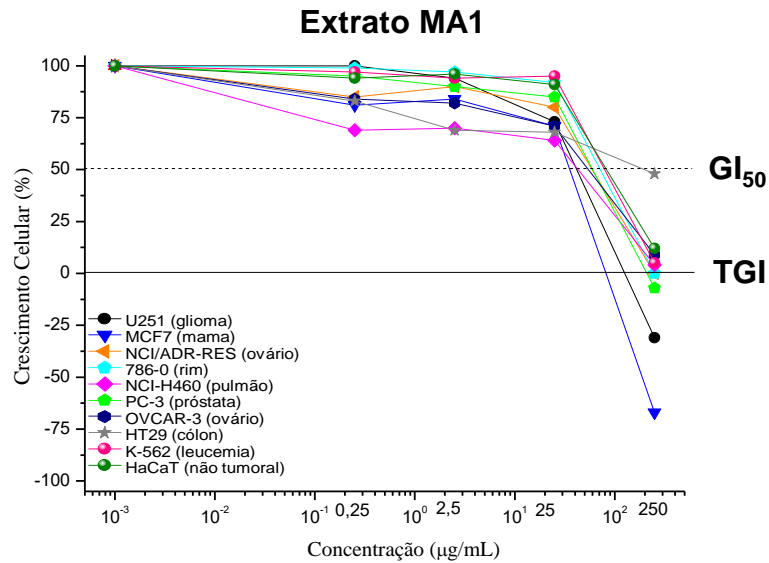
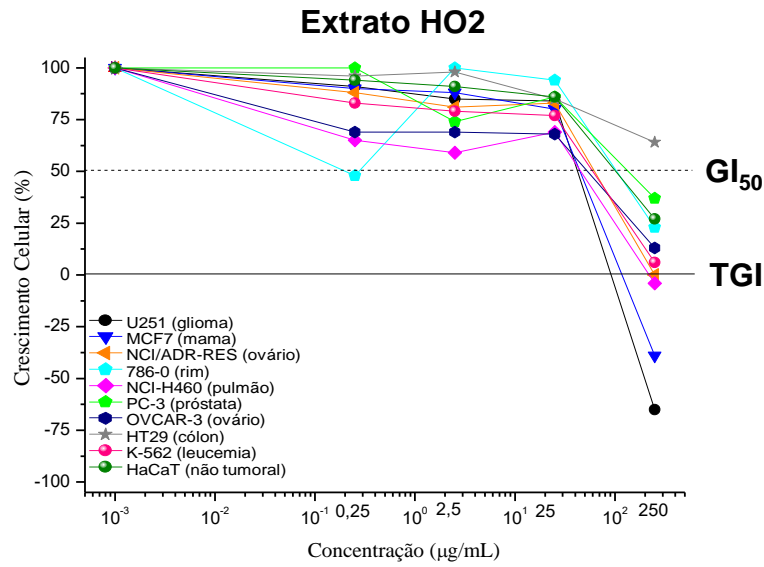
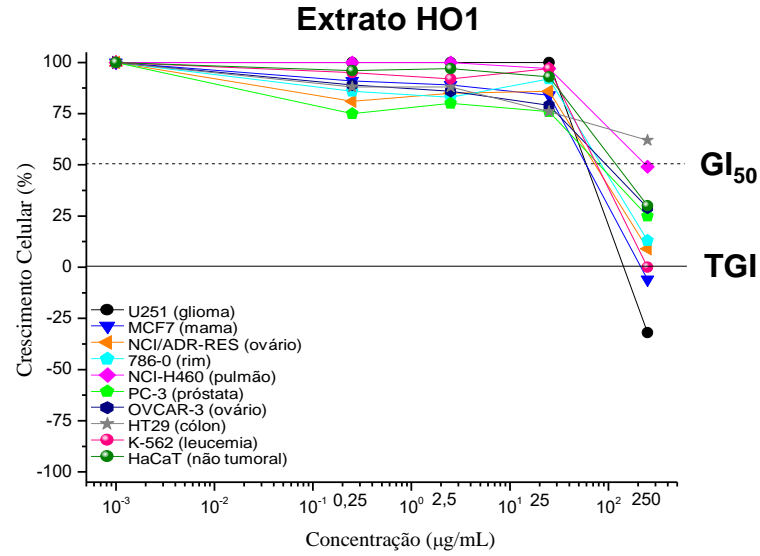


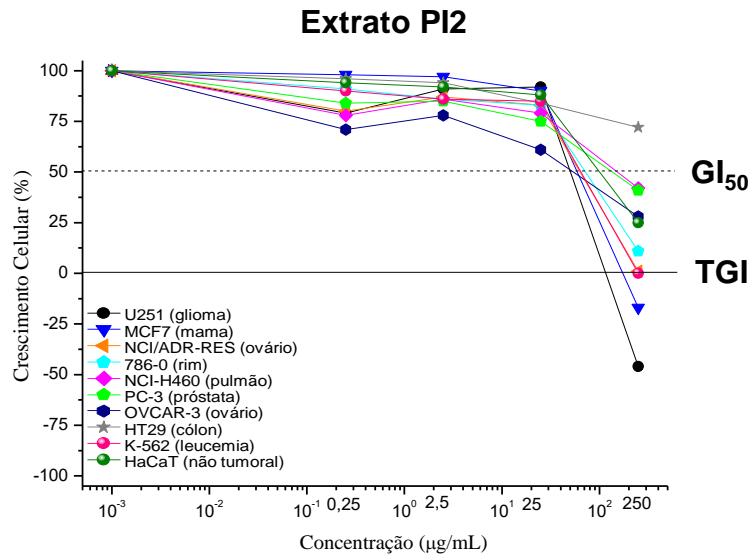
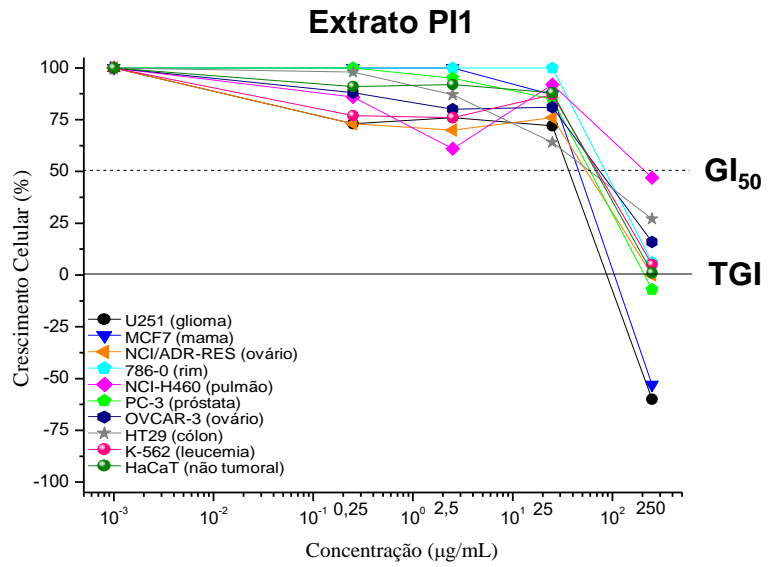
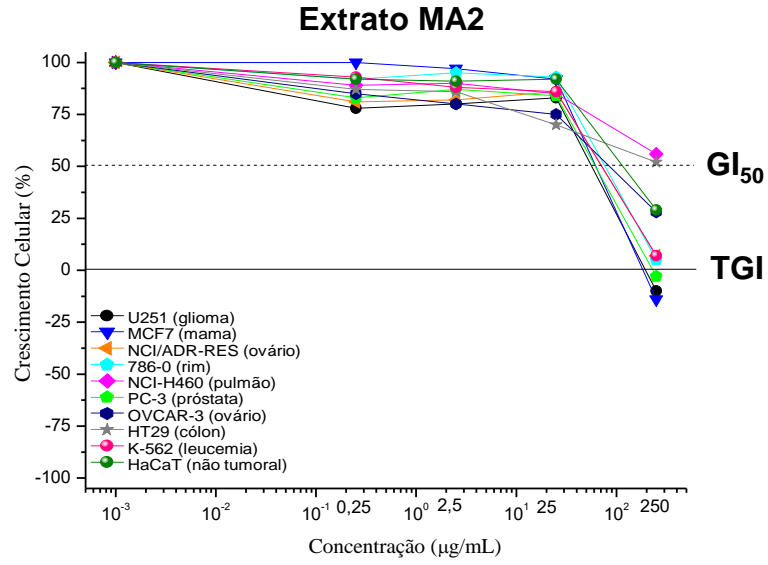


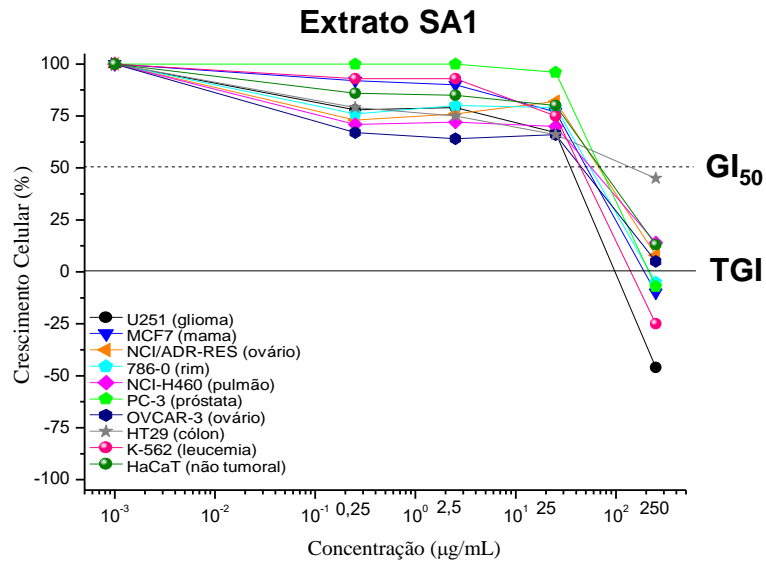
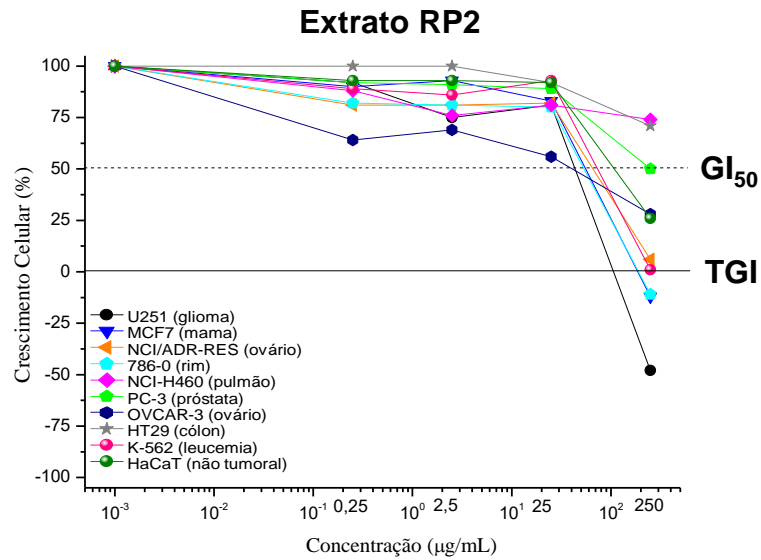
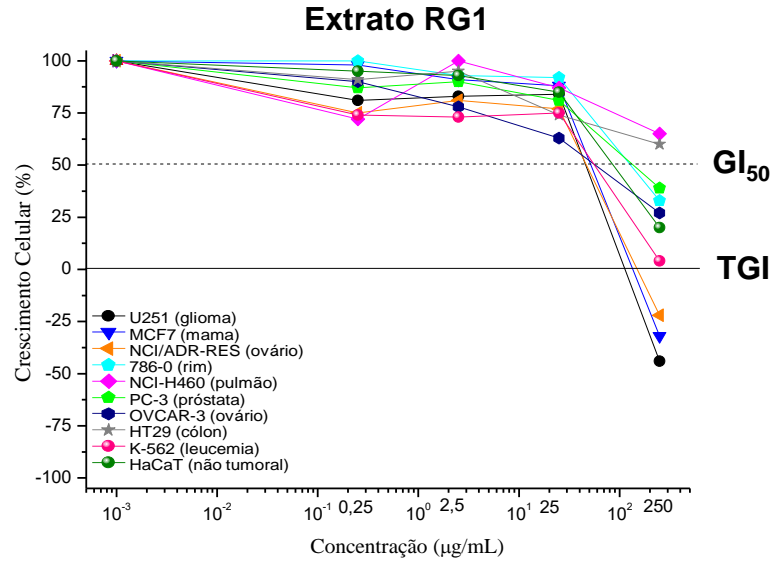


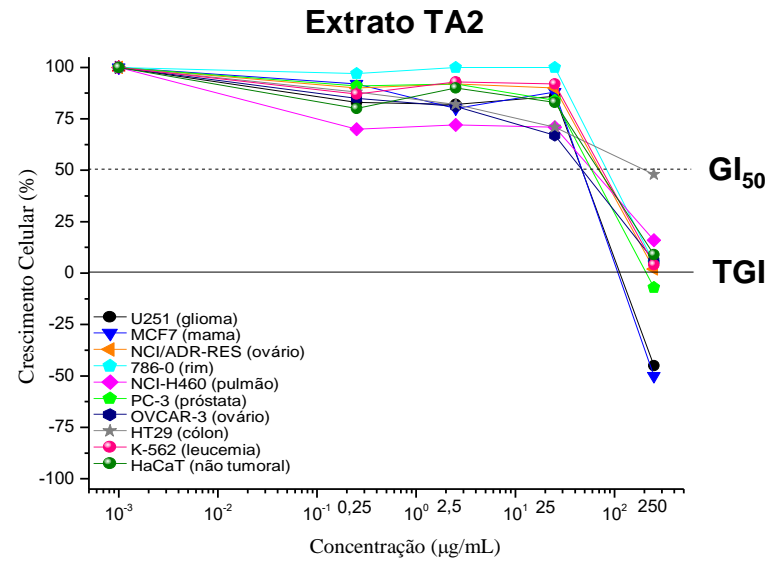
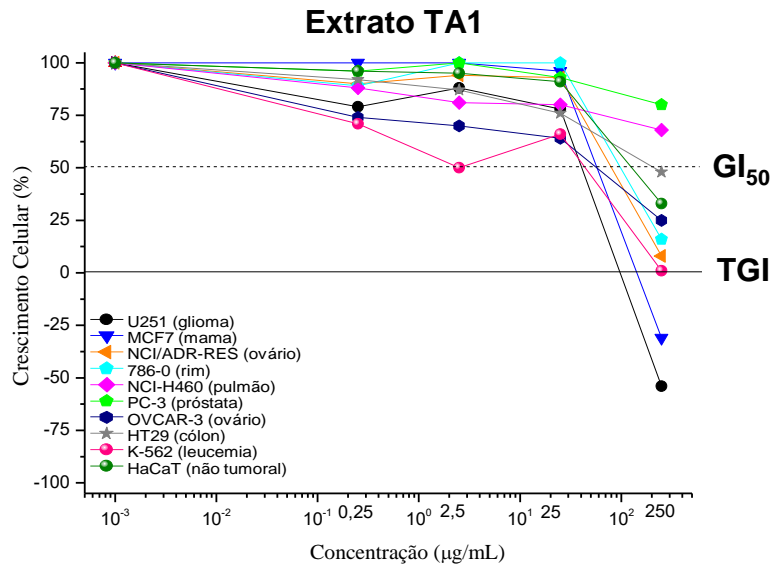
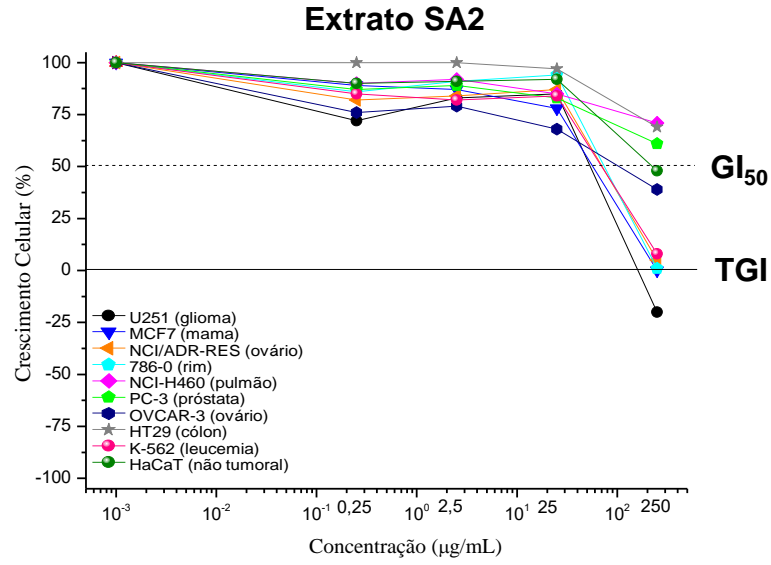


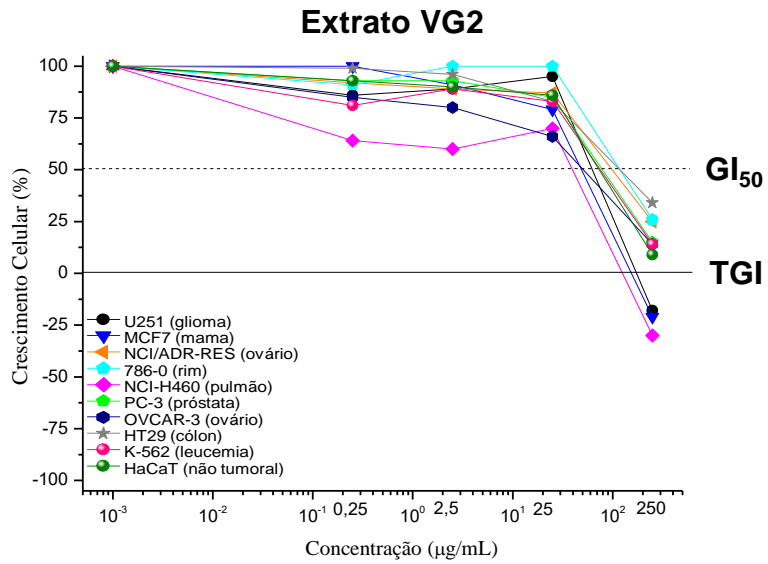
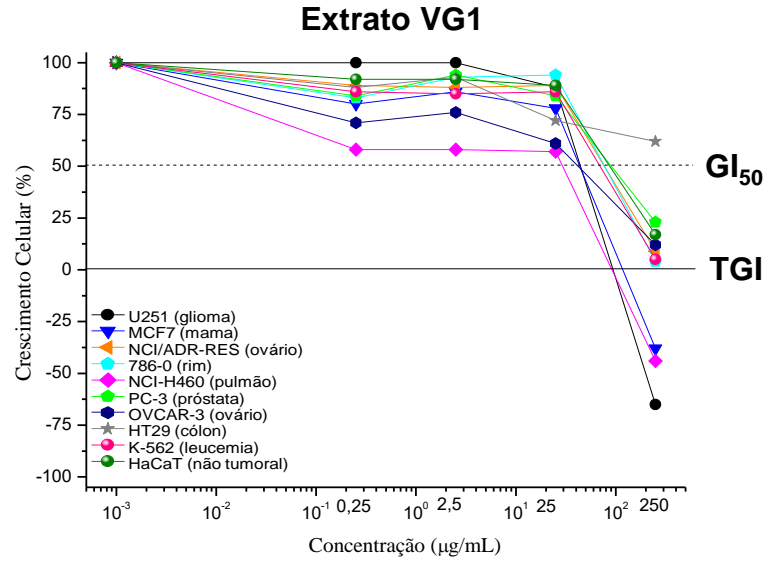












ANEXO 1



M.CAR.SNE.Nº 305/2014

Brasília, 25 de abril de 2014

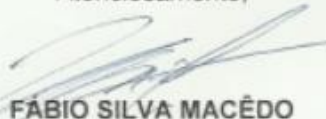
À Dra.
Nádia Eligia Nunes Pinto Paracampo
Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental

Assunto: **Concessão de autorização de acesso ao patrimônio genético para fins de Pesquisa Científica – Processo nº 02001.002715/2014-26**

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Padrão de identidade e qualidade de extrato de ajuru (*Chrysobalanus icaco* Lin.)**" foi incluído na Autorização Especial de Acesso e de Remessa da Embrapa para fins de Pesquisa Científica junto ao IBAMA (nº 002/2008). Em outras palavras, a execução do referido projeto está devidamente autorizada de acordo com a legislação vigente. Encaminhamos, em anexo, para seu arquivo, cópia do Ofício nº 02001.003225/2014-47 CGAUF/IBAMA de 07 de abril de 2014, bem como cópia da Autorização Especial de Acesso e de Remessa da Embrapa para fins de Pesquisa Científica junto ao IBAMA (nº 002/2008).

Ao preencher o formulário para o pedido de autorização, V.Sa. indicou que as subamostras seriam depositadas no "**Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental**", que é credenciado como fiel depositário junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN. Lembramos, portanto, que o depósito das subamostras na coleção indicada deve ser realizado o quanto antes visando o cumprimento dessa obrigação. Após a realização do depósito, solicitamos o envio, à CAR/SNE, de uma via original da declaração de depósito emitida pelo curador para que seja providenciado o encaminhamento ao IBAMA.

Atenciosamente,



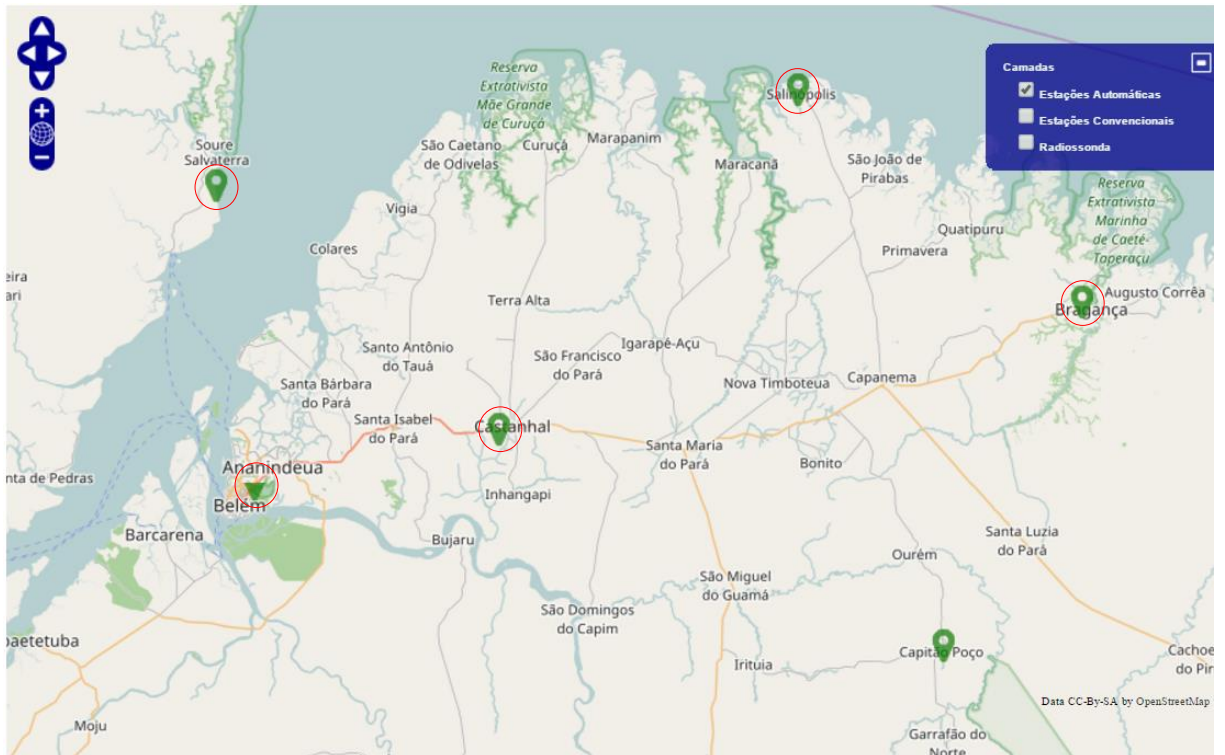
FÁBIO SILVA MACÊDO

Coordenador Substituto de Assuntos Regulatórios
Secretaria de Negócios - SNE

ANEXO 2

Dados de precipitação pluviométrica de 2014 registrados por cinco estações automáticas do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizadas em área de coleta de *C. icaco*: Belém, Bragança, Castanhal, Salinópolis e Soure.

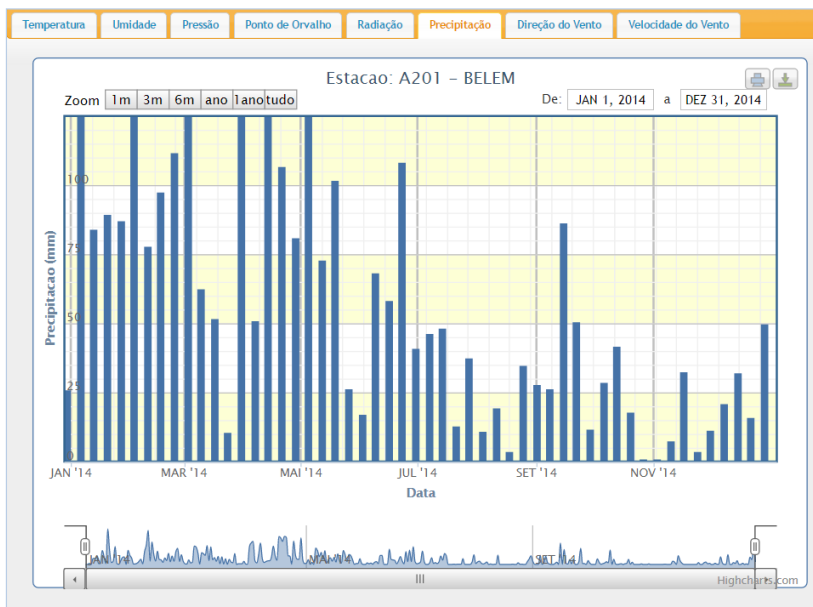
Estações automáticas do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizadas em área de coleta de *C. icaco*.



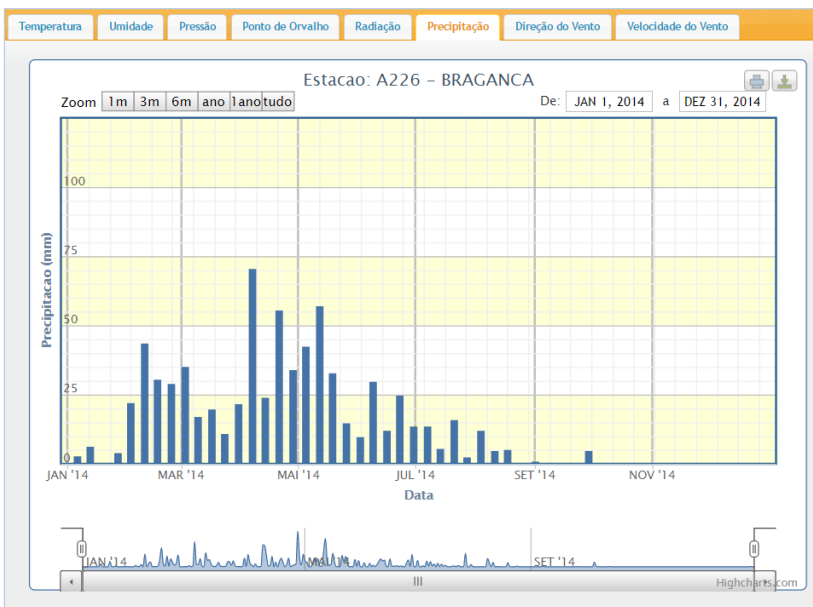
Fonte: Adaptada de imagem disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/mapaEstacoes>.

Dados de precipitação de 2014 registrados pela estação automática do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET):

Belém

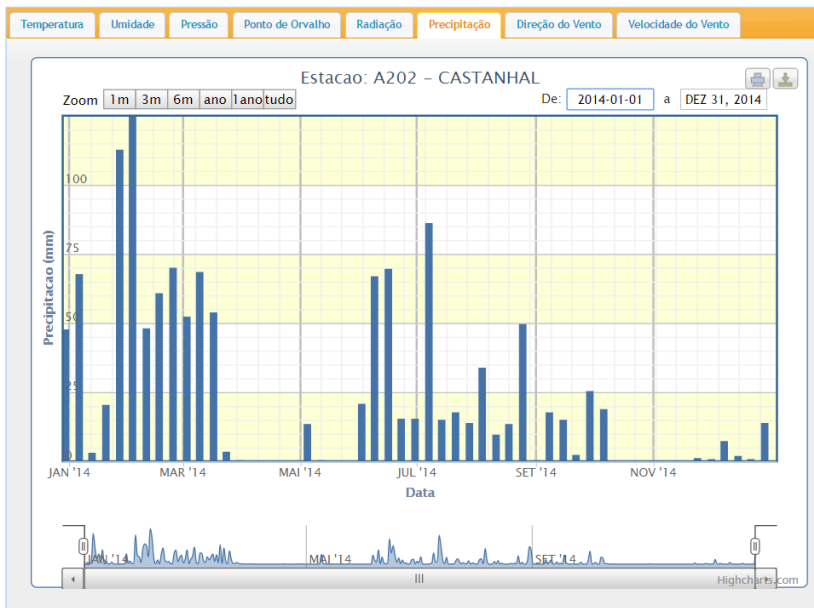


Bragança

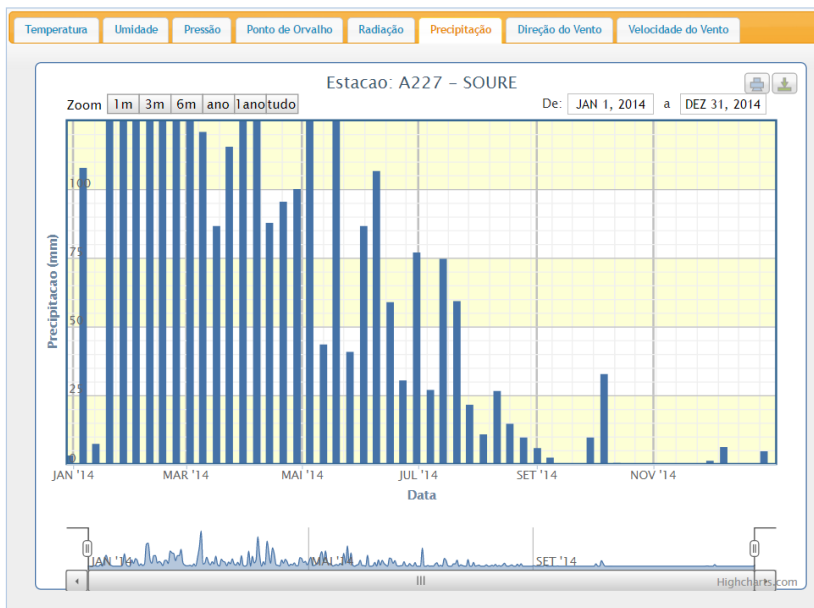


Fonte: Disponível em: http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf.

Castanhal



Soure



Fonte: Disponível em: http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf.

ANEXO 3

Embrapa**Amazônia Oriental****DECLARAÇÃO**

Eu, Orivan Maria Marques Teixeira, analista da Embrapa Amazônia Oriental, matrícula 291.369, declaro para todos os fins que concordo com a inclusão dos resultados de fertilidade de solo e tecido foliar referentes às amostras de *Chrysobalanus icaco* L. na tese de doutorado da pesquisadora Nádia Eligia Nunes Pinto Paracampo. Afirmando que este trabalho foi realizado em colaboração com a referida pesquisadora e todas as análises foram desenvolvidas no Laboratório de Solos da Embrapa Amazônia Oriental.

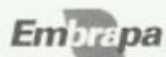
Belém-PA, 18 de janeiro de 2017.

Orivan Maria Marques Teixeira
Químico Responsável
CPF: 88199014



Orivan Maria Marques Teixeira
Analista A
RG: 1832137

ANEXO 4



Amazônia Oriental

DECLARAÇÃO

Eu, Maria do Socorro Padilha de Oliveira, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, matrícula 245409, declaro para todos os fins que concordo com a inclusão dos resultados referentes à variabilidade e divergência genética de *Chrysobalanus icaco* L. na tese de doutorado da pesquisadora Nádia Eligia Nunes Pinto Paracampo. Afirmando que este trabalho foi realizado em colaboração com a referida pesquisadora e todas as análises foram desenvolvidas no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental.

Belém-PA, 18 de janeiro de 2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Padilha", written over a horizontal line.

Maria do Socorro Padilha de Oliveira
Pesquisadora A
RG: 2395811/SSP-PA

ANEXO 5



DECLARAÇÃO

Eu, Mary Ann Foglio, Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, matrícula 308462, declaro para todos os fins que concordo com a inclusão dos resultados referentes à avaliação antiproliferativa de extratos de *Chrysobalanus icaco* L. na tese de doutorado da aluna do Instituto de Química/Unicamp Nádia Elígia Nunes Pinto Paracampo, RA 144822. Afirmo que este trabalho foi realizado em colaboração com a referida aluna e todas as análises foram desenvolvidas na Divisão de Farmacologia & Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/Unicamp, com supervisão da Pesquisadora Dra. Ana Lucia T.G.Ruiz.

Campina-SP, 03 de abril de 2017.

Mary Ann Foglio
Prof^a. Titular FCF-UNICAMP
RNE: W132904z