



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Departamento de Produtos Naturais e Alimentos
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas



PALMEIRAS CARSAÚRA.
Gravure de Bocher, d'après une photographie.

Rio de Janeiro
Junho de 2004



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Departamento de Produtos Naturais e Alimentos
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas

Copernicia cerifera Mart.: Aspectos Químicos e
Farmacológicos de uma Palmeira Brasileira

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira _____

Profa. Dra. Janayna Albuquerque dos Santos _____

Profa. Dra. Elis Cristina Araújo Eleuthério _____

SUPLENTE:

Prof. Dr. Hélio de Mattos Alves _____

Verônica Pinto Rodrigues

Tese apresentada como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, junto à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro
Junho de 2004

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Professor Dr. Fábio de Sousa Menezes, do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ficha Catalográfica

RODRIGUES, Verônica Pinto

Copernicia cerifera Mart.: Aspectos Químicos e Farmacológicos de uma Palmeira Brasileira

Rio de Janeiro: UFRJ, FF – DPNA, 2004

XXVI, 129p

Tese: Mestre em Ciências Farmacêuticas/Faculdade de Farmácia

Bibliografia: p. 114-123

PALAVRAS-CHAVE: 1. *Copernicia cerifera* Mart.; 2. Palmeiras; 3. Fitoquímica; 4. Atividade Farmacológica; 5. Palmae

- I. Universidade Federal do Rio de Janeiro
- II. Título

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis
e pessoas incomparáveis."

FERNANDO PESSOA

Agradecimentos

A Deus, pelo amor e pela força em todos os momentos dessa minha caminhada, desde o início até o fim deste trabalho.

À minha mãe Suedamar, pelo amor, compreensão e paciência, não só nos momentos de vitória, mas também naqueles mais difíceis.

Ao meu namorado, e depois noivo, Kássio, com quem sempre dividi todas as minhas vitórias e dificuldades, certezas e dúvidas, forças e fraquezas.

Aos meus avós Celma e João, que com seu amor e dedicação me fizeram parte do que eu sou hoje.

Ao meu irmão e amigo Sandro, com quem sempre pude contar com a ajuda e carinho essenciais à continuação do meu trabalho, e ao meu sobrinho Matheus, que transformou alguns dos meus dias em dias mais felizes, com seu sorriso e afeto.

À amiga Magdalena, pela amizade, cumplicidade e palavras, sempre nos momentos mais difíceis. Algumas palavras foram muito úteis para a continuidade deste trabalho. Mesmo um começo difícil pode ter um lindo desfecho.

À amiga Michele, pelas conversas descontraídas e companheirismo nas atividades do mestrado. E a certeza de que ganhei mais uma amiga durante essa caminhada.

À Dulce, ex-secretária do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que sempre dedicou sua atenção e seu carinho aos alunos deste curso.

Ao laboratório Herbarium, pela doação do extrato lipofílico de *Serenoa repens*.

Aos amigos da família Laquel: Andréa, Cristiane, Deborah Falcão, Edlaine, Sidnei, Débora Malta, Fábio e Cássio por sempre se mostrem prestativos durante as

minhas atividades, e por transformarem o laboratório em um lugar agradável de se estar.

Em especial à amiga Ana Carolina, com quem sempre pude contar para o desenvolvimento das atividades de bancada, e que certamente acreditou no trabalho por nós realizado.

Ao prof. Dr. Davyson de Lima Moreira, por ter coletado os frutos, pelas lindíssimas fotos da Carnaúba e por toda ajuda dispensada.

À prof.^a Dra. Patrícia Dias Fernandes, à prof.^a Dra. Maria Eline Matheus e à Gláucia de Melo Reis, pela realização dos testes de atividade analgésica e antiinflamatória.

À prof.^a Dra. Maria Cristina S. Lourenço e ao Dr. Ivan Neves Junior, pela realização dos testes antimicrobianos.

À prof.^a Dra. Elis Cristina Eleuthério, pela realização dos testes com *Saccharomyces cerevisiae*.

À prof.^a Dra. Carla Holandino, que me abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse dar continuidade aos meus trabalhos. Convivendo com ela por alguns meses, aprendi não só a respeitá-la não só como profissional, mas também como pessoa.

À prof.^a Dra. Suzana Guimarães Leitão, pelo apoio e atenção em alguns momentos.

E, finalmente, agradeço ao meu orientador prof. Dr. Fábio de Sousa Menezes, não só pelo incentivo, mas também pela persistência. Agradeço por ter compartilhado comigo suas experiências profissionais, seus conhecimentos e por ter acreditado que este trabalho daria certo.

Sumário

Índice de Figuras	IX
Índice de Esquemas	XI
Índice de Cromatogramas	XII
Índice de Espectros	XIII
Índice de Gráficos	XVI
Índice de Tabelas	XVII
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XIX
Estruturas de Substâncias Identificadas em <i>Copernicia cerifera</i>	XX
Resumo	XXIII
Abstract	XXV
Introdução	1
Justificativa	26
Objetivos Gerais	27
Objetivos Específicos	27
Parte Experimental	28
Resultados e Discussão	56
Conclusões	117
Referências Bibliográficas	120

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>Copernicia cerifera</i> – espécie com importância econômica.....	2
Figura 2 - Mapa da localização do Estado do Piauí no Nordeste brasileiro, com suas divisas e sua capital, Teresina.....	4
Figura 3 - Rio Parnaíba – Teresina, PI.....	6
Figura 4 - Cidade de Teresina, PI.....	7
Figura 5 - Carnaubeiras.....	8
Figura 6 - Aspecto do tronco de <i>Copernicia cerifera</i>	9
Figura 7 - Frutos da Carnaúba.....	10
Figura 8 - Folhas secas e cera; folhas de carnaúba.....	11
Figura 9 - Artesanatos utilizando palha de carnaúba: chapéu e jogo americano.....	12
Figura 10 - Ceras de carnaúba.....	14
Figura 11 - Esquema simplificado da patogenia da HPB.....	19
Figura 12 - Coluna de gel de sílica 60 utilizada na separação do extrato hexânico total de folhas de <i>C.cerifera</i>	33
Figura 13 – Estrutura química do DPPH.....	46
Figura 14 - Exemplo de perfil de fragmentação de um hidrocarboneto de cadeia longa.....	90
Figura 15 - Rearranjo de McLafferty em ácidos carboxílicos	91
Figura 16 - Perfil de fragmentação do ácido hexadecanóico.....	92

Figura 17 - Rearranjo de McLafferty em ésteres de ácidos carboxílicos.....	93
Figura 18 - Íons resultantes da ligação α em relação o grupo C=O.....	93
Figura 19 - Fragmentação com perda de M-31 e M-59.....	95

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Extração e metilação de óleos fixos do mesocarpo dos frutos de <i>C. cerifera</i>	32
Esquema 2 - Fluxograma da purificação do extrato hexânico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i> , amostras enviadas para análise por CG-EM e identificação das substâncias presentes nas junções analisadas.....	38
Esquema 3 - Fluxograma da purificação da fração em acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i> , amostras enviadas para análise por CG-EM e identificação das substâncias presentes nas junções analisadas.....	42
Esquema 4 - Identificação por CG- EM dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo de <i>Serenoa repens</i>	44

Índice de Cromatogramas

Cromatograma 1 - Cromatograma da junção EH 1-24, obtido por CG-EM.....	58
Cromatograma 2 - Cromatograma da junção EH 25-40, obtido por CG-EM.....	63
Cromatograma 3 - Cromatograma da junção EH 46-63, obtido por CG-EM.....	65
Cromatograma 4 - Cromatograma da junção EH 71-79, obtido por CG-EM.....	68
Cromatograma 5 - Cromatograma da fração 15 da junção EH 80-107, obtido por CG-EM.....	71
Cromatograma 6 - Cromatograma da junção FAE 1-20, obtido por CG-EM.....	75
Cromatograma 7 - Cromatograma da junção FAE 21-24, obtido por CG-EM.....	77
Cromatograma 8 - Cromatograma da junção FAE 28-35, obtido por CG-EM.....	79
Cromatograma 9 – Cromatograma de óleos fixos obtido do mesocarpo dos frutos de <i>C. cerifera</i> , obtido em coluna DB-1 do cromatógrafo HP 5890 SII.....	83
Cromatograma 10 - Cromatograma do óleo comercial de <i>Serenoa repens</i> do laboratório Herbarium, obtido em coluna DB-1 do cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas QP5000 Shimadzu.....	85

Índice de Espectros

Espectro 1 - Espectro de massas do alfa-bisabolol.....	59
Espectro 2 - Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico.....	59
Espectro 3 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9.....	59
Espectro 4 - Espectro de massas do tricosano.....	60
Espectro 5 - Espectro de massas do pentacosano.....	60
Espectro 6 - Espectro de massas do heptacosano.....	61
Espectro 7 - Espectro de massas do nonadeceno.....	61
Espectro 8 - Espectro de massas do octacosano.....	62
Espectro 9 - Espectro de massas do nonacosano.....	62
Espectro 10 - Espectro de massas éster metílico do ácido hexadecanóico.....	64
Espectro 11 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico.....	64
Espectro 12 - Espectro de massas do alfa-bisabolol.....	66
Espectro 13 - Espectro de massas éster metílico do ácido hexadecanóico.....	66
Espectro 14 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9.....	67
Espectro 15 - Espectro de massas do untriacontano.....	67
Espectro 16 - Espectro de massas do 6,10,14-trimetil-pentadecanona-2.....	69
Espectro 17 - Espectro de massas do 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol.....	69
Espectro 18 - Espectro de massas do octadecanóico.....	70
Espectro 19 - Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico.....	72

Espectro 20 - Espectro de massas do éster metílico do ácido heptadecanóico.....	72
Espectro 21 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecadienóico-9,12.....	72
Espectro 22 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9.....	73
Espectro 23 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico.....	73
Espectro 24 - Espectro de massas do éster metílico do ácido tetracosanóico.....	73
Espectro 25 - Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico.....	76
Espectro 26 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico.....	76
Espectro 27 - Espectro de massas do alfa-bisabolol.....	78
Espectro 28 - Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico.....	78
Espectro 29 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9.....	78
Espectro 30 - Espectro de massas do éster metílico do ácido 4-metóxi-benzóico.....	80
Espectro 31 - Espectro de massas do éster metílico do ácido 4-hidróxi-benzóico.....	80
Espectro 32 - Espectro de massas do éster dimetílico do ácido nonanedióico (ácido azeláico)	80
Espectro 33 - Espectro de massas do éster metílico do ácido 3,4-dimetóxi-benzóico.....	81
Espectro 34 - Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-(4-metóxi-fenil) propenóico-2.....	81
Espectro 35 - Espectro de massas do éster metílico do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico.....	81
Espectro 36 - Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-(3,4- dimetoxifenil)- propenóico-2.....	82
Espectro 37 - Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico.....	82
Espectro 38 - Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico (ác. palmítico)	84

Espectro 39 - Espectro de massas do éster metílico do octadecanóico (ác. esteárico).....	84
Espectro 40 - Espectro de massas do éster metílico do ácido dodecanóico (ác. láurico)....	86
Espectro 41 - Espectro de massas do éster metílico do ácido tetradecanóico (ác. mirístico)	86
Espectro 42 - Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico (ác. palmítico)	87
Espectro 43 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico (ác. oleico)..	87
Espectro 44 - Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico (ác. esteárico)	88

Índice de Gráficos

- Gráfico 1 - Percentual médio da atividade antioxidante (% AAOM) *versus* concentração das amostras dos extratos testados de *C. cerifera*, *G. biloba* e rutina. Representação por linhas.....98
- Gráfico 2 - Percentual médio da atividade antioxidante (% AAOM) *versus* concentração das amostras dos extratos testados de *C. cerifera*, *G. biloba* e rutina. Representação por barras.....98
- Gráfico 3 - Atividade antioxidante, expresso em percentual de sobrevivência, dos extratos etanólicos de frutos e folhas de *C. cerifera*.....101
- Gráfico 4 - Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste da placa quente.....104
- Gráfico 5 - Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste de retirada da cauda.....106
- Gráfico 6 - Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....107
- Gráfico 7 - Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste da Formalina Fase I.....109
- Gráfico 8 - Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste da Formalina Fase II.....110
- Gráfico 9 - Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....112
- Gráfico 10 - Avaliação da atividade antimicrobiana (AAM) dos extratos de *C. cerifera*. Percentuais de inibição de crescimento microbiano após incubação com os extratos hexânico (EHFR) e etanólico (EEFR) de frutos e hexânico de folhas (EHFO).....114

Índice de Tabelas

Tabela 1- Especificações de 4 tipos de ceras disponíveis comercialmente de <i>C. cerifera</i>	16
Tabela 2- Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 1-24 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	58
Tabela 3 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 25-40 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	63
Tabela 4 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 46-63 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	65
Tabela 5 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 71-79-63 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	68
Tabela 6 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na fração 15 da junção EH 80-107 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	71
Tabela 7 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção FAE 1-20 da coluna de gel de sílica da fração de acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	75
Tabela 8 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção FAE 21-24 da coluna de gel de sílica da fração de acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	77
Tabela 9 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção FAE 28-35 da coluna de gel de sílica da fração de acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de <i>C. cerifera</i>	79
Tabela 10 - Comparação entre a composição de ácidos graxos do óleo comercial de <i>Serenoa repens</i> e aquela encontrada nas folhas de <i>C. cerifera</i>	89

- Tabela 11 - Percentual médio das atividades antioxidantes (% AAOM) dos extratos etanólicos de folhas (EEFO), frutos (EEFR) e cascas (EECA) de *C. cerifera*, solução etanólica de extrato de *G. biloba* EGb 761 (EEGB) e do padrão de rutina e seus valores de CE₅₀.....97
- Tabela 12 - Percentuais das sobrevivência das células de *Saccharomyces cerevisiae* relacionados à atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folhas (EEFO) e frutos de carnaúba (EEFR)101
- Tabela 13 - Efeito dos extratos EBFO, EEFO, EHFO e EHFR de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação (em segundos) no teste da placa quente. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 5).....104
- Tabela 14 - Efeito dos extratos EBFO, EEFO, EHFO e EHFR de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de retirada da cauda (em segundos) no e valores de IARC. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 5).....105
- Tabela 15- Efeito dos extratos de *C. cerifera* na dose de 100 mg/kg sobre o tempo de reação (em segundos) no teste das contorções abdominais. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n=7).107
- Tabela 16 - Efeito dos extratos de *C. cerifera* na dose de 100 mg/kg sobre o tempo de reação (em segundos) no teste da formalina Fases I e II. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n=5).....109
- Tabela 17 - Efeito dos extratos de *C. cerifera* na dose de 100 mg/kg sobre edema de orelha em camundongos, na dose de 100 mg/kg de extrato. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n=5)112
- Tabela 18 - Avaliação da inibição do crescimento microbiano das cepas incubadas com os extratos hexânico (EHFR) e etanólico (EEFR) de frutos e hexânico de folhas (EHFO) para o teste de microdiluição em caldo.....113

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABS_A – Absorbância da amostra

ABS_B – Absorbância do branco

ANOVA – Análise de variância

ATCC – *American Type Culture Collection*

BF_3 – Trifluoreto de boro

CC – Coluna cromatográfica

CE_{50} – Concentração efetiva para 50% de atividade

CG – Cromatografia com fase gasosa

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazila

EM – Espectrometria de massas

IE – Impacto de elétrons

HPB – Hiperplasia prostática benigna

m/z – Relação massa/carga

M^+ – Íon molecular

MIC – *Minimal inhibitory concentration*

PBS – Phosphate-buffered saline

PFK – Per-flúor querosene

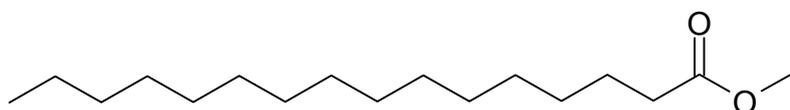
P.M. – Peso Molecular

TR – Tempo de retenção

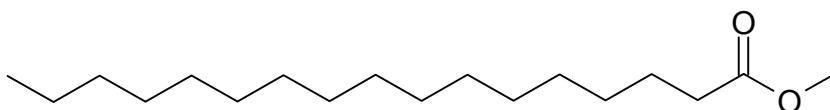
UFC – Unidade formadora de colônia

YPD - Yeast extract peptone glucose

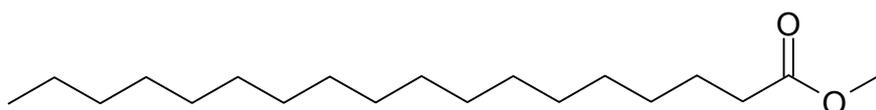
Estruturas das Substâncias Identificadas em *Copernicia cerifera*



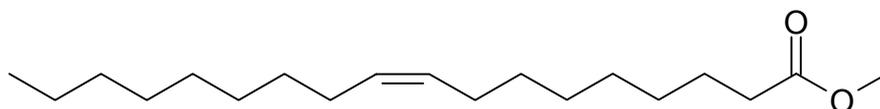
I - Ácido hexadecanóico (ácido palmítico)



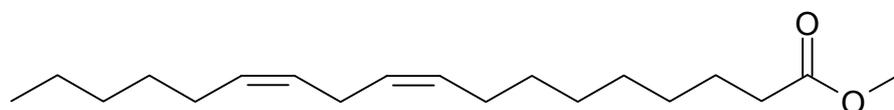
II - Ácido heptadecanóico



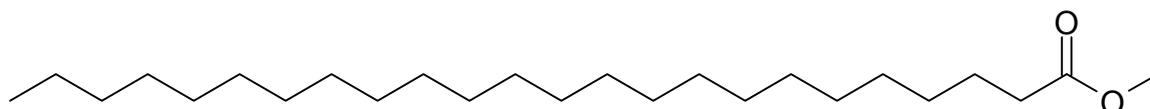
III - Ácido octadecanóico (ácido esteárico)



IV - Ácido octadecenóico-9 (ácido oleico)

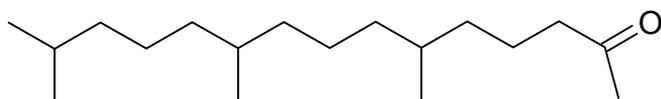


V - Ácido octadecenedienóico-9-12 (ácido linoleico)

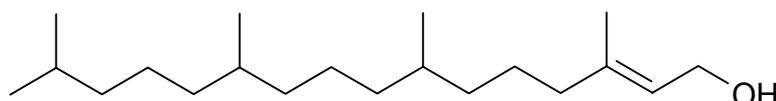


VI - Ácido tetracosanóico

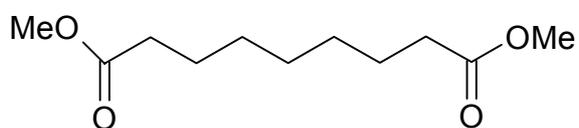
Estruturas das Substâncias Identificadas em *Copernicia cerifera*



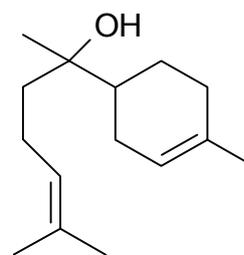
VII - 6,10,14-trimetil-pentadecanona-2



VIII - 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol

IX – Ácido nonanedióico
(Ácido azelaico)

XI – nonadeceno

X – *Alfa*-bisabolol

XII – tricosano



XIII – pentacosano



XIV – heptacosano



XV – octacosano

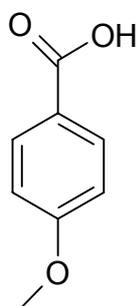


XVI – nonacosano

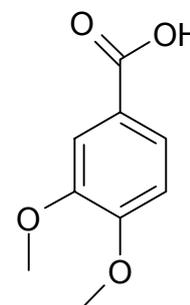


XVII – Untriacontano

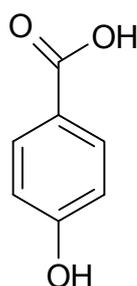
Estruturas das Substâncias Identificadas em *Copernicia cerifera*



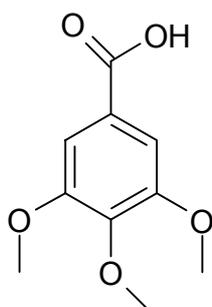
XVIII – Ácido 4-metóxi-benzóico



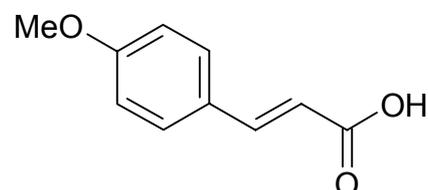
XX – Ácido 3,4 - dimetóxi-benzóico



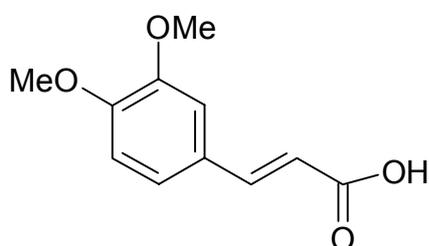
XIX – Ácido 4-hidróxi-benzóico



XXI – Ácido 3,4,5 - trimetóxi-benzóico



XXII – Ácido 3-(4-metóxi-fenil) propenóico-2



XXIII – Ácido 3-(3, 4-dimetóxi-fenil) propenóico-2

Resumo

Copernicia cerifera Mart., conhecida popularmente como carnaúba, é uma espécie genuinamente brasileira da família Palmae. Essa família compreende um total de cerca de 2500 a 3500 espécies. Essa espécie ocorre nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, muito abundante no estado do Piauí e no Pantanal Matogrossense.

A carnaúba possui grande importância sob o ponto de vista econômico para as populações das regiões de onde é nativa, pois dela quase tudo é comercializado, gerando renda não só para a população local através da venda de artesanato e produtos manufaturados, quanto também para grandes empresas que exploram sua cera.

No estudo fitoquímico das folhas da carnaúba, foram encontradas misturas de ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia longa, tanto na fração hexânica e de acetato de etila proveniente da partição do extrato etanólico bruto, quanto no próprio extrato hexânico bruto, além de um sesquiterpeno, um diterpeno, derivados do ácido benzóico e derivados aril-propanoídicos. Dos ácidos graxos de cadeia longa, somente dois desses, o ácido hexadecanóico (ou ácido palmítico) e o ácido octadecanóico (ou ácido esteárico) foram encontrados nos frutos de carnaúba a partir de técnica utilizada para a extração de óleos fixos.

Sobre as atividades farmacológicas, foram realizados estudos químicos e *in vivo* para avaliar as atividades antioxidantes, analgésicas, antiinflamatória e antimicrobiana de alguns dos extratos de *C. cerifera*.

Sobre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos *in vitro* através do teste químico com o radical livre DPPH, todos os extratos testados apresentaram resultado superior ao padrão do extrato do *Gingko biloba* e resultados comparáveis

com o padrão rotina, um flavonóide com atividade antioxidante já reconhecida. Para o teste *in vivo* utilizando células de *S. cerevisiae*, o extrato hexânico das folhas apresentou maior atividade, sendo o extrato padrão de *Gingko biloba* inativo neste teste.

Quanto à atividade analgésica, os extratos etanólico das folhas e hexânico dos frutos apresentaram resultados superiores aos demais extratos, tanto para o teste da placa quente, quanto para o teste de retirada da cauda. Neste último teste, o extrato etanólico de folhas apresentou resultado superior ao extrato hexânico dos frutos. No teste das contorções abdominais, todos os dois extratos testados apresentaram resultados compatíveis com aqueles observados para a indometacina.

Quanto à atividade analgésica e antiinflamatória, novamente o extrato etanólico das folhas apresentou o melhor resultado dentre todos os extratos testados, tanto no teste da formalina (nas fases I e II) quanto no teste do edema de orelha em camundongos.

Na avaliação da inibição do crescimento microbiano, os extratos apresentaram diferentes resultados em função da cepa testada. Para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (*beta*-lactamase negativa) o extrato etanólico dos frutos apresentou o melhor percentual de inibição de crescimento. Para o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (suscetível à oxacilina e penicilina) o extrato hexânico das folhas apresentou perfil de inibição de crescimento superior aos demais extratos.

Nenhum extrato evidenciou atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract

Copernicia cerifera Mart., known popularly as carnaúba, belongs to the Palmae family. This family encompasses between 2500 and 3500 species into about 236 genera. The studied species occurs in abundance in the North and Northeast regions of Brazil, mainly in the State of Piauí and Mato-Grosso in a region called Pantanal Matogrossense.

Carnaúba is very important by the economic point of view being used by populations where it is native for several facilities. The main industrial application is its use for the factories to extract the wax from leaves.

The phytochemical study of carnaúba leaves showed several long chain fatty acid mixtures in the hexanic and ethyl acetate partitions obtained from the crude ethanolic extract as well as in the crude hexanic extract besides one sesquiterpenoid, one diterpenoid, benzoic acid derivatives and arylpropane derivatives. Among all the long chain fatty acids identified in the leaves extracts, only the hexadecanoic acid (palmitic acid) and octadecanoic acid (stearic acid) have been found in the fruit hexanic extract.

The pharmacological point of view, several methodologies were assayed with carnaúba extracts: antioxidant activity (*in vitro* and *in vivo*), analgesic, anti-inflammatory and anti-microbian activities.

The antioxidant activity of all assayed extracts from carnaúba showed a very good activity by the DPPH methodology, being the results comparable to that found for the *Ginkgo biloba* standardized extract (EGb 761), with recognized antioxidant activity very used in several therapeutical protocols. Some extracts had an activity compared with that for rutin, a flavonoid with a very huge antioxidant activity, mainly

in the higher concentration. For the *in vivo* test, using the *Saccharomyces cerevisiae* eukariotic cell model, it was possible to see a good protection against oxidation by *tert*-butyl hydroperoxide for two extracts of carnaúba while the *Ginkgo biloba* extract has shown no activity.

Concerning the analgesic activity the best results were achieved for the crude ethanolic extracts of leaves and hexanic extract of fruits. Inhibition of writhing produced by acetic acid *i.p.* injection have shown an activity compared with that observed for the indometacin. Hot plate and tail-flick tests they were also the best being the crude ethanolic extract of leaves superior than the hexanic extract of fruits in the later test.

Anti-inflammatory activity tested, both by the formalin and ear oedema assays, showed the crude ethanolic extract of leaves as having the best results.

In the anti-microbiana activity, the results were dependant of the strain used. For the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Escherichia coli* ATCC 25922 (*Beta*-Lactamase negative), best results were achieved with crude ethanolic extract of fruits. When the activity was made against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible to oxacylin and penicillin) best result was achieved for the hexanic extract of leaves. No extract has shown any activity against *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUÇÃO

Palmeiras – Foco de Interesse Científico

As palmeiras são plantas terrestres ancestrais, com fósseis datando do final do período Cretáceo (aproximadamente há 85 milhões de anos). Por serem formadas por matérias duráveis, elas possuem um registro de fósseis relativamente significativo. Por exemplo, grãos de pólen de “Mangrove Palm”, *Nypa fruticans*, foram encontrados em sedimentos do período Eoceno (cerca de 50 milhões de anos atrás) em Londres. Estavam também presentes nos mesmos sedimentos o pólen de “Rattan Palm”, *Calamus daemonorops*, o fruto de uma espécie de *Oncosperma* e de uma espécie de *Sabal*, e sementes similares as de “Fishtail Palm”, *Caryota* (STEWART, 1994).

Embora as palmeiras possuam uma aparência característica que permita que muitas pessoas as reconheçam com certa facilidade, vários grupos de plantas não relacionadas compartilham algumas semelhanças e são, muitas vezes, erroneamente chamadas de palmeiras (JONES, 1995).

As palmeiras possuem cerca de 2500 a 3500 espécies, distribuídas em 210 a 236 gêneros. A família Palmae Juss. também é conhecida pelo nome alternativo de Arecaceae Schultz- Schultzenst. e geralmente inclui as famílias Borassaceae, Chamaedoreaceae, Geonomaceae, Iriarteaceae, Malortieaceae, Manicariaceae, Nypaceae, Phoenicaceae, Phytelphantaceae, Phytelphasiaceae, Salabaceae, Sagoaceae e Synechantaceae (WATSON & DALLWITZ, 1994; DALLWITZ, 1980).

No que se refere ao seu *habitat*, elas se desenvolvem melhor nos trópicos e estão amplamente distribuídas nas zonas temperadas de todo o mundo,

principalmente em regiões onde o índice pluviométrico é alto. Nos locais onde ocorrem, podem ser componentes dominantes da vegetação. Apesar da ampla distribuição da família Palmae e da freqüência das palmeiras nos trópicos, poucos gêneros possuem muitas espécies e/ou são espalhadas. De fato, muitos gêneros de palmeiras contêm cinco ou menos espécies e gêneros monotípicos são comuns (ZOFEMLER, 1994).

Do ponto de vista químico, as plantas dessa família são geralmente não cianogênicas. Os alcalóides podem estar presentes (ocasionalmente pirimidínicos) ou ausentes. Proantocianidinas podem estar presentes (geralmente abundantes), ou ausentes (*Livistonia*). Os flavonóis são raros, mas quando presentes são derivados do kaempferol, quercetina e tricina, dentre outros. Saponinas e sapogeninas estão ocasionalmente presentes (HEIM DE BALSAC *et al.*, 1931; LUBRANO *et al.*, 1994).

Muitas das 2800 espécies conhecidas de palmeiras são importantes economicamente (Figura 1). As palmeiras fornecem alimento, fibras, matéria-prima para a confecção de roupas, madeira, combustíveis, material de construção, amido, óleos, graxas, vinhos e um grupo de produtos de menor importância utilizados pelas populações indígenas nos trópicos (PRANCE *et al.*, 1995).



Figura 1: *Copernicia cerifera* – espécie com importância econômica
(Fonte: <http://www.deltadorioparnaiba.com.br/39.htm>, 10/05/2004)

Estado do Piauí

O estado do Piauí está localizado na Região Nordeste brasileira e é o terceiro maior estado nordestino, inferior apenas à Bahia e ao Maranhão, e o décimo estado brasileiro, respondendo por 2,9 % do território nacional. Possui atualmente uma população total de cerca de 2.725.000 habitantes e área de 252.378,49 km², fazendo fronteira ao Norte com o Oceano Atlântico. Ao sul e sudeste faz divisa com a Bahia; ao sudoeste, com Tocantins; a leste, com o Ceará e Pernambuco e a oeste com o estado do Maranhão. Seus terrenos são baixos e arenosos no litoral, planaltos na maior parte, e depressões a Sudeste (Figura 2, pág. 4).

Em decorrência de sua posição, o estado do Piauí caracteriza-se, em termos fisiográficos, como uma típica zona de transição, apresentando, conjuntamente, aspectos do semi-árido nordestino, da pré-Amazônia e do Planalto central do Brasil. Refletindo as condições de umidade das diversas zonas, as regiões ecológicas distribuem-se em faixas paralelas, com a caatinga arbórea e arbustiva predominando no Sudeste, a floresta decidual no Baixo e Médio Parnaíba, cerrado e cerradão, no Centro-Leste e Sudoeste e as formações pioneiras de restinga, mangue e aluvial campestre, na zona litorânea. Dentre as paisagens vegetais, destacam-se os cocais, com seus exemplares de babaçu, carnaúba, buriti, e tucum, encontrados na região da floresta decidual, nos vales úmidos e nas áreas alagadiças, sustentando a atividade extrativa de significativa importância para o estado (<http://www.pi.gov.br/piaui.php?id=1>).

O Piauí é um estado de grandes contrastes. Se, economicamente, não está na lista dos estados de maior peso no País, em seu território se localiza o Parque Nacional da Serra da Capivara, o sítio arqueológico mais importante não só do

Brasil, mas de todas as Américas. Há sinais de que foi nessa reserva, um cenário pré-histórico no meio do sertão, que surgiu o homem americano, e há muito mais tempo do que se pensava (GUIDON & LESSA, 2002).

No estado estão ainda o delta do Parnaíba, o único em mar aberto das Américas e o Parque Nacional das Sete Cidades, onde se encontram pinturas pré-históricas em cavernas e formações rochosas que datam, no mínimo, de 400 milhões de anos. Embora seja o Estado litorâneo com menor extensão de costa, apenas 66 quilômetros, o Piauí tem um privilegiado ecossistema, formado por inúmeras ilhas, lagoas, igarapés e praias de areia fina, cobertas por dunas e coqueirais (<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/divpol/nordeste/pi/apresent/index.htm>).

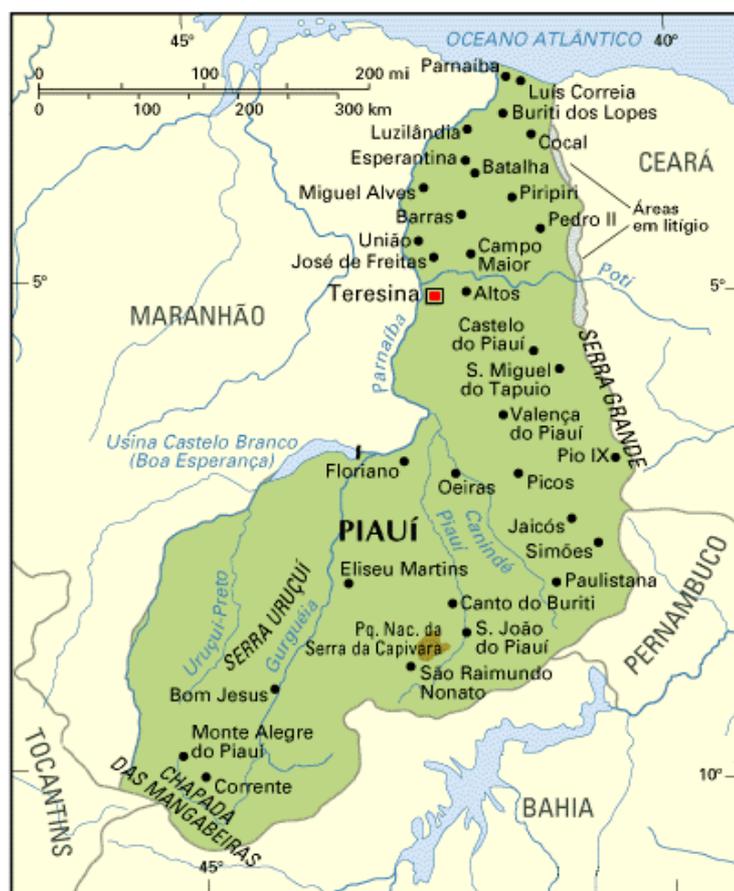


Figura 2: Mapa da localização do Estado do Piauí no Nordeste brasileiro, com suas divisas e sua capital, Teresina.

(Fonte: <http://www.guianet.com.br/.../www.guianet.com.br%2Fpi%2F>, 05/04/2004)

Teresina, Capital do Piauí

A capital Teresina está localizada na região Centro-Norte do Piauí, no encontro entre os Rios Poti e Parnaíba (Figura 3, pág. 6) com altitude média de 70m. Apresenta clima tropical sub-úmido, com período chuvoso nos meses correspondentes ao verão e ao outono. A média das temperaturas mínimas fica em torno de 22°C, nos meses de junho a agosto, e a média das máximas alcança 35°C no período de setembro a dezembro (http://www.piemtur.pi.gov.br/localiza_the.html).

O município é o único entre as capitais de estados nordestinos não situada à beira-mar, e isso porque a colonização do estado se deu de forma diferente das demais unidades administrativas que compõem a região Nordeste: no Piauí a ocupação ocorreu do interior para o litoral. Diferente da ocorrida em outros estados, a colonização do Piauí também não registra em sua história piratas ou invasões estrangeiras. Ali a ocupação foi feita, primeiramente, por bandeirantes desbravadores, como o português Domingos Afonso Mafrense e o paulista Domingos Jorge Velho. Mafrense fundou a primeira vila do Piauí, hoje cidade de Oeiras (em homenagem ao conde de Oeiras, mais tarde Marquês de Pombal), e o paulista levou os primeiros rebanhos de gado. (<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamatory/web/port/divpol//nordeste/pi/apresent/index.htm>). Como cidade, floresceu rapidamente, tornando-se o centro mais importante do novo estado.

Desde os tempos coloniais, entretanto, pensava-se em se mudar a capital do Piauí, de Oeiras para as margens do rio Parnaíba, por ser aquela cidade de difícil comunicação, criando dificuldades ao governo e ao comércio. Apesar de justos os motivos, a mudança só se fez muito tempo depois, no ano de 1851, graças ao

Conselheiro José Antônio Saraiva. Foi escolhida a Chapada do Corisco para a criação da Nova Vila do Poti, as margens do rio Parnaíba. Pouco depois surgiram as primeiras casas e a Igreja de Nossa Senhora do Amparo. No ano seguinte a Nova Vila do Poti foi elevada à categoria de cidade, com o nome de Teresina, em homenagem a D. Teresa Cristina, imperatriz do Brasil. A instalação definitiva da capital em Teresina foi realizada no dia 16 de agosto de 1852 (http://www.piauihp.com.br/capitania_do_piaui.htm).



Figura 3: Rio Parnaíba – Teresina, PI.

(Fonte: <http://www.piauihp.com.br/piaui/teresina/rio.jpg>, 10/04/2004)

A partir de então a navegação através desse rio dinamizou o espaço regional, promovendo exportações de produtos como o algodão, peles, cera de carnaúba, amêndoa de babaçu e borracha de maniçoba, dentre outros, e da importação de bens manufaturados, fazendo de Teresina uma próspera cidade

comercial até meados do século XX. A sua relativa estagnação pós-guerra deveu-se à desativação da navegação e à grande redução das suas exportações.

No entanto, pela sua posição geográfica, passou a formar um importante entroncamento rodoviário regional e nacional, a partir das políticas públicas nacionais das décadas de 60 e 70, voltadas principalmente para a ampliação da malha rodoviária. Teresina (Figura 4) consolidou a sua vocação de pólo sub-regional, caracterizando-se hoje como um centro político, de comércio e de serviços, principalmente de saúde e de educação, para uma grande área de influência de parte das regiões Norte e do Nordeste do Brasil, sendo classificada como uma submetrópole regional. O seu sistema econômico conta com grandes e médias empresas que demonstram capacidade competitiva, com presença crescente nos mercados regional, nacional e externo, embora o pequeno negócio seja a base por excelência de sua economia (<http://www.piemtur.pi.gov.br/cidades/teresina.html#>).



Figura 4: Cidade de Teresina, PI.

(Fonte: <http://www.piauihp.com.br/piaui/teresina/predios1.jpg>, 10/05/2004)

Carnaúba – Alvo Científico do Presente Estudo

Dados Botânicos

Nome popular: Carnaúba, Carnaubeira, Carandá

Família Botânica: Palmae

Nome Científico: *Copernicia cerifera* Mart.

Sinonímias: *C. prunifera* Miller, *Corypha cerifera* Arruda

Origem: Nordeste do Brasil e Pantanal

A carnaúba (Figura 5) é uma das palmeiras mencionadas por Martius, o naturalista e botânico tomado pela exuberância da terra de origem dessa espécie. Entretanto não é apenas mais uma delas: é especial. Tão especial que não escapou à atenção de escritores como Mário de Andrade, Guimarães Rosa, José de Alencar e Euclides da Cunha, entre outros, que souberam destacar, em sua obra literária, a total integração do homem regional ao ambiente em que vive. A carnaúba, planta de grande longevidade, tem sido testemunha viva e participante ativa dessa integração (SILVA, 2001).

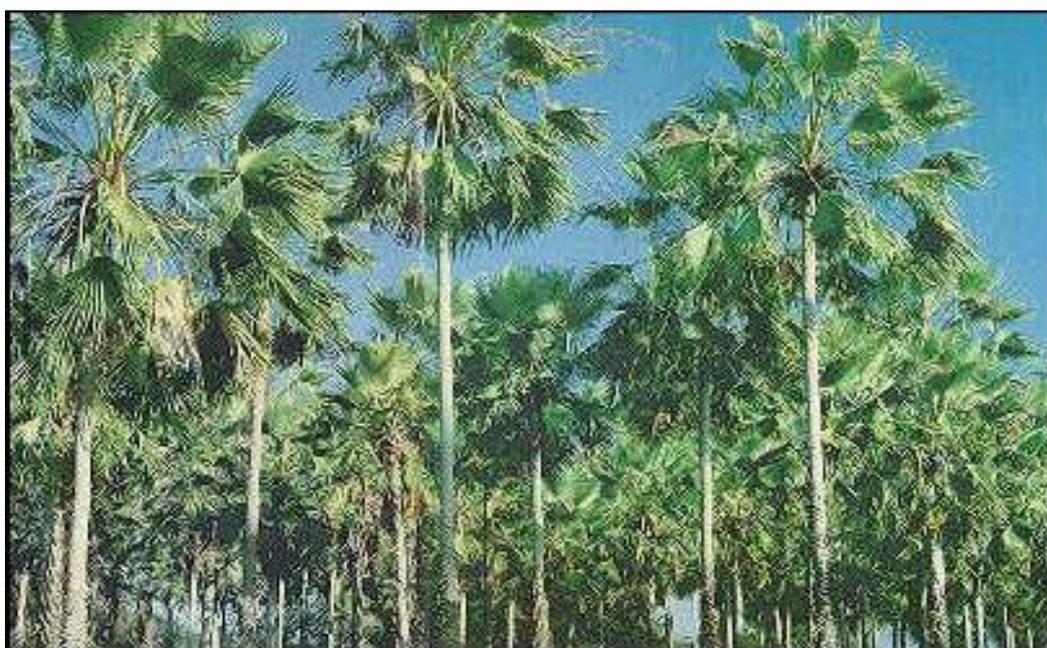


Figura 5 – Carnaubeiras

(Fonte: www.shinybike.com/wpe1.jpg, 24/09/2003)

Na região de seu *habitat* as carnaubeiras se multiplicam espontaneamente. Preferem solos arenosos e alagadiços, várzeas e margens dos rios de regiões de clima quente. (SILVA, 2001).

Essa planta tem como características estipe reto e cilíndrico, com cerca de 10 a 15 metros de altura atingindo no máximo (40 metros), formando saliências espiraladas em superfície, decorrentes dos restos das folhas que caíram (Figura 6).



Figura 6 – Aspecto do tronco de *Copernicia cerifera*

(Fonte: http://www.floridata.com/ref/c/cope_pru.cfm, 24/09/2003; Lorenzi, 2000)

A palmeira frutifica de novembro a março. Os frutos da carnaúba (Figura 7, pág 10), inteiros, são principalmente aproveitados pelos animais de criação: de sua polpa extrai-se uma espécie de farinha e um leite que, à semelhança do leite extraído do babaçu, pode substituir o leite do coco-da-baía. Em condições de

subsistência, a amêndoa da carnaúba, quando torrada e moída, costuma até mesmo ser aproveitada localmente em substituição ao pó do café (PIO CORREA, 1931).



Figura 7 – Frutos da Carnaúba

(Fonte: Verônica P. Rodrigues, 2002; Lorenzi, 2000)

As folhas (Figura 8, pág 11) são pecioladas, verde-esbranquiçadas e em forma de leque, com até 1 metro de comprimento (PIO CORREA, 1931). As flores são amarelas com cachos pendentes que surgem de julho a outubro. As espigas com centenas de frutos ovóides a globosos, brilhantes, esverdeados quando jovens e roxos quando maduros.

As células epidérmicas das folhas da carnaúba são recobertas por uma camada cerífera. A presença de cera nas folhas de algumas plantas, como ocorre com a carnaúba, é possivelmente consequência de sua adaptação às regiões secas, uma vez que essa camada cerífera dificulta a perda de água por transpiração e protege a planta contra o ataque de fungos. As folhas, de cor verde-azulada, são amplas e, dispostas no alto da palmeira, compondo um elegante cocar (SILVA, 2001).



Figura 8 – Folhas secas e cera; folhas de carnaúba
(Fonte: Verônica P. Rodrigues; Lorenzi, 2000)

Aspecto Econômico

Quando no século XVIII, o também naturalista Humboldt conheceu a carnaúba em terras brasileiras, impressionou-se de tal forma com as numerosas e importantes finalidades da planta, que passou a chamá-la de "árvore da vida".

O lenho da carnaúba é resistente, podendo ser usado na fabricação de moirões, na construção de edificações rústicas e como lenha pesada. Inteiro, o estipe da carnaúba costuma ser usado como poste; fragmentado ou serrado, fornece ótimos caibros, barrotes ou ripas, podendo também ser aplicado na marcenaria de artefatos torneados, tais como bengalas e objetos de uso doméstico.

No Nordeste brasileiro, habitações inteiras são construídas com materiais retirados da carnaúba, da mesma forma como se retiram materiais do babaçu e do buriti. Também com suas folhas fazem-se telhados e coberturas de casas e abrigos; com suas fibras confeccionam-se cordas, sacos, esteiras, chapéus, balaios, cestos,

redes e mantas (Figura 9). Imponente, esbelta como a maioria das palmeiras brasileiras, a carnaúba é mais alta do que o babaçu e economicamente mais rentável do que o buriti. Isto porque, além dos frutos, das amêndoas, do estipe, das folhas e das fibras de utilidades variadas. Das folhas da carnaúba obtém-se uma cera de grande importância industrial. (<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/carnauba.html>).

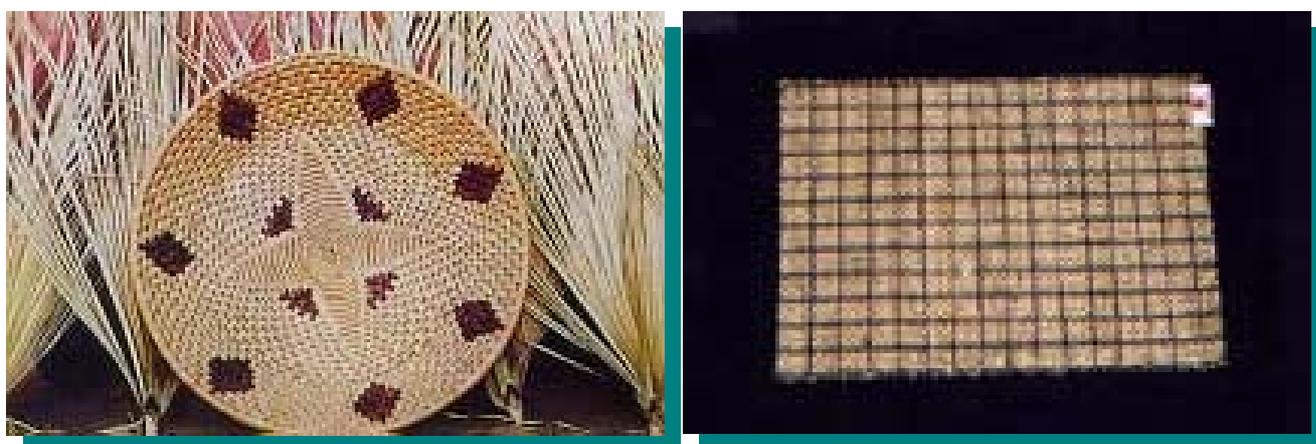


Figura 9 – Artesanatos utilizando palha de carnaúba: chapéu e jogo americano
(Fonte: <http://www.terrabrasileira.net/folclore/regioes/2artes/nd-piaui.html>, 10/05/2004;
<http://www.terradosolbrasil.com.br/p5.html>, 10/05/2004)

A cera, principal produto obtido da carnaúba, é, ainda hoje e na maioria dos carnaubais, extraída por processos manuais bastante rudimentares. Em geral, o procedimento adotado é o seguinte: depois de cortadas, as folhas jovens das palmeiras são estendidas pelo chão e postas ao sol, por vários dias, para secar. Quando as folhas secam e a película de cera que as recobre se transforma em um pó esfarinhado, elas são levadas para um quarto escuro, sem janelas, de construção simples. Ali, são rasgadas com grandes garfos de madeira e começa a "batedura": as folhas são violentamente batidas até que toda a cera se desprenda, na forma de

minúsculas escamas brancas, e possa ser separada da palha rasgada. Depois que esse pó se assenta, ele é varrido, recolhido e levado ao fogo, com um pouco de água, em grandes latões de querosene. Essa calda transforma-se em uma pasta esverdeada, que é jogada em uma prensa rústica de madeira, a partir da qual se obtém uma cera líquida que, depois, é despejada em gamelas de barro ou de madeira até esfriar.

Apesar de ter tantas qualidades, de oferecer tantos produtos diferentes e de crescer com facilidade em qualquer clima tropical, é apenas no particular ambiente seco das caatingas do Nordeste do Brasil que a carnaúba produz a cera em condições de exploração econômica (<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/carnauba.html>).

A carnaúba e seus derivados, especificamente a cera de carnaúba, é um produto de sustentação da economia do estado (Figura 10, pág 14). Planta de elevado valor econômico e social, de baixo custo e potencialmente de grande rentabilidade, é o principal produto do extrativismo vegetal do estado do Piauí, tendo uma grande importância na formação do valor da produção vegetal.

A produção média de cera de carnaúba no Estado do Piauí é de 7.500 a 8.000 ton. e a produção de pó cerífero em torno de 12.000 a 12.500 ton. O Município de Campo Maior é considerado o maior produtor de cera de carnaúba e o Município de Floriano o maior produtor de pó cerífero. Hoje, existem no estado do Piauí, 13 indústrias (refinarias) de beneficiamento de cera de carnaúba, sendo que 6 (seis) delas atuam no mercado externo. No mercado interno, os estados brasileiros que lideram o consumo de cera de carnaúba são Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Os países que lideram o consumo externo em termos de valor do produto são: Estados Unidos, Japão, Alemanha, Itália, Formosa, Índia,

Bélgica, Chile, Reino Unido, França e México (http://www5.prossiga.br/arranjos/vortais/carnauba_pi_panorama.html).

Dentre as muitas aplicações das ceras da carnaúba, pode-se dizer que são preferencialmente utilizadas na produção de emulsões não-iônicas, na fabricação de cera de assoalho, produtos para artes gráficas, batons, lápis labial, cremes, tintas para impressão, esmaltes e diversas outras aplicações (<http://www.steviacomercial.com.br/carnauba.htm>).



Figura 10 – Ceras de carnaúba

(Fonte: http://www.pvp.com.br/pvpport/carnauba_wax.htm, 24/09/2003)

Usos Populares

No Norte/Nordeste do Brasil, o povo distingue três variedades, que parece corresponder à idade das plantas: branca, vermelha e preta. Da primeira (dentre outras coisas) usa-se a decocção de suas raízes como depurativo e específico para sífilis. Introduzidas na Inglaterra em cerca de 1870, porém com absoluto insucesso científico, o que não impediu que os nossos ervanários continuassem vendendo-a como o melhor dos medicamentos específicos contra a sífilis (anteriormente referida)

e contra a artrite, assim como com propriedades diuréticas, anti-reumáticas e úteis para quaisquer afecções cutâneas (PIO CORREA, 1931).

Revisão Bibliográfica

- Composição Química da Cera de Carnaúba

Quimicamente, a parte da carnaúba mais estudada é a cera que recobre as folhas. Pouco é descrito na literatura sobre a composição química das outras partes desta planta. Este fato não é de se admirar, uma vez que é grande a importância econômica e comercial da cera, sobretudo frente às outras partes desta árvore.

Sob o ponto de vista químico, a cera da carnaúba, a mais dura das ceras vegetais, de ponto de fusão a 85°C, compõe-se principalmente de éster miricílico do ácido cerático, sendo uma combinação dos ácidos melíssico e cerático, aliás, contendo certa porcentagem deste ainda no estado livre e mais um pouco de ácido carnaúbico, uma lactona, um hidrocarboneto e três álcoois diferentes, entre esses o álcool melíssico. Uma análise citada por H. Jumelle (“Les huiles végétales”) revela a seguinte composição: índice de ácido de 2 a 7, índice de saponificação 73 a 83°, índice de iodo 13,5, ácidos graxos 48%, álcoois 53 a 54 %, hidrocarbonetos 1,6 %, índice de acetilo 55% e teor de cinzas 0,14 a 0,51% (PIO CORREA, 1931).

Seja qual for a cor e aspecto, é sempre uma massa dura, quebradiça, fácil de reduzir a pó e que durante a fusão desprende acentuado cheiro de feno. Dissolvida em éter e álcool fervente, transforma-se em uma massa cristalina cujo ponto de fusão é 195°C (Marzahn, nome vulgar dado a essa massa). A cor da cera da carnaúba é variável, como já mencionado, devido não só a idade das plantas como às próprias folhas de onde é extraída (PIO CORREA, 1931).

Devido ao seu importante valor de mercado, várias empresas vêm lançando mão de inovações tecnológicas aplicadas no processo de refino da cera, pelos seus rígidos critérios de qualidade. Por isso, conhecer sua composição química e o método utilizado na sua manufatura é de extrema importância, pois a partir desses dados técnicos é possível classificar a cera de carnaúba em alguns tipos (Tabela 1).

Tabela 1: Especificações de 4 tipos de ceras disponíveis comercialmente de *C. cerifera*.

TESTES	ESPECIFICAÇÕES				
	TIPO I	TIPO 3	TIPO 4 (CENTRIFUGADA)	TIPO 4 (FILTRADA)	MÉTODOS
Faixa de Fusão (°C)	81-86	81-86	81-86	81-86	USP 24, p.2536
Impurezas Insolúveis (% Max.)	0,2	0,2	0,5	0,2	AMERWAX
Substâncias Voláteis (% Max.)	1	0,5	0,5	0,5	ASTM D95-62
Índice de Acidez	2-7	2-7	2-7	2-7	USP 24, p.2536
Índice de Ésteres	71-88	74-82	72-78	72-78	USP 24, p.2536
Índice de Saponificação	78-95	78-87	76-84	78 - 84	USP 24, p.2536
Impurezas Orgânicas Voláteis (CG)	Conforme prescrito	Conforme prescrito	Conforme prescrito	Conforme prescrito	USP 24, p. 2536
Cor	Amarelo claro	Amarelo queimado	Verde escuro	Verde escuro	USP 24, p.2536
Resíduo de Ignição (% Max.)	0,25	0,25	0,25	0,25	
Metais Pesados (% Max.)	0,002	0,002	0,002	0,002	USP 24, p.2536

(Fonte: http://www.pvp.com.br/pvpport/carnauba_wax.htm, 24/09/2003)

- Revisão Bibliográfica

Foi realizado um detalhado levantamento bibliográfico de todos os artigos científicos publicados até dezembro de 2003 sobre a espécie de palmeira *C. cerifera*. No entanto, é inegável a constatação de que a cera de carnaúba é o produto mais estudado desta palmeira. Sobre a cera foram encontradas inúmeras referências, desde sua composição química, até sua utilização em diversos tipos de produtos industriais como cosméticos, cápsulas de remédios, componentes eletrônicos, produtos alimentícios, ceras polidoras e revestimentos (http://www.sertao.org.br/programas_semiarido.htm).

Em 1962 e 1963, pesquisadores franceses realizaram estudos sobre os hidroxiácidos e dióis encontrados na cera da carnaúba e de maçã. Na cera estudada puderam verificar a existência desses constituintes em números pares e ímpares de carbono, onde variavam de C₁₀ a C₃₂ nos dióis e de C₁₀ a C₃₀ nos hidróxiácidos (MAZLIAK, 1962 e 1963).

O grande interesse na cera de carnaúba levou pesquisadores a estudar a sua toxidez. Estudos realizados em ratos alimentados com a cera avaliaram alguns parâmetros biológicos, como por exemplo, peso corporal, valores hematológicos e atividade de enzimas séricas, concentração urinária e achados histológicos (ROWLAND, *et al.*, 1982). Paralelamente a esses estudos, pesquisadores americanos estudavam a performance reprodutiva de ratos (PARENT *et al.*, 1983a) e cães (PARENT *et al.*, 1983b) alimentados subcronicamente com cera de carnaúba.

Em âmbito nacional, os primeiros estudos encontrados na literatura sobre a carnaúba datam de 1974, realizados na Universidade de São Paulo (USP), por dois pesquisadores brasileiros. Esse trabalho descreve a preparação e caracterização de derivados da cera da carnaúba (DE ALMEIDA CUNHA & DINI, 1974).

No entanto, no que se refere ao aspecto farmacológico da cera de carnaúba, somente um artigo foi encontrado durante a pesquisa em banco de dados. Este artigo publicado no ano de 2002 por pesquisadores da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) descreve a presença de proteínas de defesa presentes na cera, identificadas como β -1,3-glucanase e chitinase, além de confirmada atividade fungicida (CRUZ *et al.*, 2002).

Em se tratando de folhas, frutos e outras partes desta planta, nenhum dado literário foi obtido. Desta forma, não foi tomado conhecimento, nos meios pesquisados, da composição química e ação farmacológica de extratos provenientes de partes de *C. cerifera* que não a cera.

***Serenoa repens* – Palmeira de Uso Terapêutico**

Na Europa, preparações fitoterápicas têm sido descritas para o tratamento da hiperplasia prostática benigna (HPB) há cerca de 20 anos. Nesses países, essas preparações representam aproximadamente 1/3 do total de todos os agentes terapêuticos utilizados para o tratamento da HPB. Dois dos agentes terapêuticos mais populares estão sob investigação clínica para determinar sua eficácia, e têm sido objeto de estudos científicos para identificar os mecanismos de ação: são eles o *Pygeum africanum* (Tadenan[®], da Debat Pharmaceuticals) e a *Serenoa repens* (Permixon[®], da Pierre Fabre Medicament) (LEVIN & DAS, 2000).

A *Serenoa repens*, também conhecida como *Saw palmetto* ou *Sabal serrulata* é uma palmeira anã, de originária da América do Norte, e atualmente seu extrato lipófilico constitui um dos fitoterápicos mais importantes para o tratamento da HPB (LEVIN & DAS, 2000).

A hiperplasia nodular é ainda chamada pelo nome redundante de hiperplasia prostática benigna (termo redundante, uma vez que todas as hiperplasias são benignas). Não resta dúvida de que essa forma de aumento da próstata está relacionada ao envelhecimento e à presença de um eixo hormonal androgênico normal (presença de testículos). O desenvolvimento e a manutenção dessa doença exigem a presença tanto da testosterona quanta da diidrotestosterona (DHT) durante a puberdade e o envelhecimento. A DHT, metabólito da testosterona, é o mediador final do crescimento prostático. É sintetizada na próstata a partir da testosterona circulante pela ação da enzima 5α -redutase (Figura 11). Há algumas evidências experimentais de que a hiperplasia prostática mediada pela DHT é auxiliada e promovida por estrogênios. Em homens que estão envelhecendo, os níveis de estradiol aumentam, e acredita-se que os estrogênios induzem um aumento dos receptores androgênicos, desse modo tornando as células mais susceptíveis à ação da DHT (COTRAN; KUMAR & COLLINS, 2000).

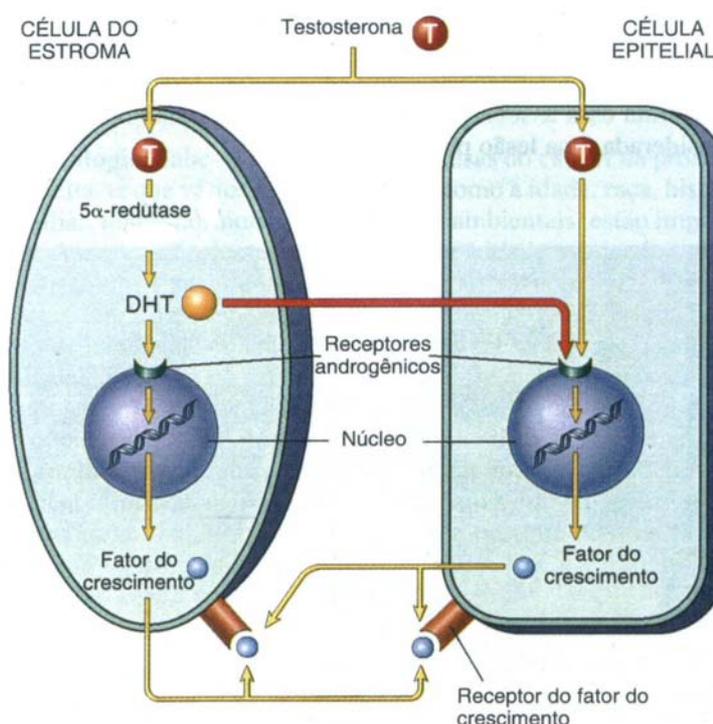


Figura 11 – Esquema simplificado da patogênese da HPB.

(Fonte: COTRAN; KUMAR & COLLINS, 2000)

Mais recentemente, foi publicado um estudo envolvendo a avaliação comparativa da eficácia do extrato lipídico padronizado de *S. repens*, o Permixon® frente a tansulosina, um bloqueador α 1-adrenérgico sobre o tratamento dos sintomas do trato urinário baixo em pacientes com HPB. Pôde-se concluir que os efeitos benéficos do uso do Permixon® podem ocorrer através de três mecanismos básicos: primeiro, seu efeito anti-androgênico, ao inibir as duas isoformas da enzima 5 α -redutase; segundo, por sua ação antiproliferativa, observada através da contração das células epiteliais prostáticas e supressão dos níveis de testosterona teciduais através de um possível efeito sobre a transcrição gênica; e por último, propriedades antiinflamatórias, através da inibição dos metabólitos do ácido araquidônico, que permite ao extrato reduzir tanto os sinais obstrutivos quanto irritativos (DEBRUYNE *et al.*, 2004).

Hoje, no Brasil, a *S. repens* está disponível comercialmente sob a marca registrada de Prostatal®, do laboratório Herbarium.

Com bases nesses estudos, decidiu-se realizar uma análise comparativa entre a composição química do extrato comercial de *S. repens* e aqueles encontrados nos extratos de *C. cerifera*, com o objetivo de avaliar, futuramente, uma possível atividade desta palmeira para o tratamento e prevenção da HPB.

Dor e Inflamação

O controle da dor é uma das indicações mais importante a que se destinam os medicamentos.

Em condições normais, a dor está associada com atividade elétrica das fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro nos nervos periféricos. As terminações

sensoriais desses nervos podem ser ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, de intensidade nociva, ou seja, capazes de causar certo grau de lesão tecidual. Esses estímulos periféricos nocivos consistem na inibição da transmissão de informações da periferia para o tálamo e o córtex. O controle da dor é uma das indicações mais importantes a que se destinam os medicamentos.

Resumidamente, os agentes analgésicos mais importantes são os medicamentos semelhantes à morfina (opióides), medicamentos antiinflamatórios não-esteróidicos (aspirina e substâncias correlatas), anestésicos locais e vários outros medicamentos não-opioides de ação central (como, por exemplo, antidepressivos, carbamazepina e ergotamina). Dentre os grupos citados, destaque-se a morfina e seus análogos, por terem sido estudados mais intensamente que qualquer outro grupo de medicamentos na tentativa de compreender seus poderosos efeitos em termos moleculares, bioquímicos e fisiológicos (RANG, 1997).

Do ponto de vista molecular, existe a evidência convincente de três classes importantes de receptores opióides no sistema nervoso central (SNC), designados pelas letras μ , κ e δ , bem como indicações da presença de subtipos em cada classe. A maioria dos opióides usados na prática clínica é relativamente seletiva para os receptores μ , o que reflete sua semelhança com a morfina. A morfina e outros opióides agonistas morfino-símiles produzem analgesia, principalmente através da interação com receptores opióides μ . Outras conseqüências da ativação do receptor μ são depressão respiratória, miose, diminuição da motilidade gastrintestinal e sensação de bem-estar (euforia). As drogas morfino-sílimes determinam analgesia, sonolência, alterações de humor e obnulação mental nos seres humanos. Um aspecto significativo da analgesia é que ela ocorre sem perda da consciência. A dor é menos intensa, menos desconfortável ou desaparece por completo após

administração de doses terapêuticas; é comum a sonolência (REISINE & PASTERNAK, 1996).

Sobre o processo inflamatório, este envolve uma série de fenômenos que podem ser desencadeados por vários estímulos, como por exemplo, agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e lesão térmica ou provocada por outros agentes físicos. Cada estímulo provoca um padrão característico de resposta, que representa uma variação relativamente pequena do mesmo tema. Em nível macroscópico, a resposta geralmente é acompanhada de sinais clínicos bem conhecidos como eritema, edema, hiperalgesia e dor. As respostas inflamatórias ocorrem em três fases diferentes, cada qual aparentemente mediada por mecanismos diversos: (1) fase transitória aguda caracterizada por vasodilatação localizada e aumento da permeabilidade vascular; (2) fase subaguda ou tardia, marcada principalmente pela infiltração de leucócitos e células fagocitárias; e (3) fase proliferativa crônica, na qual há degeneração tecidual e fibrose.

A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência, em vista dos patógenos e lesões ambientais, embora em algumas situações e doenças, a resposta inflamatória possa ser exagerada e persistente, sem qualquer benefício aparente (INSEL, 1996).

Os principais mediadores da inflamação são: histamina, eicosanóides, fator de ativação plaquetária (PAF), bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (RANG *et al.*, 1997).

Os eicosanóides são substâncias derivadas de ácidos graxos essenciais de 20 carbonos, que contém três, quatro ou cinco ligações duplas (dentre eles o ácido araquidônico), e compreendem as famílias das prostaglandinas, leucotrienos e compostos relacionados. O aumento da biossíntese de eicosanóides é regulado com

precisão e ocorre em resposta a estímulos físicos, químicos e hormonais diversos. São produzidos como produtos de vários sistemas enzimáticos diferentes, incluindo as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) ou lipoxigenases ou citocromo P450s. Vários grupos de medicamentos, em especial os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais, têm seus efeitos terapêuticos atribuíveis ao bloqueio da produção de eicosanóides (CAMPBELL & HALUSHKA, 1996)

Os dois objetivos básicos do tratamento de inflamações são o alívio da dor – que é sintoma inicial e principal queixa do paciente – e a interrupção ou retardamento do processo responsável pela lesão tecidual (KATZUNG, 1998).

Durante a pesquisa bibliográfica não foram encontradas referências relativas à atividade analgésica e antiinflamatória de extratos de *C. cerifera*.

Atividade Antimicrobiana

Muitas das doenças que afligem grande parte da população são causadas por microorganismos. O tratamento dessas infecções é realizado através da utilização de agentes quimioterápicos, atualmente conhecidos por antibióticos.

Antibióticos, por definição, são substâncias produzidas por diversas espécies de microorganismos (bactérias, fungos, actinomicetos), que impedem o crescimento de outros microorganismos, podendo eventualmente destruí-los. Todavia, o uso comum quase sempre estende o termo antibiótico para incluir agentes antibacterianos sintéticos, como as sulfonamidas e as quinolonas, que não são produzidas por micróbios. São classificados como bacteriostáticos (quando inibem temporariamente o crescimento do microorganismo) ou bactericidas (quando provocam morte celular) (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Historicamente, a classificação baseia-se na estrutura química e no mecanismo de ação proposto. Desta forma, pode-se classificar como antimicrobianos os fármacos que atuam na síntese da parede celular bacteriana; os agentes que atuam diretamente na membrana celular do microorganismo alterando sua permeabilidade; aqueles que afetam a função das subunidades ribossômicas; os agentes que afetam o metabolismo dos ácidos nucléicos; os antimetabólitos que bloqueiam etapas metabólicas específicas que são essenciais para os microorganismos; e os análogos dos ácidos nucléicos (CHAMBERS & SANDE, 1996).

A escolha desses agentes se baseia nas condições dos mecanismos de defesa do hospedeiro e na sensibilidade do microorganismo ao agente antibacteriano. A toxidez seletiva é condição imprescindível ao fármaco escolhido, o que significa que este deve ser prejudicial ao parasito sem afetar o hospedeiro (RANG *et al.*, 1997).

Durante a pesquisa bibliográfica não foram encontradas referências relativas à atividade antimicrobiana de extratos de *C. cerifera*.

Atividade Antioxidante

Radicais livres estão envolvidos na etiologia e patogênese de numerosas doenças, incluindo patologias cardiovasculares, câncer e diabetes (INOUE *et al.*, 1995; SAKAGAMI *et al.*, 1997, AOKI *et al.*, 2001).

A formação de radicais livres ocorre como consequência natural do metabolismo celular. Também são produzidos como resultado do estresse oxidativo (SCHMIDT *et al.*, 1995; KOGA *et al.*, 1999; TERASAKA *et al.*, 2000).

Agentes antioxidantes estão presentes em diversas plantas utilizadas como alimento, e em bebidas como vinhos e chás. Está comprovado que o chá verde, por exemplo, possui substâncias antioxidantes polifenólicas que são anticarcinogênicas, dentre elas o ácido gálico (HO *et al.*, 1992; KERRY & ABBEY, 1997; ABU-AMSHA *et al.*, 2001; POLEWSKI *et al.*, 2002).

Na França, o consumo de uma dieta rica em gordura saturada e a aparente baixa incidência de doenças coronarianas é um fato chamado “Paradoxo Francês”, o qual foi associado ao consumo de vinho tinto. Os agentes antioxidantes presentes no vinho tinto consumido por essa população mostraram ter um papel protetor contra a oxidação do LDL *in vitro* (ARCE *et al.*, 1998; LANDRAULT *et al.*, 2001).

Dada a importância da atividade antioxidante no tratamento e prevenção de várias doenças, sobretudo as cardiovasculares, e sabendo-se que não existem estudos sobre a atividade antioxidante de partes da palmeira em estudo, escolheu-se duas metodologias para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* dos extratos polares de folhas, frutos e cascas de tronco de *C. cerifera*.

JUSTIFICATIVA

Pode-se verificar uma vasta área de utilização da *C. cerifera* – a carnaúba - em diversos setores da indústria nacional, desde artefatos de uso doméstico, passando por seu emprego em fórmulas sofisticadas na indústria farmacêutica, até seu uso na fina indústria eletroeletrônica. Além disso, através do levantamento bibliográfico realizado, foi evidenciado a existência de poucos estudos no que se refere à caracterização química de seus constituintes e à ação farmacológica de suas partes principalmente relacionadas ao seu uso etnofarmacológico contra a artrite, como diuréticas, anti-reumático e em afecções cutâneas.

Frente à inexistência de informações na literatura relacionadas com o estudo farmacológico das folhas e frutos de *Copernicia cerifera*, foi feita a realização do estudo químico com as partes mencionadas e ensaios farmacológicos no intuito de avaliar a presença ou não de extratos com atividade antioxidante, analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana.

Por já existir no mercado farmacêutico uma palmeira, a *Serenoa repens*, com atividade farmacológica reconhecida mundialmente na área científica e também popularmente como potente fitoterápico para o tratamento da hiperplasia prostática benigna, e por ser a carnaúba uma palmeira genuinamente brasileira, abundante nas regiões do Nordeste e do Centro-Oeste brasileiro (o que permite fácil coleta), esta palmeira foi escolhida para ser estudada, a fim de que se possa contribuir com o estudo de plantas, sobretudo palmeiras, de origem brasileira.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é contribuir para o estudo químico e farmacológico de espécies de palmeiras brasileiras, direcionando a análise química para extratos apolares das folhas e frutos e atividade farmacológica para os extratos polares e apolares dos extratos e amostras semi-purificadas da espécie *Copernicia cerifera*.

Objetivos Específicos

Os objetivos específicos nos estudos da carnaúba incluem:

1. Estudar, do ponto de vista químico e farmacológico, as folhas e frutos;
2. Proceder com a separação, isolamento e elucidação estrutural do maior número possível de substâncias do seu metabolismo especial;
3. Realizar estudos farmacológicos relacionados com atividade anti-radicais livres, antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana – nos extratos de todos os órgãos vegetativos coletados, e de amostras semi-purificadas (frações dos extratos, quando possível);
4. Comparar a atividade antioxidante dos extratos de *Copernicia cerifera* frente a duas diferentes metodologias: uma metodologia *in vitro* (pelo método do DPPH) e outra metodologia *in vivo* (sobre células de *Saccharomyces cerevisiae*).

PARTE EXPERIMENTAL

1 – FITOQUÍMICA

1 - Materiais e Métodos

A cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em aparelho HEWLETT PACKARD HP 6890, equipado com detector seletivo de massas modelo 5973 e um injetor automático modelo 5683, todos da Agilent Technologies. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV utilizando o PFK como referência. Os dados foram adquiridos via HP CHEMSTATION Data Acquisition software. As condições cromatográficas foram as seguintes: gás de arraste: hélio; detector de massas; vazão: 1,0 ml/min; split: 1:20; volume de injeção: 1,0 ml; temperatura inicial: 70° C; programação de temperatura: 4° C/min até 290° C; temperatura do injetor: 270° C; temperatura do detector: 280° C; tempo de corrida: 65 minutos.

As separações cromatográficas foram realizadas em colunas de gel de sílica Merck 60 (70 – 230 mesh) e em camada delgada com cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ sobre placa de alumínio Merck 0,2 mm de espessura. A visualização em camada fina foi feita , quando possível, sob luz UV a 254 e 365 nm e com revelador H₂SO₄ 5% em EtOH, seguido de aquecimento em placa (WAGNER & BLODT, 1996).

Todos os solventes e reagentes utilizados possuíam grau P.A. O BF₃ utilizado para metilação foi adquirido da Merck e o radical livre DPPH foi adquirido da SIGMA.

2 - Coleta de Material Botânico:

Folhas de *Copernicia cerifera* (carnaúba) foram coletadas na fazenda Bananeira, local próximo ao Município de Teresina, Piauí, em julho de 2002. Frutos e cascas foram coletados no mesmo local, em março de 2003.

A identificação do material botânico foi realizada por especialistas da Universidade Federal do Piauí, tendo sido depositada uma exsicata sob o número de voucher 592.

3 – Preparação dos Extratos:

Após a coleta, o material foi seco a temperatura ambiente, sendo as partes citadas moídas e submetidas a processo de extração exaustiva por maceração com hexano. Os extratos hexânicos (ou lipofílicos) foram obtidos por evaporação sob pressão reduzida para total remoção do solvente. O resíduo vegetal da extração com hexano foi submetido à extração com etanol. O extratos etanólicos foram obtidos através de evaporação por pressão reduzida e após secagem, o extrato das folhas foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). Os extratos obtidos a partir da partição líquido-líquido foram novamente evaporados sob pressão reduzida.

4 – Isolamento e Purificação dos Constituintes:

Os extratos hexânicos e aqueles obtidos a partir do processo de partição líquido-líquido foram submetidos a processos tradicionais e modernos de isolamento e purificação. Para a resolução dos extratos lipofílicos e de polaridade média, foram

utilizadas técnicas cromatográficas (cromatografia em coluna, cromatografia em camada fina) tipo adsorção, utilizando-se gel de sílica como fase estacionária. Novas purificações das frações obtidas foram realizadas por técnicas cromatográficas (em gel de sílica). Os extratos polares não foram trabalhados fitoquimicamente.

5 – Caracterização dos Constituintes:

A análise das substâncias obtidas dos extratos *Copernicia cerifera* foi realizada utilizando-se métodos clássicos, como cromatografia em camada delgada para triagem prévia e seleção das amostras, e a identificação estrutural das substâncias foi realizada por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Neste caso, foi realizada previamente a metilação das frações escolhidas com o intuito de metilar os ácidos graxos possivelmente presentes nas amostras, a fim de tornar possível a detecção dos mesmos.

Determinação do Teor de Óleos Fixos do Mesocarpo dos Frutos de *C. cerifera*

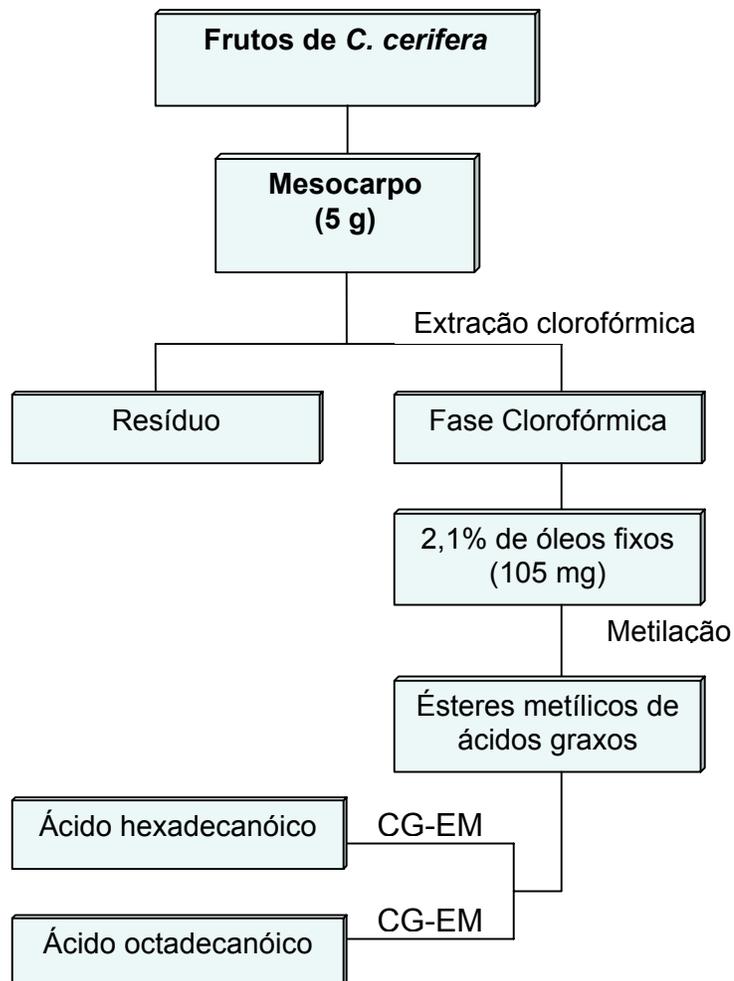
Com as cascas (mesocarpo) dos frutos de *C. cerifera* foi realizada uma extração de óleos fixos pelo método Bligh e Dyer (LACERDA, 1999). A amostra moída (5g) foi homogeneizada em 5 ml de clorofórmio e 10 ml de metanol por dois minutos. Em seguida, mais 5 ml de clorofórmio foram adicionados e o sistema em extração foi homogeneizado por 30 segundos. Logo após, foram adicionados 5 ml de água destilada e novamente a mistura foi homogeneizada por mais 30 segundos. Após a

homogeneização, a solução foi filtrada e o filtrado transferido para um funil de separação de 250 ml. Alguns minutos depois ocorreu separação e clarificação das fases. A fase clorofórmica contendo os lipídios purificados foi recolhida e filtrada utilizando-se sulfato de sódio anidro para retirar toda a água. A fase hidroalcoólica foi desprezada. A fase clorofórmica filtrada foi adicionada em um recipiente de vidro de peso conhecido e, após total evaporação, o teor dos óleos fixos pode ser calculado pela diferença de peso do recipiente, obtendo-se um teor de 2,1 % de óleos fixos (Esquema 1, pág 32).

Metilação de Ácidos Graxos do Mesocarpo dos Frutos de *C. cerifera*

Os ácidos graxos livres obtidos pela extração de óleo fixos do mesocarpo dos frutos de *C. cerifera* pelo método Bligh e Dyer (LACERDA, 1999) foram esterificados através de metilação com o objetivo de permitir sua volatilização durante análise por CG. Pesou-se cerca de 300 mg da amostra de óleos fixos e adicionou-se de 5 a 10 ml de hidróxido de potássio 0,5N em metanol, aquecendo levemente em banho-maria para dissolver completamente o óleo. Acrescentou-se 8 ml de BF_3 a 14% em metanol, aquecendo novamente em banho-maria por cerca de 5 minutos. Em seguida, deixou-se esfriar e então os ésteres metílicos formados foram extraídos com diclorometano. Adicionou-se uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio com o objetivo de liberar os ésteres metílicos para a camada de diclorometano. A fase em diclorometano foi acondicionada em um recipiente de vidro e, após total evaporação do solvente, foi encaminhada para análise por CG-EM (Esquema 1, pág 32).

É importante lembrar que esta mesma técnica de metilação foi utilizada em todas as amostras selecionadas para análise no CG-EM, não importando a origem do extrato em questão (se de folhas ou frutos).



Esquema 1: Extração e metilação de óleos fixos do mesocarpo dos frutos de *C. cerifera*.

Estudo do Extrato Bruto Hexânico das Folhas de *Copernicia cerifera*

O extrato bruto hexânico das folhas de *Copernicia cerifera* (8,5 g) foi submetido à separação por adsorção em coluna de gel de sílica 60 (Figura 12). Uma coluna foi empacotada com 10g de gel de sílica, utilizando o hexano como solvente. No topo da coluna foi aplicada uma pastilha preparada com 8,5g de uma amostra, misturada com um pouco da mesma sílica com a qual a coluna foi preparada.

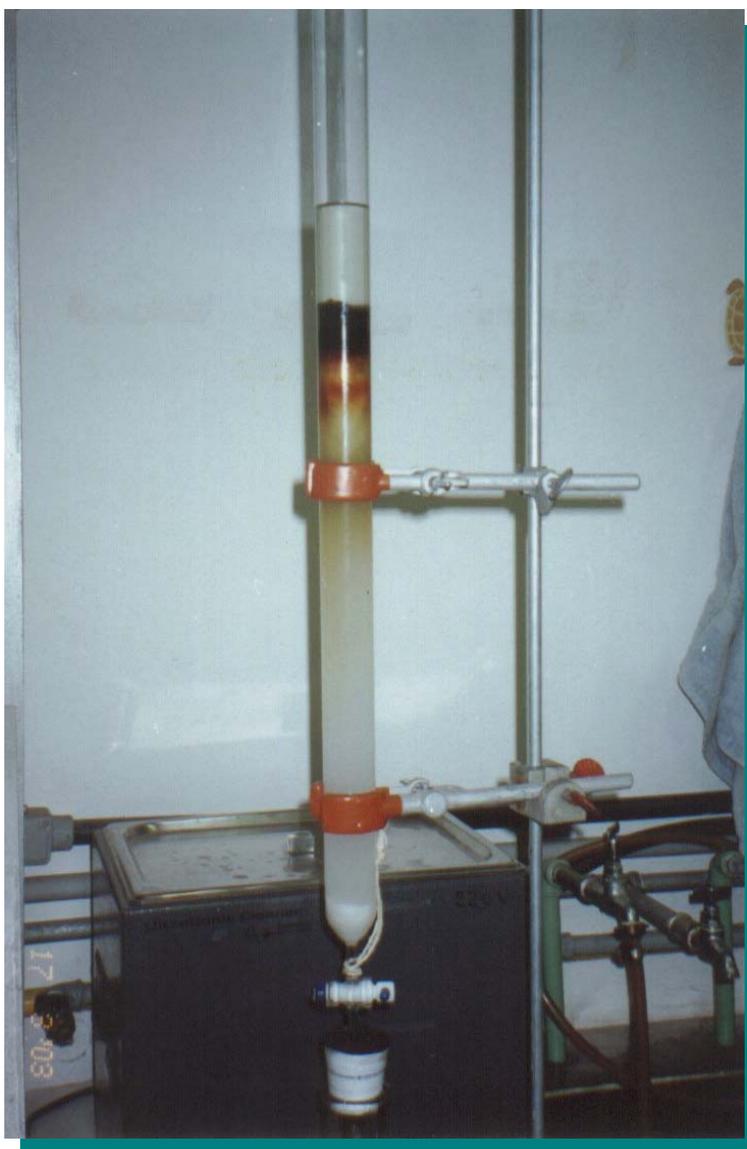


Figura 12: Coluna de gel de sílica 60 utilizada na separação do extrato hexânico total de folhas de *C.cerifera*.

A coluna foi eluída inicialmente com hexano, seguida de gradientes crescentes de hexano/acetato de etila, acetato de etila, gradientes crescentes de acetato de etila/metanol, e por fim metanol puro, obtendo-se manualmente um total de 324 frações (Esquema 2, pág. 38), que foram cromatografadas por cromatografia em camada delgada e reunidas em 19 junções. As junções 1, 2, 4, 5 e a fração 15 da junção 6 foram analisadas por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo possível a identificação das seguintes substâncias, com seus respectivos tempos de retenção: alfa-bisabolol (16,72 min.); 6,10,14-trimetil-pentadecanona-2 (16,87 min.), 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (20,04 min.); ésteres metílicos dos ácidos hexadecanóico (20,43 min.), heptadecanóico (21,94 min.), octadecadienóico-9,12 (22,97 min.), octadecenóico-9 (23,02 min.) e octadecanóico (23,36 min.); tricosano (25,48 min.); pentacosano (27,97 min.); heptacosano (30,25 min.); éster metílico do ácido tetracosanóico (30,79 min.); nonadeceno (33,39 min.); octacosano (34,36 min.); untriacontano (34,37 min.); nonacosano (36,21 min.).

Junção 1: EH-1-24 (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 16,72 *Alfa*-bisabolol

EM-IE *m/z* (%): 222[M]⁺(0), 204(31%), 161(13,8), 134(10,3), 119(96,6), 109(100), 93(44,8), 81(17,2), 79(39,7), 69(81), 55(18,9), 43(56,9).

TR/min: 20,43 Éster metílico do ácido hexadecanóico

EM-IE *m/z* (%): 270[M]⁺(17,2), 241(3,4), 227(20,7), 213(3,4), 199(6,9), 185(6,9), 171(6,9), 143(22,4), 129(8,6), 111(3,4), 97(8,6), 87(69), 74(100), 57(20,7), 43(19).

TR/min: 23,02 Éster metílico do ácido octadecenóico-9

EM-IE m/z (%): 310[M]⁺(0), 264(46,6), 222(29,3), 180(20,7), 125(20,7), 111(36,2), 97(70,7), 83(69), 69(79,3), 55(100), 41(62,1).

TR/min: 25,48 Tricosano

EM-IE m/z (%): 324[M]⁺(5,2), 267(1,7), 239(1,7), 197(3,4), 169(5,2), 141(8,6), 113(13,8), 99(24,1), 85(67,2), 71(82,8), 57(100), 41(55,2).

TR/min: 27,97 Pentacosano

EM-IE m/z (%): 352[M]⁺(5,2), 295(1,7), 267(3,4), 239(3,4), 197(5,2), 169(6,9), 141(8,6), 113(15,5), 85(65,5), 71(81), 57(100), 43(51,7).

TR/min: 30,25 Heptacosano

EM-IE m/z (%): 380[M]⁺(3,4), 337(1,7), 309(1,7), 281(1,7), 253(1,7), 225(1,7), 197(3,4), 169(5,2), 141(8,6), 113(15,5), 85(65,5), 71(81), 57(100), 43(51,7).

TR/min: 33,39 Nonadeceno

EM-IE m/z (%): 420[M]⁺(6,9), 392(1,7), 365(1,7), 323(1,7), 281(1,7), 239(1,7), 210(1,7), 182(3,4), 153(6,9), 125(24,1), 97(82,6), 83(65,5), 71(70,7), 57(100), 43(58,6).

TR/min: 34,36 Octacosano

EM-IE m/z (%): 436[M]⁺(1,7), 393(1,7), 365(1,7), 337(1,7), 309(1,7), 281(1,7), 253(1,7), 225(3,4), 197(5,2), 169(6,9), 141(8,6), 113(17,2), 99(24,1), 85(65,5), 71(81), 57(100), 43(65,5).

TR/min: 36,21 Nonacosano

EM-IE m/z (%): 464[M]⁺(1,7), 407(1,7), 379(1,7), 351(1,7), 323(1,7), 281(1,7), 253(1,7), 207(5,2), 169(6,9), 141(10,3), 113(17,2), 99(24,1), 85(65,5), 71(79,3), 57(100), 43(48,3).

Junção 2: EH-25-40 (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 20,43 Éster metílico do ácido hexadecanóico

EM-IE *m/z* (%): 270[M]⁺(17,2), 241(5,2), 227(19), 199(5,2), 185(6,9), 171(6,9), 143(22,4), 129(6,9), 97(6,9), 87(70,7), 74(100), 55(24,1), 43(20,7).

TR/min: 23,36 Éster metílico do ácido octadecanóico

EM-IE *m/z* (%): 298[M]⁺(29,3), 267(12,1), 255(22,4), 143(27,6), 129(13,8), 97(17,2), 87(79,3), 74(100), 55(34,5), 43(32,7).

Junção 4: EH-46-63 (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 16,72 Alfa-bisabolol

EM-IE *m/z* (%): 222[M]⁺(0), 204(31%), 161(13,8), 134(10,3), 119(96,6), 109(100), 93(44,8), 81(17,2), 79(39,7), 69(81), 55(18,9), 43(56,9).

TR/min: 20,44 Éster metílico do ácido hexadecanóico

EM-IE *m/z* (%): 270[M]⁺(22,4), 241(5,2), 227(24,1), 199(6,9), 185(6,9), 171(6,9), 143(25,9), 129(8,6), 101(6,9), 87(67,2), 74(100), 57(17,2), 43(24,1).

TR/min: 23,02 Éster metílico do ácido octadecanóico-9

EM-IE *m/z* (%): 296[M]⁺(0), 264(44,8), 222(24,1), 180(20,7), 123(24,1), 111(31), 98(41,4), 84(68,7), 69(68,7), 55(100), 41(56,9).

TR/min: 34,37 Untriacontano

EM-IE *m/z* (%): 436[M]⁺(1,7), 365(1,7), 323(1,7), 295(1,7), 267(3,4), 225(3,4), 197(3,4), 169(6,9), 141(8,6), 12,6(10,3), 113(17,2), 99(24,1), 85(67,2), 71(82,8), 57(100), 43(50).

Junção 5: EH- 71-79 (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 16,87 6,10,14-trimetil-pentadecanona-2

EM-IE m/z (%): 268[M]⁺(0%), 250(1,9), 179(1,6), 165(2,6), 151(1,3), 137(3,2), 124(9,7), 109(17,4), 95(16,8), 85(20,6), 71(43,2), 58(100).

TR/min: 20,04 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol

EM-IE m/z (%): 296[M]⁺(0), 278(3,2), 208(1,3), 179(1,3), 165(1,9), 151(2,9), 137(5,8), 123(48,4), 109(20,6), 95(57,4), 82(70,9), 68(85,8), 57(100).

TR/min: 20,37 Éster metílico do ácido octadecanóico

EM-IE m/z (%): 312[M]⁺(7,1), 269(2,6), 255(1,6), 227(1,6), 213(3,9), 199(1,6), 171(1,6), 157(12,6), 143(4,5), 129(1,9), 115(4,5), 101(46,5), 88(100), 70(16,1), 55(40,0).

Junção 6: EH – F15 - 80-107V (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 20,40 Éster metílico do ácido hexadecanóico

EM-IE m/z (%): 270[M]⁺(20,7), 241(5,2), 227(20,7), 213(3,4), 199 (6,9), 185 (8,6), 171 (6,9), 157 (3,4), 143 (24,1), 129 (10,6), 115 (1,7), 97 (6,9), 87 (72,4), 74 (100), 57 (22,4), 43 (20,7).

TR/min: 21,94 Éster metílico do ácido heptadecanóico

EM-IE m/z (%): 284[M]⁺(31), 255 (13,8), 241(24,1), 199 (12,1), 185 (15,5), 143 (27,6), 129 (12,1), 97 (8,6), 87 (77,6), 74 (100), 57 (20,7), 43 (24,1).

TR/min: 22,97 Éster metílico do ácido octadecadienóico-9,12

EM-IE m/z (%): 294[M]⁺(24,1), 263(19), 150(17,2), 134(17,2), 123(20,7), 109(43,1), 95(72,4), 81(96,6), 67(100), 55(63,8), 41(44,8).

Estudo da Partição em Acetato de Etila do Extrato Bruto Etanólico das Folhas de *Copernicia cerifera*

A partição de acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Copernicia cerifera* foi submetido à separação por adsorção em coluna de gel de sílica 60. Uma coluna foi empacotada com 10g de gel de sílica, utilizando o hexano como solvente. No topo da coluna foi aplicada uma pastilha preparada com 1,35 g de uma amostra, misturada com um pouco da mesma sílica com a qual a coluna foi preparada. A coluna foi eluída inicialmente com clorofórmio, seguida de gradientes crescentes de clorofórmio/acetato de etila, acetato de etila, gradientes crescentes de acetato de etila/metanol, e por fim metanol puro, obtendo-se manualmente um total de 122 frações (Esquema 3, pág. 42), que foram cromatografadas por cromatografia em camada delgada e reunidas em 11 junções. As junções 1, 2, 5 foram analisadas por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo possível a identificação das seguintes substâncias, com seus respectivos tempos de retenção: ésteres metílicos dos ácidos 4-metóxi-benzóico (11,20 min.) e 4-hidroxi-benzóico (13,14 min.); o éster dimetílico do ácido nonanedióico (14,33 min.); o éster metílico do ácido 3,4-dimetóxi-benzóico (15,34 min.), o alfa-bisabolol (16,72 min.); os ésteres metílicos dos ácidos 3-(4-metóxi-fenil) propenóico-2 (16,78 min.), 3,4,5-trimetóxi-benzóico (17,55 min.), 3-(3,4-dimetóxi-fenil) propenóico-2 (20,06 min.), hexadecanóico (20,43 min.), octadecanóico-9 (23,02 min.), octadecanóico (23,36 min.).

Junção 1 - FAE-1-20V (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 20,43 Éster metílico do ácido hexadecanóico

EM-IE *m/z* (%): 270[M]⁺(20,7), 241(8,6), 227(20,7), 213(3,4), 199(8,6), 185(8,6), 171(8,6), 157(3,4), 143(24,5), 129(10,3), 115(3,4), 97(6,9), 87(74,9), 74(100), 57(18,9), 43(24,5).

TR/min: 23,36 Éster metílico do ácido octadecanóico

EM-IE *m/z* (%): 298[M]⁺ (27,1), 267(10,3), 255(20,7), 199(13,8), 143(26,7), 129(8,6), 97(12,1), 87(68,9), 74(100), 69(13,8), 57(20,7), 43(31,1).

Junção 2 - FAE-21-24V (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 16,72 Alfa-bisabolol

EM-IE *m/z* (%): 204[M]⁺(36,2), 161(15,5), 134(10,3), 119(89,5), 109(100), 93(51,7), 79(39,6), 69(87), 55(25,8), 43(62,6).

TR/min: 20,43 Éster metílico do ácido hexadecanóico

EM-IE *m/z* (%): 270[M]⁺ (18,9), 241(3,4), 227(17,2), 213(3,4), 199(5,2), 185(6,9), 171(6,9), 157(3,4), 143(24,1), 129(10,3), 115(3,4), 101(5,2), 97(6,9), 87(68,9), 74(100), 57(18,9), 43(20,7).

TR/min: 23,02 Éster metílico do ácido octadecanóico-9

EM-IE *m/z* (%): 296[M]⁺(10,3), 264(43), 222(29,3), 180(20,7), 152(13,8), 137(17,2), 111(37,9), 97(60,3), 83(68,9) 74(68,9), 55(100), 43(5,2).

Junção 5 - FAE-28-35V (Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min)

TR/min: 11,20 Éster metílico do ácido 4-metóxi-benzóico

EM-IE m/z (%): 166[M]⁺(39,7), 135(100), 107(10,3), 92(12,1), 77(15,5), 64(6,9), 44(5,2).

TR/min: 13,14 Éster metílico do ácido 4-hidroxi-benzóico

EM-IE m/z (%): 152[M]⁺(39,7), 135(1,7), 121(100), 107(1,7), 93(19), 74(1,7), 65(13,8), 53(1,7), 44(1,7).

TR/min: 14,33 Éster dimetílico do ácido nonanedióico (Ácido azeláico)

EM-IE m/z (%): 185[M]⁺(56,9), 152(100), 143(41,4), 124(27,6), 111(50), 97(25,9), 87(24,1), 74(55,2), 69(6,9), 55(39,7), 41(20,7).

TR/min: 15,34 Éster metílico do ácido 3,4-dimetóxi-benzóico

EM-IE m/z (%): 196[M]⁺(100), 181(8,6), 165(8,6), 149(3,4), 137(6,9), 121(8,6), 107(6,9), 94(5,2), 79(13,8), 63(3,4), 51(5,2), 44(3,4).

TR/min: 16,78 Éster metílico do ácido 3-(4-metóxi-fenil) propenóico-2

EM-IE m/z (%): 192[M]⁺(75,9), 161(100), 147(3,4), 133(27,6), 118(10,3), 103(5,2), 89(10,3), 77(6,9), 63(6,9), 44(5,2).

TR/min: 17,55 Éster metílico do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico

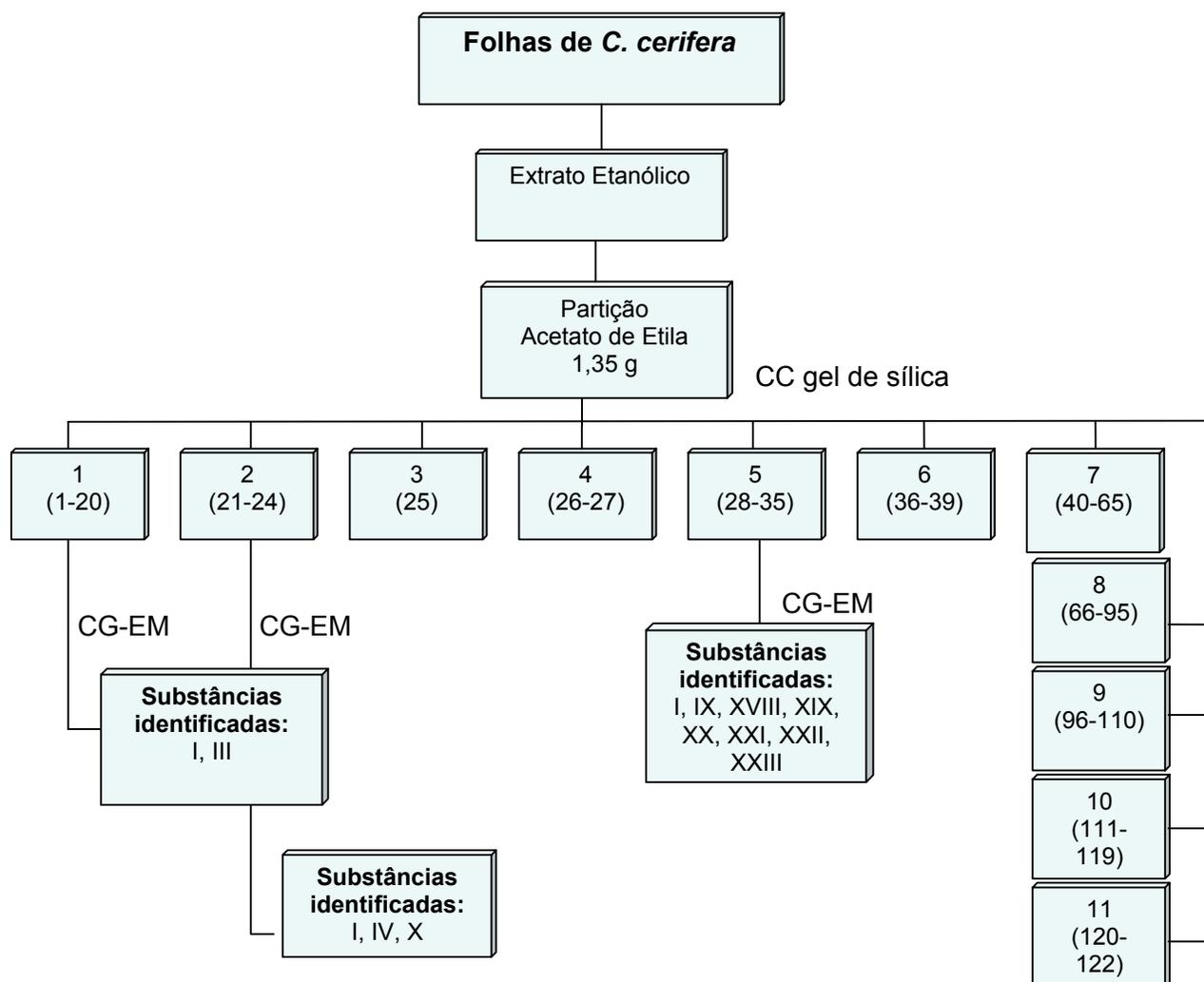
EM-IE m/z (%): 226[M]⁺(100), 211(43,1), 195(24,1), 183(6,9), 168(3,4), 155(19), 137(3,4), 125(6,9), 109(5,2), 95(3,4), 81(3,4), 66(3,4), 53(3,4), 44(5,2).

TR/min: 20,26 Éster metílico do ácido 3-(3,4-dimetóxi-fenil) propenóico-2

EM-IE m/z (%): 222[M]⁺(100), 207(15,5), 191(48,3), 147(10,3), 44(15,5).

TR/min: 20,43 Éster metílico do ácido hexadecanóico

EM-IE m/z (%): 270[M]⁺(20,7), 227(10,3), 199(6,9), 171(8,6), 143(24,1), 129(10,3), 97(8,6), 87(74,1), 74(100), 57(12,1), 43(24,1).



Esquema 3: Fluxograma da purificação da fração em acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *C. cerifera*, amostras enviadas para análise por CG-EM e identificação das substâncias presentes nas junções analisadas.

Estudo do Óleo Fixo de *Serenoa repens*

A cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foi realizada em aparelho HEWLETT PACKARD HP 5890 SII, equipado com detector seletivo de massas modelo 5973 e um injetor automático modelo 5683, todos da Agilent Technologies. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV utilizando o PFK como referência. Os dados foram adquiridos via HP CHEMSTATION Data Acquisition software. As condições cromatográficas foram as seguintes: gás de arraste: hélio; detector de massas; vazão: 1,0 ml/min; split: 1:20; volume de injeção: 1,0 ml; temperatura inicial: 60° C; programação de temperatura: 10° C/min até 280° C; temperatura do injetor: 260° C; temperatura do detector: 280° C; tempo de corrida: 60 minutos.

O óleo obtido dos frutos da palmeira *Serenoa repens* foi cedido pelo laboratório Herbarium. Quando disponível comercialmente, o óleo de *S. repens* é associado com óleo de semente de abóbora e vitamina E, dispensado em cápsulas com a marca de Prostatal®. Após análise, foi possível evidenciar a presença de uma mistura de substâncias através da análise do cromatograma. As substâncias foram identificadas por meio do seu espectro de massas como sendo os seguintes ésteres metílicos de ácidos graxos, com seus respectivos tempos de retenção: ácido dodecanóico (31,39 min.), ácido tetradecanóico (37,31 min.), ácido hexadecanóico (42,73 min.), ácido octadecanóico-9 (47,20 min.) e o ácido octadecanóico (47,65 min.) (Esquema 4, pág. 44).

TR/min: 31,39 Éster metílico do ácido dodecanóico (ác. láurico)

EM-IE m/z (%): 214[M]⁺(1,88), 183(1,88), 171(3,13), 157(1,25), 143(5,94), 129(3,13), 115(2,19), 101(3,44), 87(43,44), 74(100), 55(36,88).

TR/min: 37,31 Éster metílico do ácido tetradecanóico (ác. mirístico)

EM-IE m/z (%): 242[M]⁺(1,25), 199(2,81), 185(0,94), 157(1,25), 143(5,94), 129(2,19), 101(4,38), 87(45,63), 74(100), 55(40,00).

TR/min: 42,73 Éster metílico do ácido hexadecanóico (ác. palmítico)

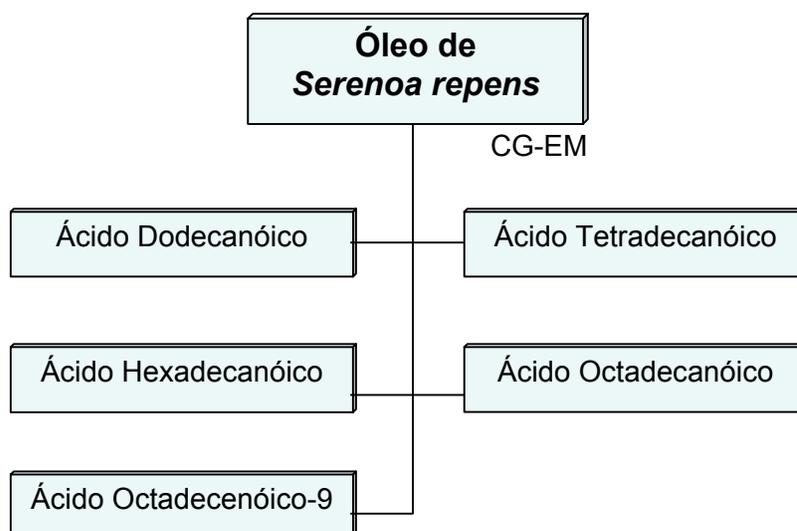
EM-IE m/z (%): 270[M]⁺(1,56), 227(0,94), 173(1,25), 143(5,00), 129(2,81), 111(1,25), 97(4,06), 87(46,88), 74(100), 55(42,50).

TR/min: 47,20 Éster metílico do ácido Octadecanóico-9 (ác. oléico)

EM-IE m/z (%): 296[M]⁺, 264(2,19), 222(1,25), 180(1,88), 166(0,94), 152(1,56), 137(2,50), 123(4,69), 110(7,50), 96(18,13), 83(25,00), 69(40,63), 55(100).

TR/min: 47,65 Éster metílico do ácido Octadecanóico (ác. esterárico)

EM-IE m/z (%): 298[M]⁺(0,94), 143(3,44), 129(2,19), 111(0,94), 97(5,00), 87(49,38), 74(100), 55(48,75).



Esquema 4: Identificação por CG- EM dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo de *Serenoa repens*.

II – ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

1 – Materiais e Métodos

As leituras de absorvância nos testes de atividade antioxidante (AAO) foram realizadas em espectrofotômetro de UV-VIS Shimadzu UV 1601 a 518 nm. O agente oxidante 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) utilizado nos teste de atividade antioxidante foi obtido da empresa SIGMA.

Os camundongos machos Swiss 44 utilizados nos ensaios biológicos de atividade analgésica e antiinflamatória foram comprados do Biotério Central do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e pesavam entre 17 e 20 gramas.

2 – Ensaio Químico

2.1 – Atividade Antioxidante pelo Teste do DPPH

Esse teste é realizado rotineiramente no laboratório do Prof. Dr. Fábio de Sousa Menezes. Foram testados os extratos etanólicos das folhas, frutos e cascas de *Copernicia cerifera*. Os extratos hexânicos das folhas, frutos e cascas não foram testados por saber-se que extratos lipofílicos apresentam pouca ou nenhuma atividade antioxidante quando avaliados por este método.

Nesse ensaio utiliza-se método fotolorimétrico, em triplicata, com o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) na concentração inicial de 0,3 mM, em etanol. A partir de cada extrato é preparada uma solução-mãe de 1mg/ml em etanol, de onde são preparadas soluções diluídas nas concentrações de 250, 125, 50, 25, 10 e 5µg/ml.

Para a realização do teste, 1 ml da solução de DPPH 0,3 mM é adicionada a 2,5 ml de uma solução diluída do extrato em estudo. Para os brancos, ao invés do DPPH, adiciona-se 1 ml de etanol aos extratos diluídos. O controle negativo é preparado com 1 ml de DPPH e 2,5 ml de etanol. Como controle positivo, para fins de comparação, foi utilizada a rutina, um flavonóide que possui alta capacidade antioxidante e o extrato padronizado de *Ginkgo biloba*, também com reconhecida atividade antioxidante.

O DPPH (figura 13) possui uma coloração roxa intensa e a reação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo descolorimento da solução testada, ao final da qual a mesma poderá tornar-se amarelada. Trinta minutos após a adição da solução de DPPH a todas as amostras, é feita a leitura em espectrofotômetro de UV em 518 nm.

Todas as leituras são realizadas em triplicata e, com os dados obtidos, é calculada a atividade antioxidante dos extratos em estudo, através da seguinte fórmula:

$$\text{AAO\%} = 100 - \{[(\text{ABS}_A - \text{ABS}_B) \times 100] / \text{ABS}_B\}$$

Os resultados foram expressos em valores de CE_{50} (que é a concentração efetiva para se obter 50% da atividade antioxidante máxima, estimada em 100%), obtidos por regressão linear ou logarítmica, com coeficiente de determinação $r^2 \geq 0,80$ (MENSOR *et al.*, 2001).

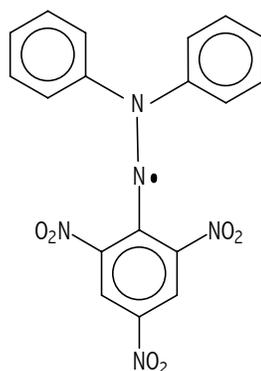


Figura 13: Estrutura química do DPPH

3 – Ensaios Biológicos

3.1 – Atividade Antioxidante sobre Células de *Saccharomyces cerevisiae*

Este ensaio foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Elis Cristina Araújo Eleutherio.

Em todos os ensaios as células de *S. cerevisiae* foram crescidas em meio YPD 2% (2% de glicose; 1% de extrato de levedo; 2% de peptona), a 28°C/160 rpm, em frascos cônicos contendo 20% do seu volume preenchido com o meio. As células eram coletadas com uma concentração de 0,5 – 1,0 mg (peso seco)/ml e re-inoculadas em meio fresco contendo somente a droga (peróxido de *tert*-butila) ou droga juntamente com o extrato (na concentração final de 5 mg/ml de meio). A concentração inicial de células em todas as condições era de 0,1 mg/ml e os cultivos permaneciam a 28°C/160 rpm em frascos cobertos com papel laminado. Após 3,5 ou 17 h de incubação, determinava-se a tolerância celular por plaqueamento em meio YPD 2% sólido. As colônias eram contadas após 72 h de crescimento a 28°C e a porcentagem de sobrevivência calculada em relação ao cultivo que não recebia nenhuma droga (controle).

3.2 – Atividade Analgésica dos Extratos de *Copernicia cerifera*

Os ensaios de atividade analgésica foram realizados em colaboração com o Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da UFRJ, com as Profas. Dras. Maria Eline Matheus e Patrícia Dias Fernandes.

Os testes foram realizados com os extratos etanólico e hexânico totais obtidos das folhas, extrato hexânico dos frutos e com extrato butanólico das folhas, obtido através de partição líquido-líquido do extrato etanólico total de *C. cerifera*.

Para a avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos de *Copernicia cerifera*, foram usadas metodologias experimentais tradicionais em camundongos: o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (WHITTLE, 1964), o teste de retirada da cauda ou “tail flick” (BEM-BASSAT *et al.*, 1959; KURAISHI *et al.*, 1983) e o teste da placa quente ou “hot plate” (KURAISHI *et al.*, 1983) tiveram o objetivo de avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos testados; os testes com formalina e do edema de orelha (SCHIANTERELLI *et al.*, 1982) tiveram como objetivo avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos de *C. cerifera*.

Em todos os testes foram utilizados camundongos Swiss 44, pesando entre 17 e 20 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da UFRJ, com livre acesso à ração e à água, mantidos em ciclos claros e escuros de 12 horas. Cerca de 12 horas antes de cada experimento, os animais eram deixados em jejum, sendo mantidos somente com água. Todos os extratos testados foram diluídos em DMSO até obtenção de soluções com concentrações finais de 100mg/ml. Estas soluções foram armazenadas a 8°C até serem utilizadas no experimento. No momento da realização dos testes, os extratos foram diluídos com PBS (tampão fosfato-salina) estéril. Foi administrada dose de 100 mg/kg, por via oral, com um volume final de 0,1ml. Cada grupo experimental foi constituído de 7 animais para a avaliação da atividade analgésica periférica, e 5 animais para a avaliação da atividade analgésica central. Os animais do grupo controle receberam somente o veículo utilizado na solubilização dos extratos. Os resultados foram tratados

estatisticamente com a aplicação do teste t de Student. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é feito pela sua administração intra-peritoneal (i.p.) em camundongos.

As contorções são definidas por uma série de contrações e alongamentos dos músculos abdominais, acompanhados por torção do tronco e seguidos por extensão dos membros posteriores, promovendo o contato do músculo abdominal dos camundongos com o fundo do recipiente em que os mesmos se encontram.

Os animais foram tratados 1 hora antes do teste com as soluções dos extratos etanólicos das folhas e hexânico dos frutos de *Copernicia cerifera*, na dose de 100mg/kg. Decorrido esse tempo, foi administrada uma injeção i.p. de uma solução de ácido acético a 2%, em um volume de 0,5 ml, para a indução de contorções abdominais. Decorridos 5 minutos desta injeção, e pelos 20 minutos subseqüentes, foram contadas as contorções abdominais desenvolvidas. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do número total de contorções. Utilizou-se como controle positivo a Indometacina, na dose de 10 mg/kg.

Teste de Retirada de Cauda ou “Tail-Flick”

Neste teste o camundongo é imobilizado no interior de um pequeno cilindro de plástico rígido e com ventilação, de tal forma que a cauda permaneça para o lado de fora do tubo. Quando a cauda é deixada imersa em banho-maria, com água aquecida a

(50 ± 1)°C, um cronômetro é acionado, sendo parado apenas no momento em que o animal retira a cauda do banho. Este tempo é denominado tempo de latência, e é expresso em segundos. As medidas foram realizadas nos tempos de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos após a administração dos extratos já citados, na dose de 100 mg/kg.

Os limiares de resposta ao teste foram normatizados através do índice de antinocicepção da retirada da cauda (IARC), calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{IARC} = (\text{valor médio} - \text{linha base}) / (\text{cut-off} - \text{linha base})$$

onde a linha base é a média dos grupos controle e o cut-off é 3 vezes o valor da linha base. Neste ensaio também se avalia o aumento do tempo de resposta dos animais (BEM-BASSAT *et al.*, 1959; KURAISHI *et al.*, 1983).

Neste modelo foi feito um grupo controle positivo com o fentanil (um anestésico opióide), por via oral, na dose de 300 µg/kg. Foram efetuadas oito marcações com este grupo de animais, sendo duas antes da administração do fármaco - que foram usadas para calcular a média do grupo controle no cálculo do IARC - e as demais nos mesmos tempos que os grupos tratados com as amostras.

Teste da Placa Quente ou “Hot Plate”

Neste teste os animais foram tratados com o extratos etanólico e butanólico da partição líquido-líquido do extrato etnólico das folhas de *Copernicia cerifera*, na dose de 100 mg/kg. Após e a cada 30 minutos, os animais foram colocados, um a um, sobre uma placa aquecida a (55 ± 1)°C. A resposta observada é o ato de retirar ou lambe uma ou ambas as patas dianteiras. Registrou-se, com o auxílio de um cronômetro, o tempo decorrido desde o momento em que o animal foi colocado sobre a placa quente

até o momento da resposta. O fentanil foi utilizado como controle positivo, na dose de 300 µg/kg. O tempo de cut-off (tempo máximo que o animal poderia permanecer sobre a placa) estabelecido foi de 30 segundos. Este tempo refere-se ao tempo máximo que o animal pode ser mantido sobre a placa quente, sem que ocorra lesões dos tecidos do animal que estão em contato com a placa.

3.3 – Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos Extratos de *Copernicia cerifera*

Os extratos etanólico e hexânico de folhas, a partição butanólica do extrato etanólico e o extrato hexânico dos frutos de *Copernicia cerifera* foram avaliados quanto à sua atividade antiinflamatória. Neste tipo de avaliação, foram realizados os testes da formalina e do edema de orelha. Estes ensaios também foram realizados em colaboração com a equipe das Profas. Dras. Maria Eline Matheus e Patrícia Dias Fernandes, pesquisadoras do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da UFRJ. As condições em que os camundongos foram mantidos e a forma de preparação dos extratos foram as mesmas descritas para a avaliação da atividade analgésica. Foi administrada dose de 100 mg/kg da solução, por via oral, com um volume final de 0,1 ml. Cada grupo experimental foi composto de 5 ou 7 animais, para os testes da formalina e edema de orelha, respectivamente. No grupo controle, os animais receberam somente o veículo utilizado na solubilização dos extratos. Os resultados foram tratados estatisticamente com a aplicação do teste t de Student, sendo o valor de $p \leq 0,05$ considerado como significativo.

Teste do Edema de Orelha

Os camundongos foram tratados 1 hora antes do ensaio com os extratos em estudo, na dose de 100 mg/kg, por via oral. Cada animal recebeu 10 μ L de uma solução recém-preparada de óleo de cróton (2,5% v/v em acetona) sobre a superfície interna da orelha direita e o mesmo volume de acetona na orelha esquerda. Como controle positivo utilizou-se 1mg/kg de dexametasona (um antiinflamatório esteroídico) e 10 mg/kg de indometacina (um antiinflamatório não esteroídico), ambos por via oral. Como controle negativo foi utilizado o PBS. Após 4 horas da aplicação do estímulo edematogênico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Das orelhas, foram removidos discos de 6 mm de diâmetro, os quais foram pesados em balança analítica. Os resultados foram expressos como as médias das diferenças de peso entre as orelhas em que foi aplicado o óleo de cróton e as orelhas em que foi aplicada a acetona (SCHIANTERELLI *et al.*, 1982).

Teste da Formalina

O processo algésico se desenvolve em duas fases distintas. A primeira em intervalo de tempo de 0 a 5 minutos após a aplicação da injeção, sendo caracterizada pela ativação direta das terminações nervosas. A segunda fase se desenvolve no intervalo de 15 a 30 minutos após a administração da injeção subplantar, como resposta à liberação de mediadores endógenos da inflamação (substância P, bradicinina, prostaglandina). Quantificou-se o tempo no qual o animal permaneceu lambendo a pata traseira em cada uma das fases citadas.

Para a realização do teste, administrou-se 0,05 ml de formalina 0,2% com injeção subplantar, em uma das patas traseiras do camundongo. Foi administrado o extrato-teste 1 hora antes, por via oral e foi observado o comportamento do animal quanto ao número de vezes que este lambia a pata traseira onde havia sido administrada a formalina. Os controles são realizados com PBS e DMSO 20%.

3.4 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *Copernicia cerifera*

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no Setor de Testagem de Drogas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, na Fundação Osvaldo Cruz, sob supervisão da Dr^a Maria Cristina Lourenço.

Para o teste da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (suscetível à oxacilina e penicilina) e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, as Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (beta-lactamase negativa), e o bacilo ácido-resistente *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294. As metodologias empregadas foram a de Alamar Blue para *Mycobacterium tuberculosis* (COLLINS & FRANZBLAU, 1997), e a de microdiluição em caldo para todos os outros microorganismos utilizados (LUBER *et al.*, 2003).

Foram testados os extratos hexânicos de frutos e folha e o extrato etanólico dos frutos de *Copernicia cerifera*.

Microdiluição em Caldo

Várias colônias de cada cepa foram transferidas para tubos com 5 ml de caldo Mueller-Hinton até atingirem concentrações de aproximadamente 5 a 6 log CFU/ml. Estas pré-culturas foram incubadas por 24 horas a 37°C, em atmosfera microaerofílica constituída de 55% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂. Para a preparação do inoculo, foram transferidos 150µL de cada pré-cultura para 10 ml de caldo Mueller-Hinton, resultando em uma suspensão com 6 a 7 log CFU/ml. Cada poço das placas “Sensititre microtiter” utilizado para o teste de suscetibilidade foi preenchido com 100µL da suspensão e soluções dos extratos a serem testados, na concentração de 100µL/ml. As placas foram seladas com filme anaeróbico e microaerofílico, e incubadas a 37°C sob condições microaerofílicas. Os resultados dos testes foram avaliados após 24 horas de incubação. Foi utilizado como controle interno 10µg/ml de gentamicina. O controle de crescimento foi 7H9 e cepa padrão (LUBER *et al.*, 2003).

Alamar Blue

Foram utilizadas microplacas com 96 poços. Os poços do perímetro externo foram preenchidos com água estéril para prevenir a desidratação dos poços que foram utilizados no experimento. O inóculo foi diluído em 7H9 (1:2) e 0,1 ml foi adicionado a cada poço. Os extratos foram inicialmente diluídos em DMSO e depois em 0,1 ml de 7H9 nas microplacas obtendo-se uma concentração de 100µg/ml. Foram utilizados como controle poços contendo somente os extratos (E), somente bactéria (B) e somente o meio de cultura (M). As placas foram incubadas a 37°C por quatro dias, e só então foram adicionados 20 ml de solução de Alamar Blue e 12,5 ml de Tween 80 a

20% a um poço B e M. As placas foram reincubadas a 37°C e observadas por 12 e 24 horas para mudança de coloração do azul para rosa. Ocorrendo mudança na cor do poço B em até 24 horas, coloca-se reagente em toda a placa. Não ocorrendo mudança de cor, testa-se outros poços B e M e repete-se a operação. A MIC seria definida como a menor concentração do extrato que evitaria uma mudança de coloração. Foi utilizado como controle interno 7H9, cepa padrão e rifampicina na concentração de 1µg/ml. O controle de crescimento empregado foi 7H9 e cepa padrão (COLLINS & FRANZBLAU, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I – FITOQUÍMICA

1 - Extrato Bruto Hexânico das Folhas de *Copernicia cerifera*

O extrato bruto hexânico das folhas de *C. cerifera* foi fracionado em coluna de gel de sílica, eluída em hexano, gradientes crescentes de hexano/acetato de etila, acetato de etila, gradientes crescentes de acetato de etila/metanol até metanol puro. Assim foram obtidas 324 frações, que foram cromatografadas por cromatografia em camada delgada e reunidas em 19 junções. As junções 1, 2, 4 e 5 foram analisadas por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Através do cromatograma obtido foi possível a identificação das seguintes substâncias, com seus respectivos tempos de retenção: alfa-bisabolol (16,72 min.); 6,10,14-trimetil-pentadecanona-2 (16,87 min.), 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (20,04 min.); ésteres metílicos dos hexadecanóico (20,43 min.), heptadecanóico (21,94 min.), 9,12 octadecadienóico (22,97 min.), octadecenóico-9 (23,02 min.) e octadecanóico (23,36 min.); tricosano (25,48 min.); pentacosano (27,97 min.); heptacosano (30,25 min.); éster metílico do ácido tetracosanóico (30,79 min.); nonadeceno (33,39 min.); octacosano (34,36 min.); untriacontano (34,37 min.); nonacosano (36,21 min.) (Cromatogramas 1 a 4, págs. 58, 63, 65 e 68, respectivamente). As respectivas massas moleculares das substâncias citadas são: 222, 268, 278, 270, 284, 294, 296, 298, 324, 352, 380, 382, 266, 394, 436 e 408 (Espectros 1 a 18, págs. 59 a 70).

A junção 6 foi fracionada em coluna de gel de sílica, eluída em hexano, gradientes crescentes de hexano/acetato de etila, acetato de etila, gradientes crescentes de acetato de etila/metanol até metanol puro (tal como se procedeu para

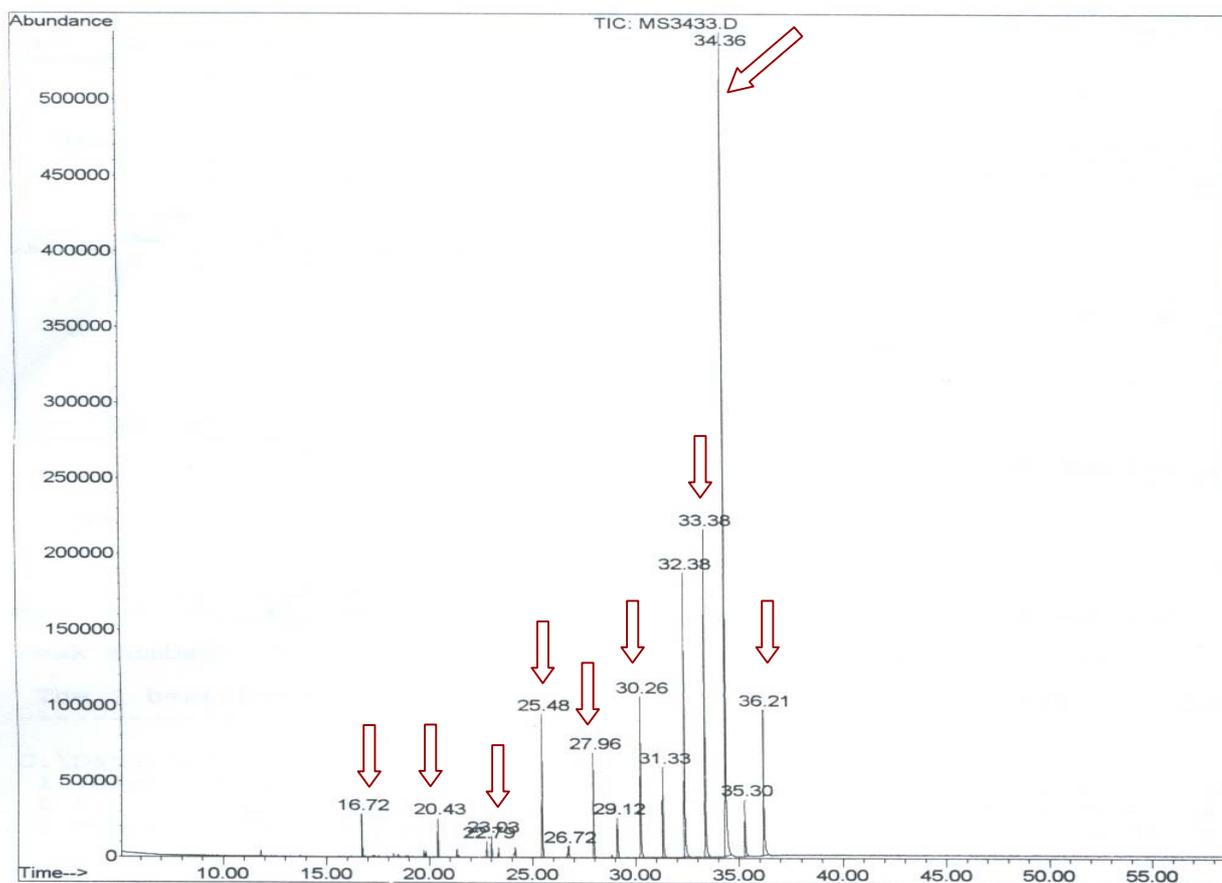
o extrato hexânico bruto). Assim foram obtidas 47 frações, que foram cromatografadas por cromatografia em camada delgada e reunidas em 11 junções.

A fração 15 (que não foi reunida em nenhuma junção) foi analisada por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Através do cromatograma obtido foi possível a identificação das seguintes substâncias, com seus respectivos tempos de retenção: ésteres metílicos dos ácidos hexadecanóico (20,40 min.), heptadecanóico (21,91 min.), 9,12-octadecadienóico (22,97 min.), octadecenóico-9 (23,02 min.), octadecanóico (23,36 min.), tetracosanóico (30,79 min.), (Cromatograma 5, pág. 71). As respectivas massas moleculares das substâncias citadas são: 270, 284, 294, 296, 298 e 382 (Espectros 19 a 24, págs 72 e 73).

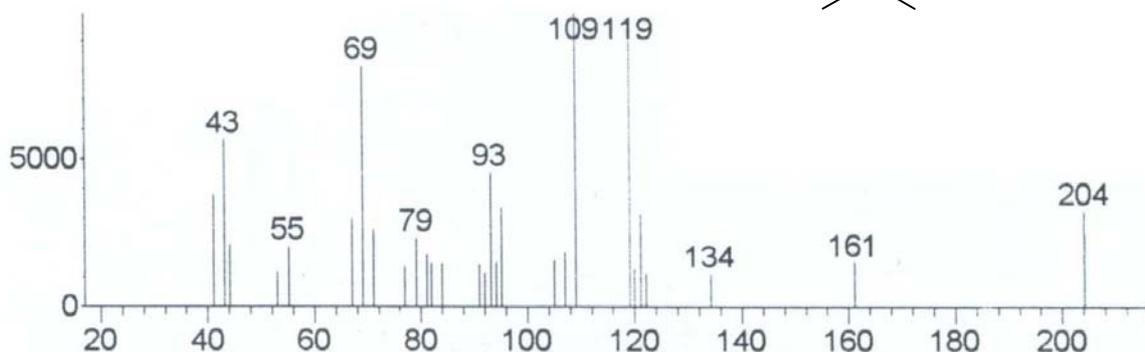
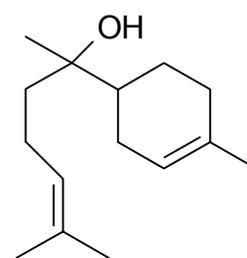
× **Junção 1: EH 1-24** – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min.

Tabela 2 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 1-24 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de *C. cerifera*.

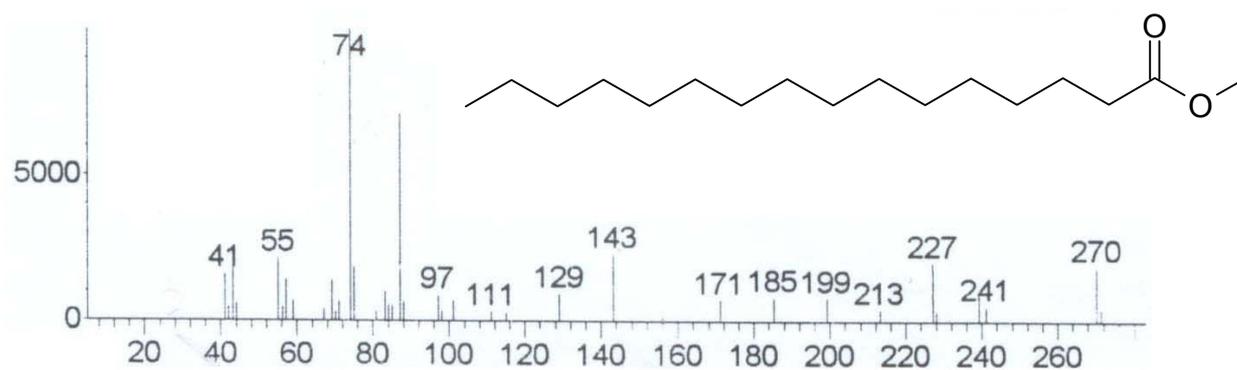
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
16,72	<i>Alfa</i> -bisabolol	93%
20,43	Éster metílico do ácido hexadecanóico	97 %
23,02	Éster metílico do ácido octadecenóico-9	93 %
25,48	Tricosano	94 %
27,97	Pentacosano	99 %
30,25	Heptacosano	99 %
33,38	Nonadeceno	95 %
34,36	Octacosano	99 %
36,21	Nonacosano	91%



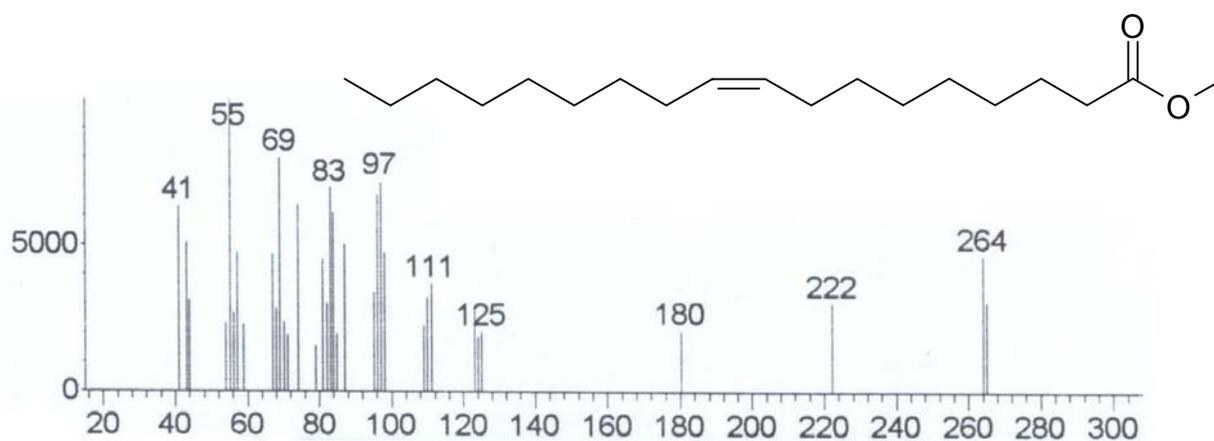
Cromatograma 1: Cromatograma da junção EH 1-24, obtido por CG-EM



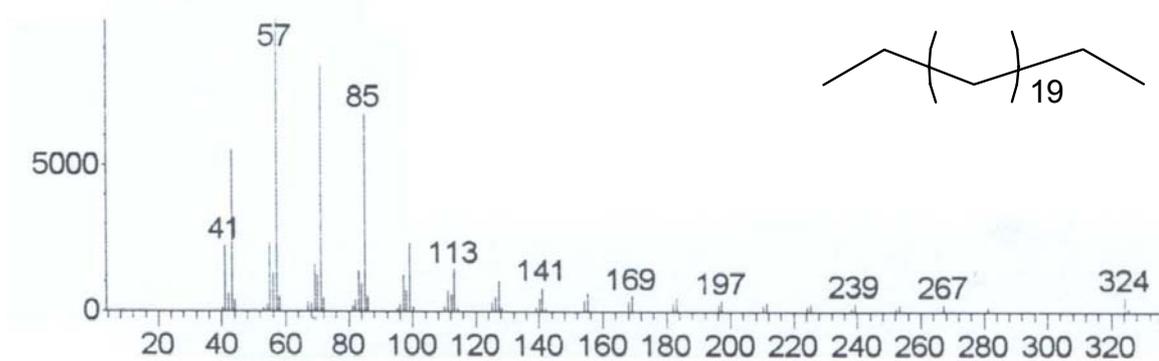
Espectro 1: Espectro de massas do alfa-bisabolol



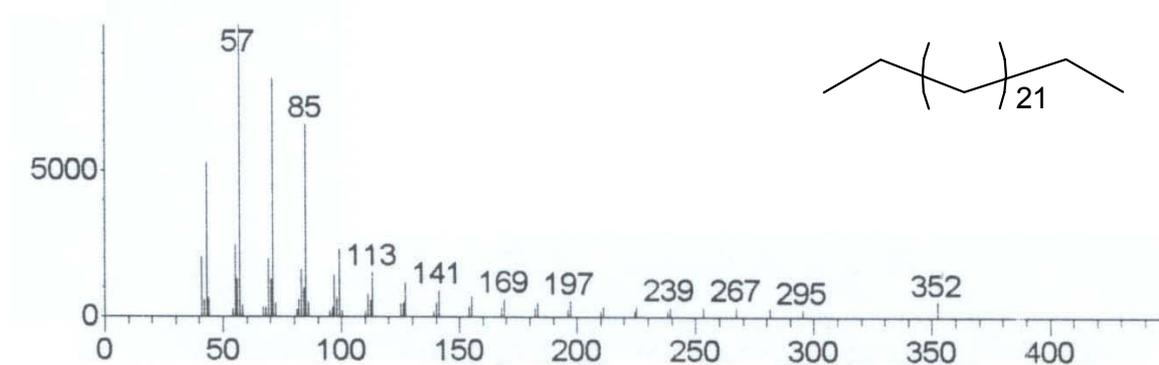
Espectro 2: Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico



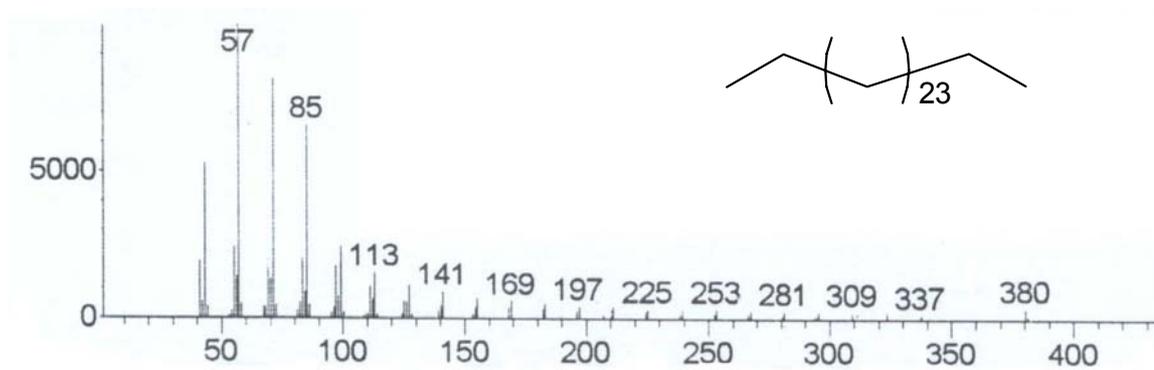
Espectro 3: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9



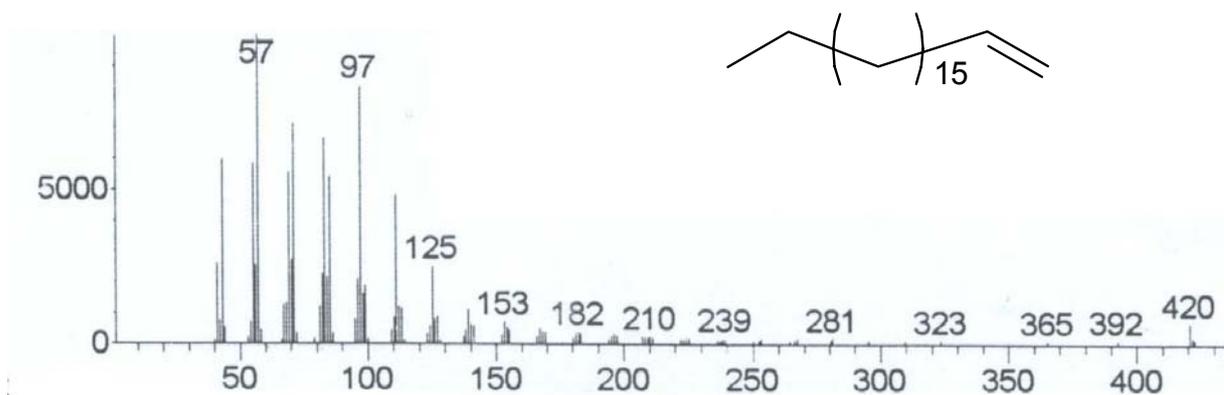
Espectro 4: Espectro de massas do tricosano



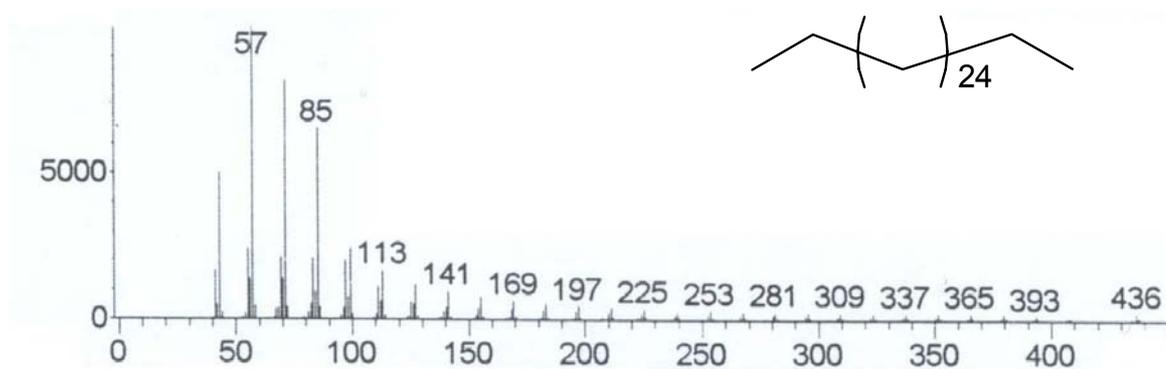
Espectro 5: Espectro de massas do pentacosano



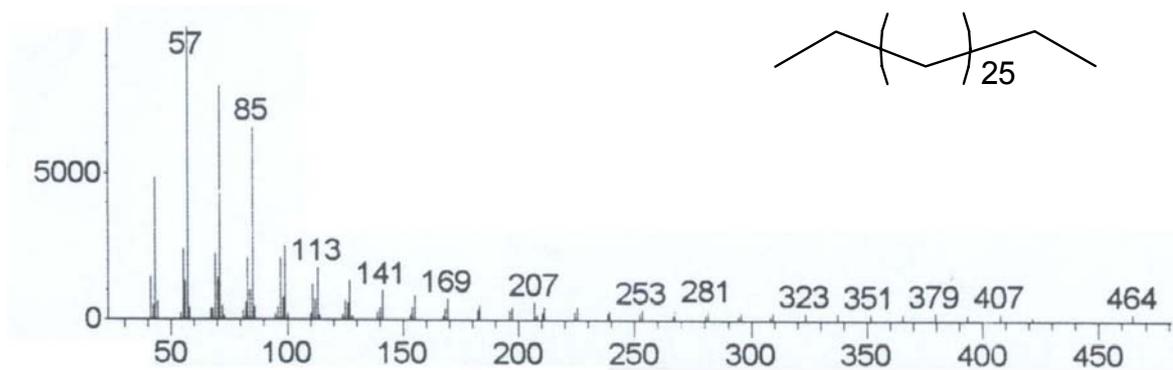
Espectro 6: Espectro de massas do heptacosano



Espectro 7: Espectro de massas do nonadeceno



Espectro 8: Espectro de massas do octacosano

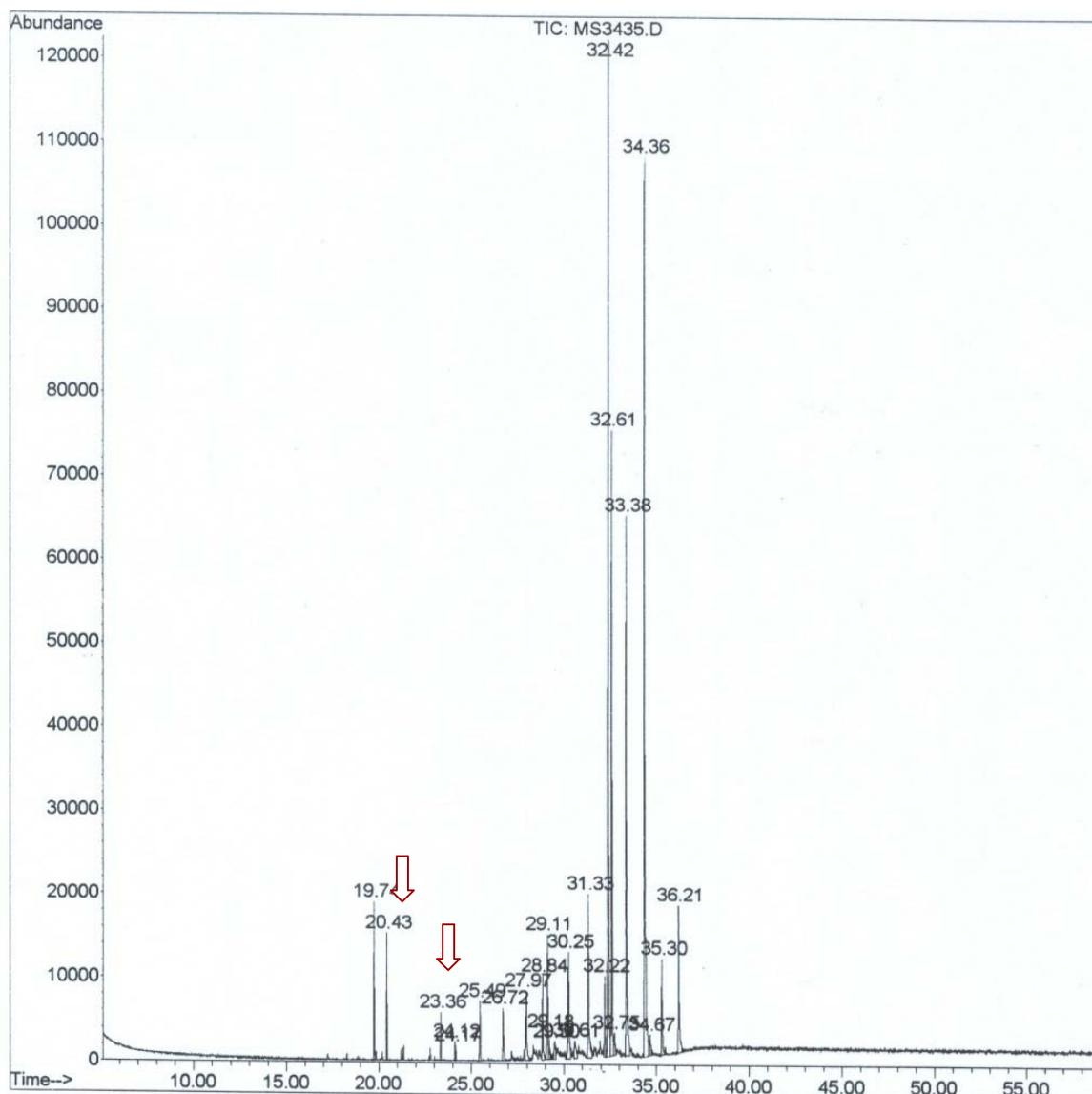


Espectro 9: Espectro de massas do nonacosano

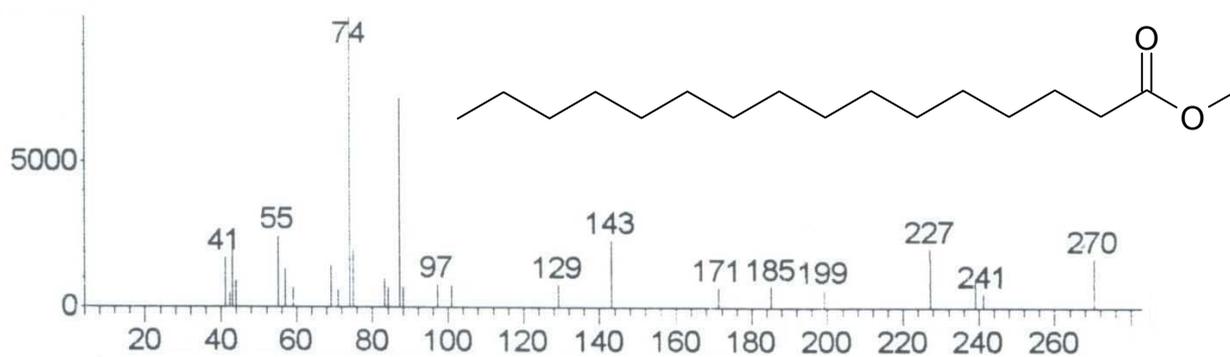
× **Junção 2: EH 25-40** – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min.

Tabela 3 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 25-40 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de *C. cerifera*.

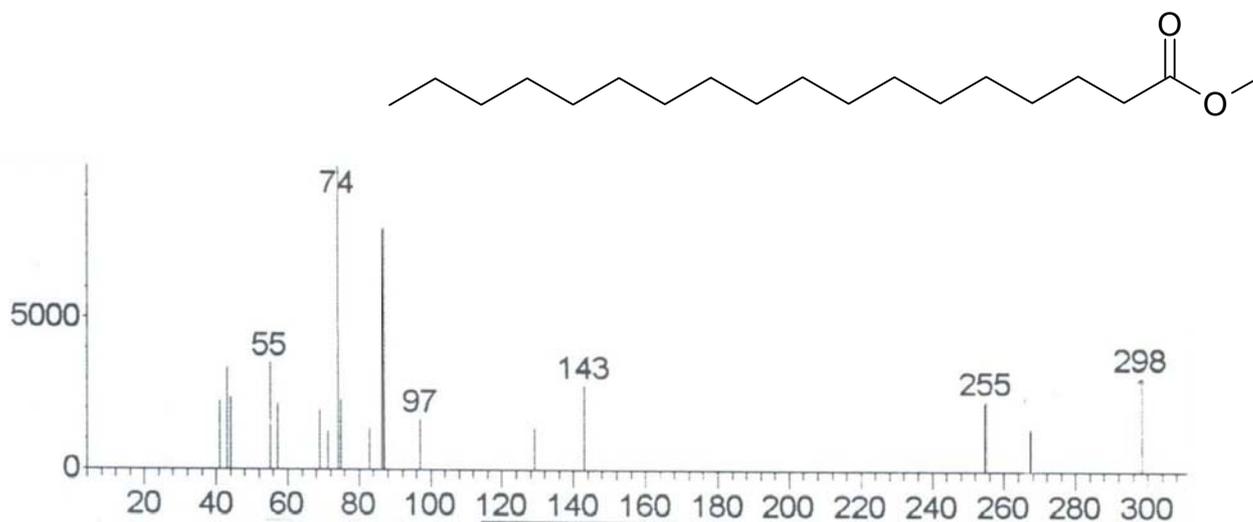
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
20,43	Éster metílico do ácido hexadecanóico	97 %
23,36	Éster metílico do ácido octadecanóico	90%



Cromatograma 2: Cromatograma da junção EH 25-40, obtido por CG-EM



Espectro 10: Espectro de massas éster metílico do ácido hexadecanóico

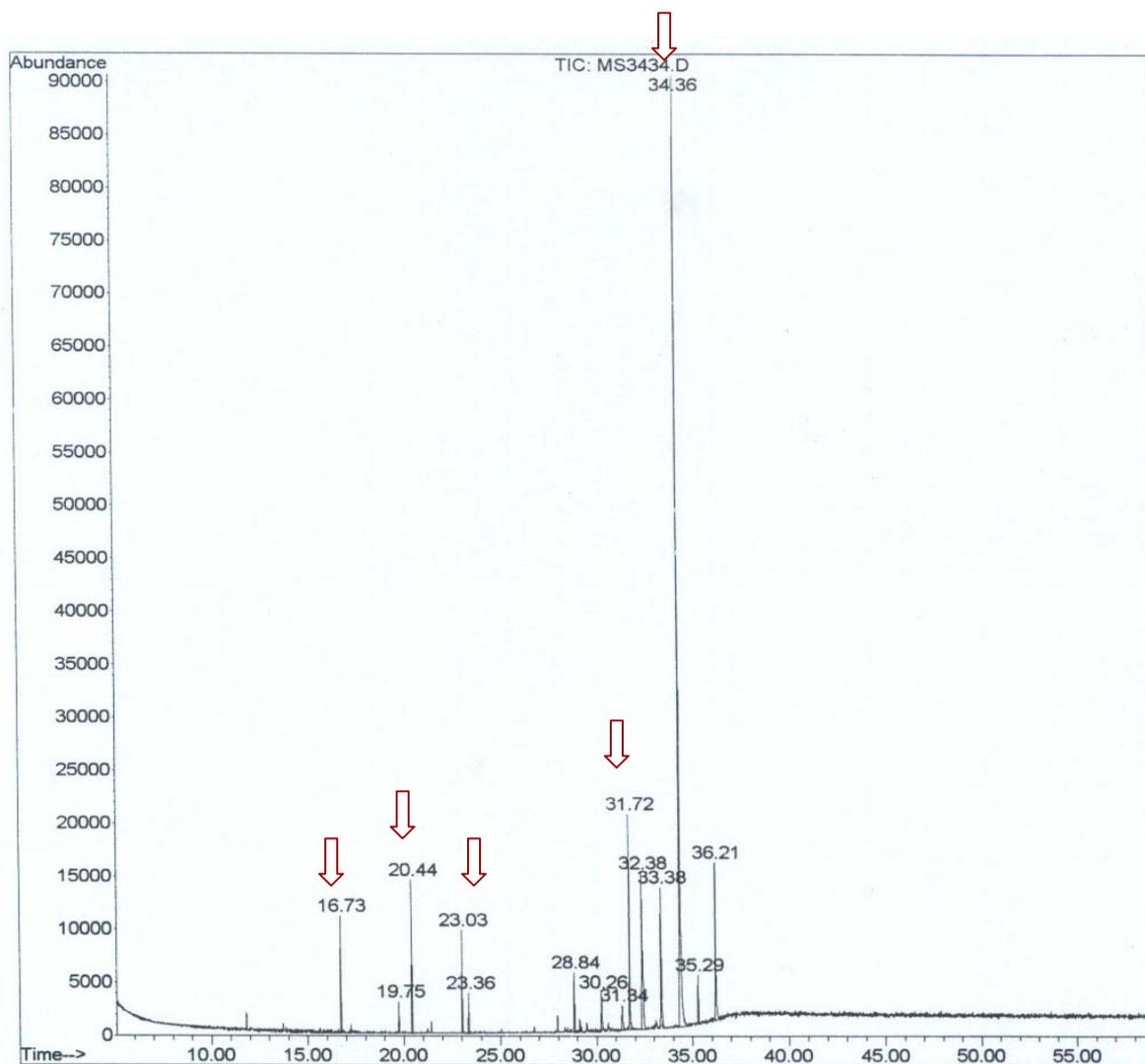


Espectro 11: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico

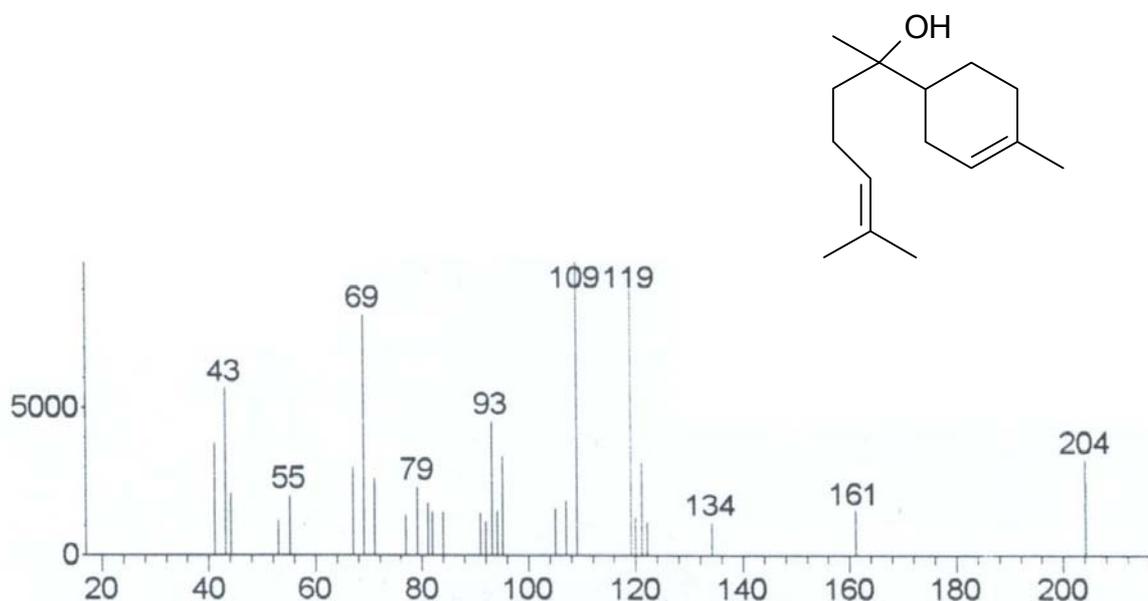
× **Junção 4: EH 46-63** – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min.

Tabela 4 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 46-63 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de *C. cerifera*.

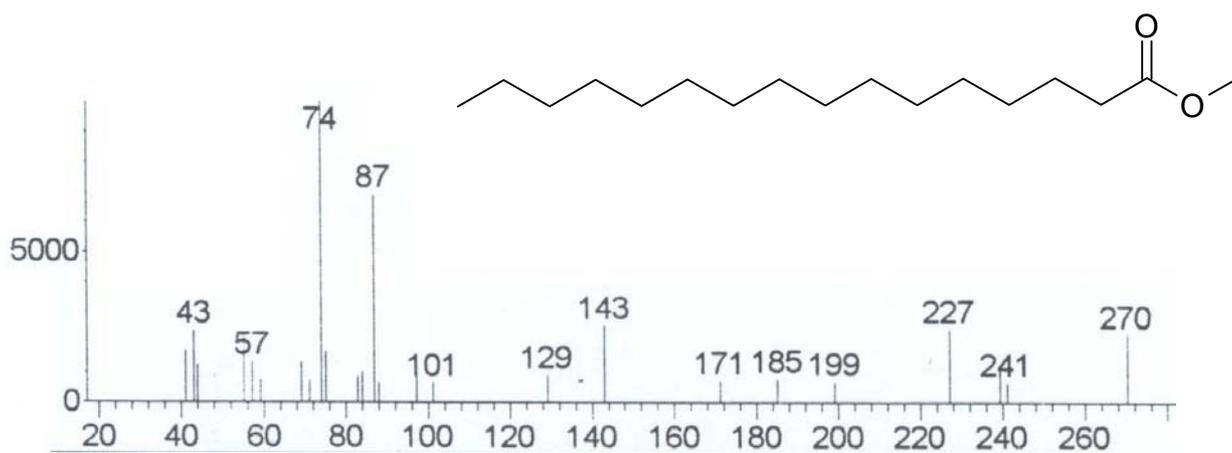
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
16,73	Alfa-bisabolol	91 %
20,44	Éster metílico do ácido hexadecanóico	97 %
23,02	Éster metílico do ácido octadecenóico-9	93 %
34,36	Hentriacontano, Untriacontano	94 %



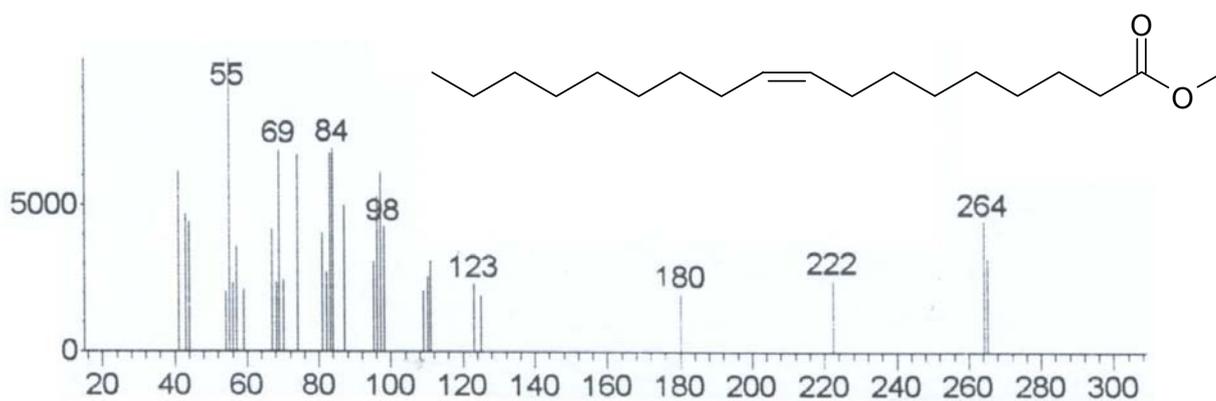
Cromatograma 3: Cromatograma da junção EH 46-63, obtido por CG-EM



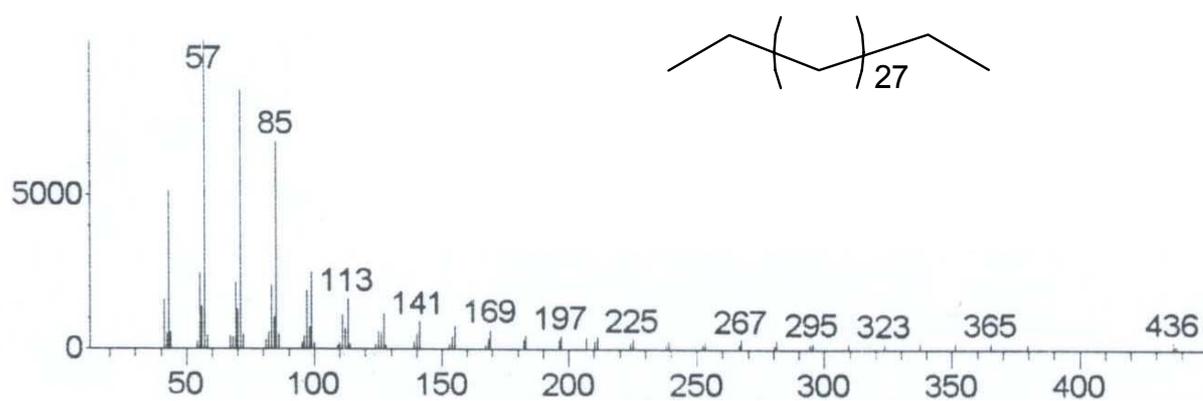
Espectro 12: Espectro de massas do alfa-bisabolol



Espectro 13: Espectro de massas éster metílico do ácido hexadecanóico



Espectro 14: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9

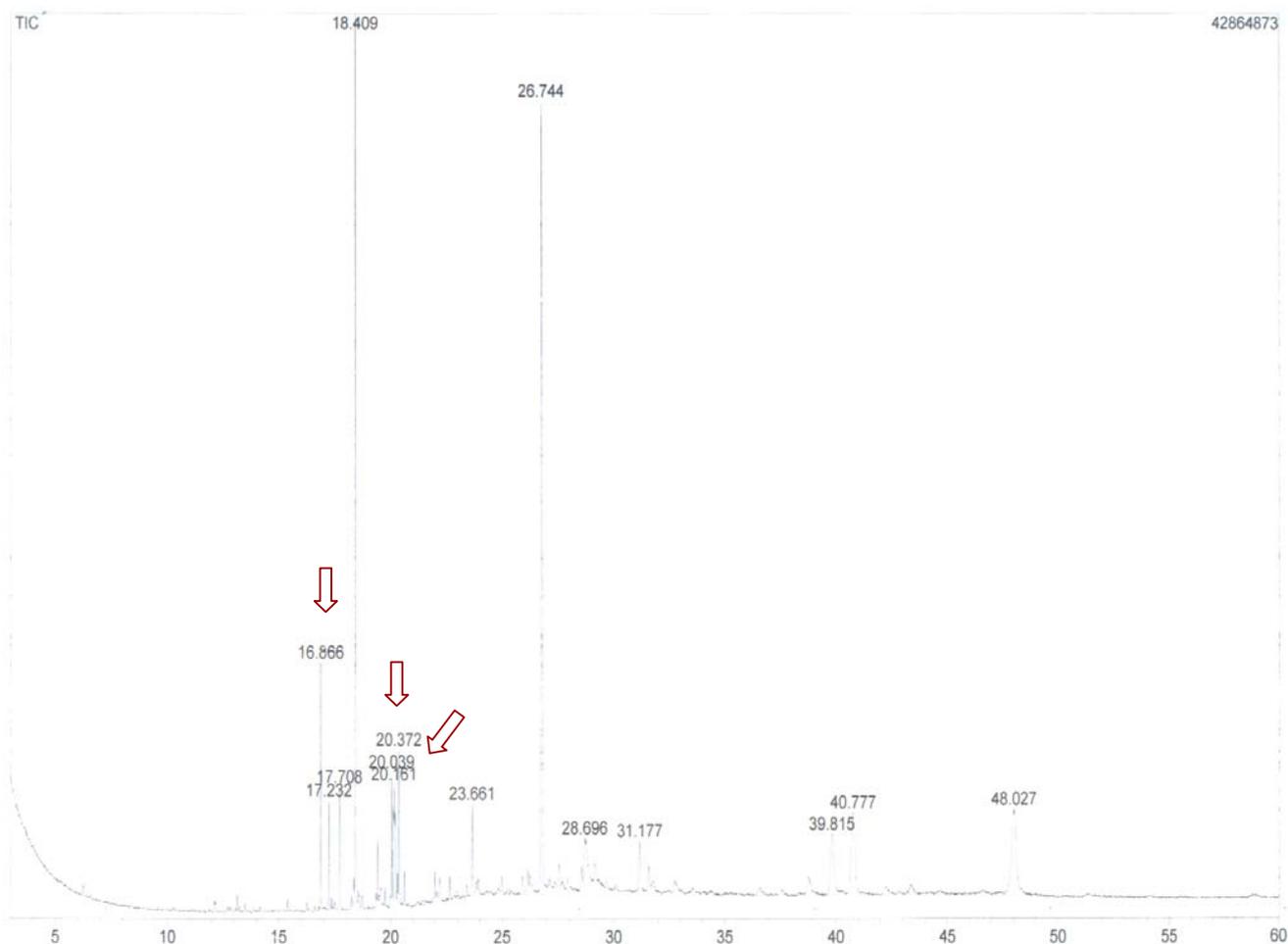


Espectro 15: Espectro de massas do untriacontano

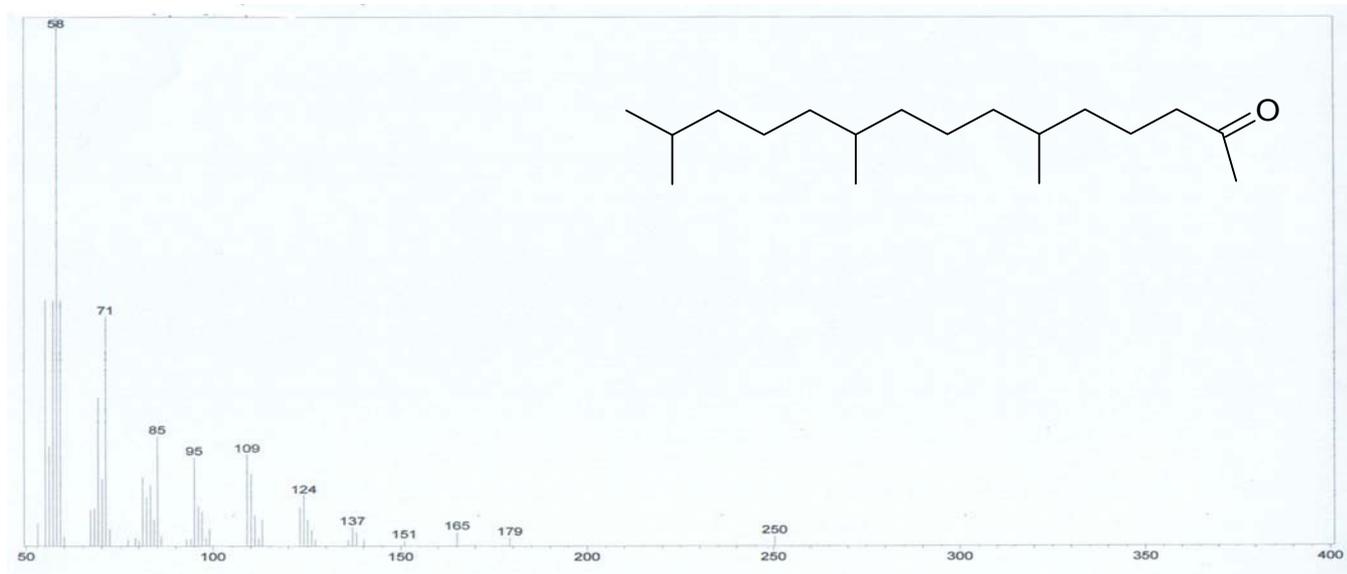
× **Junção 5: EH 71-79** – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min.

Tabela 5- Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção EH 71-79 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de *C. cerifera*.

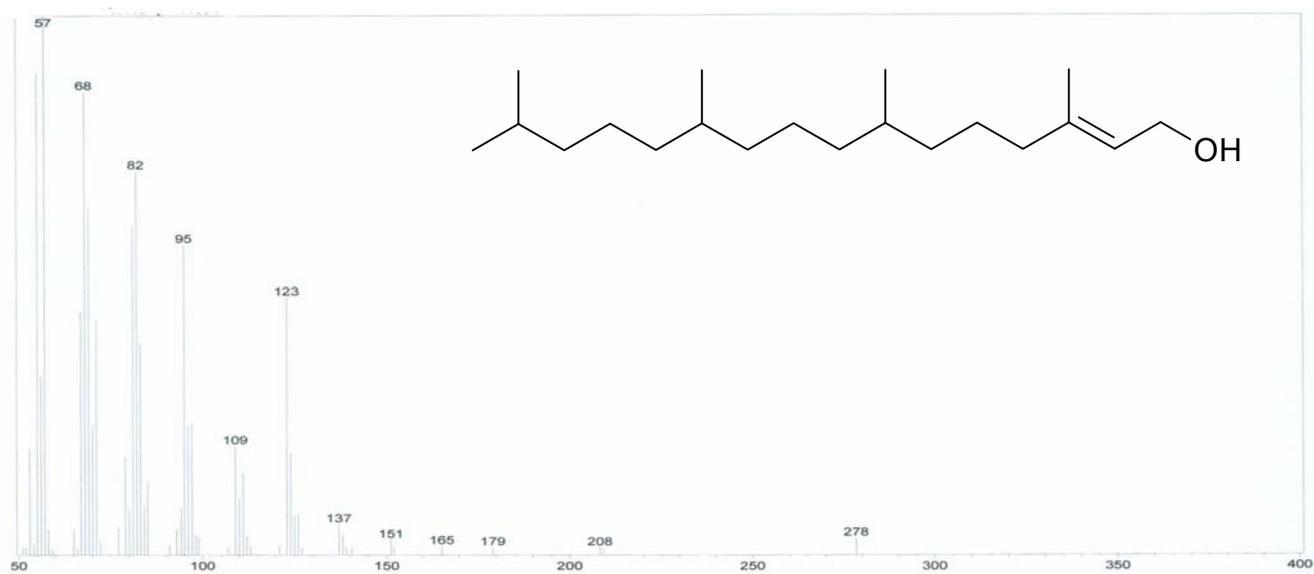
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
16,87	6,10,14-trimetil-pentadecanona-2	95 %
20,04	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	91 %
20,37	Éster metílico do ácido octadecanóico	93%



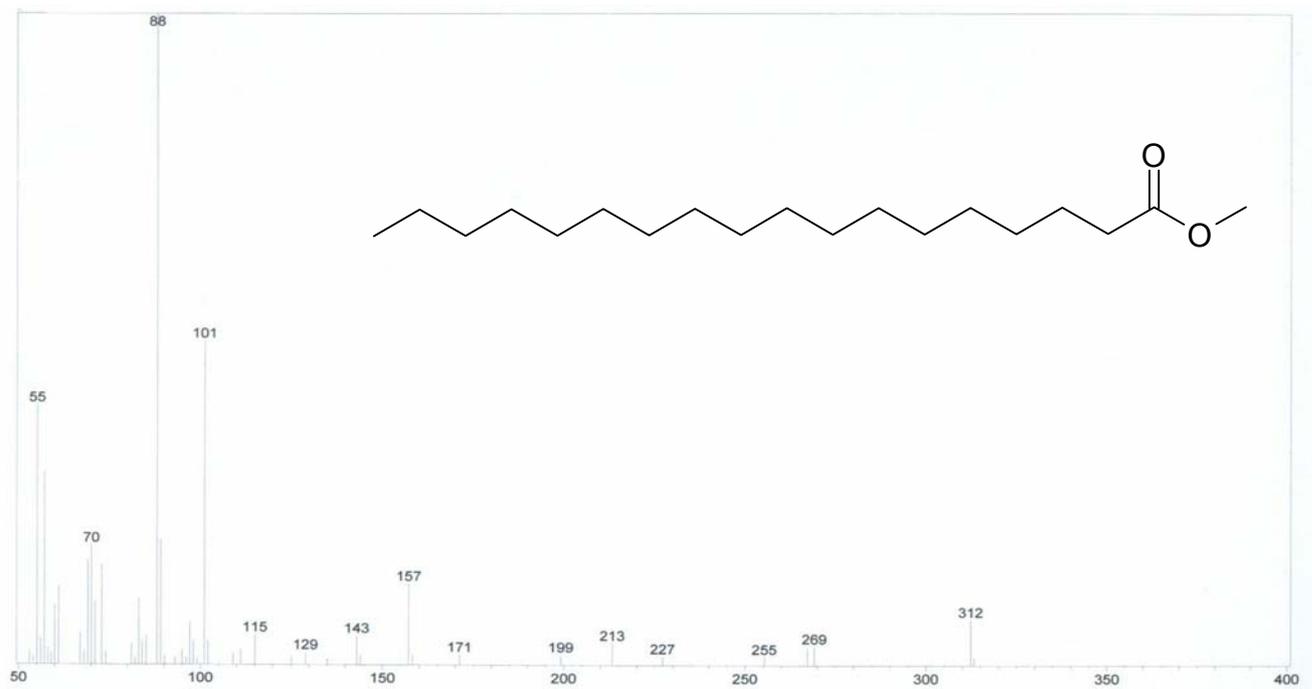
Cromatograma 4: Cromatograma da junção EH 71-79, obtido por CG-EM



Espectro 16: Espectro de massas do 6,10,14-trimetil-pentadecanona-2



Espectro 17: 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol

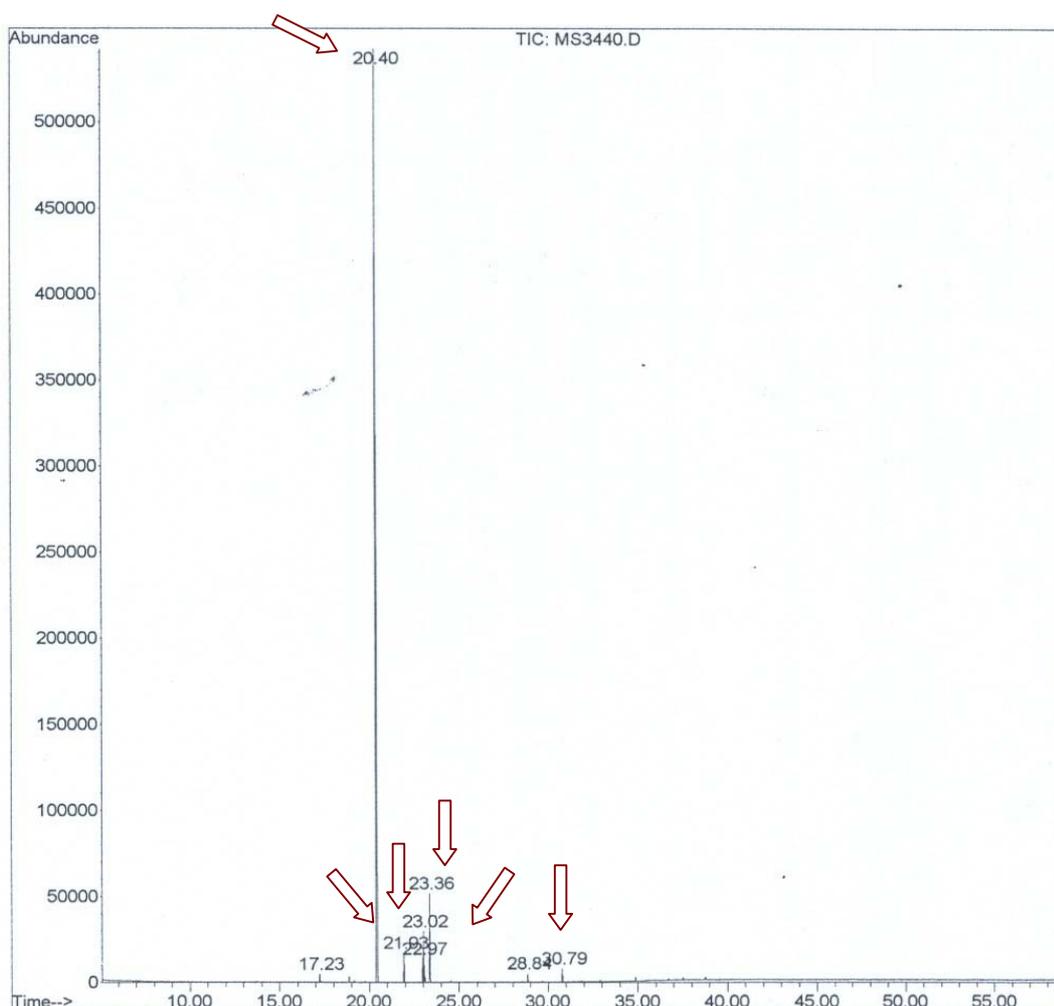


Espectro 18: Espectro de massas éster metílico do ácido octadecanóico

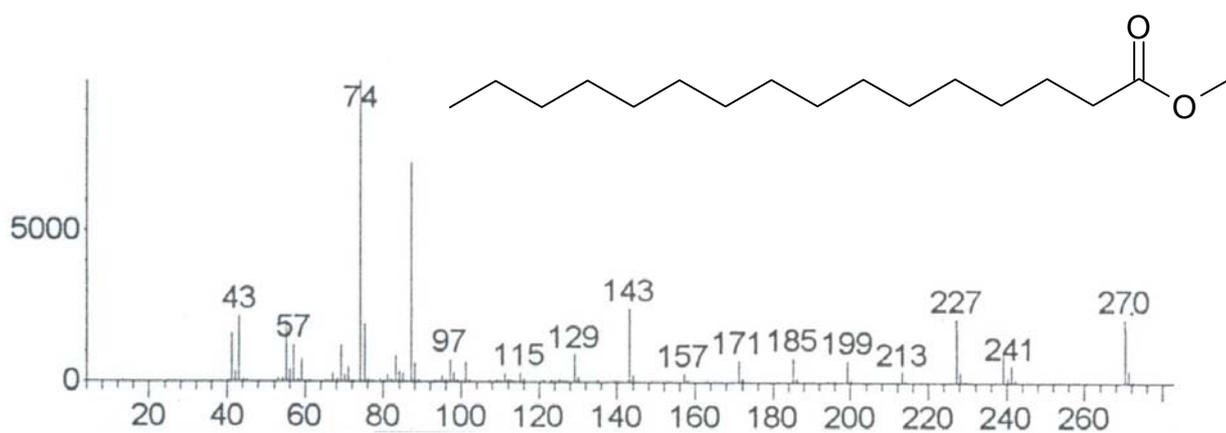
Fração 15 (EH 80-107) – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min.

Tabela 6 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na fração 15 da junção EH 80-107 da coluna de gel de sílica do extrato hexânico bruto das folhas de *C. cerifera*.

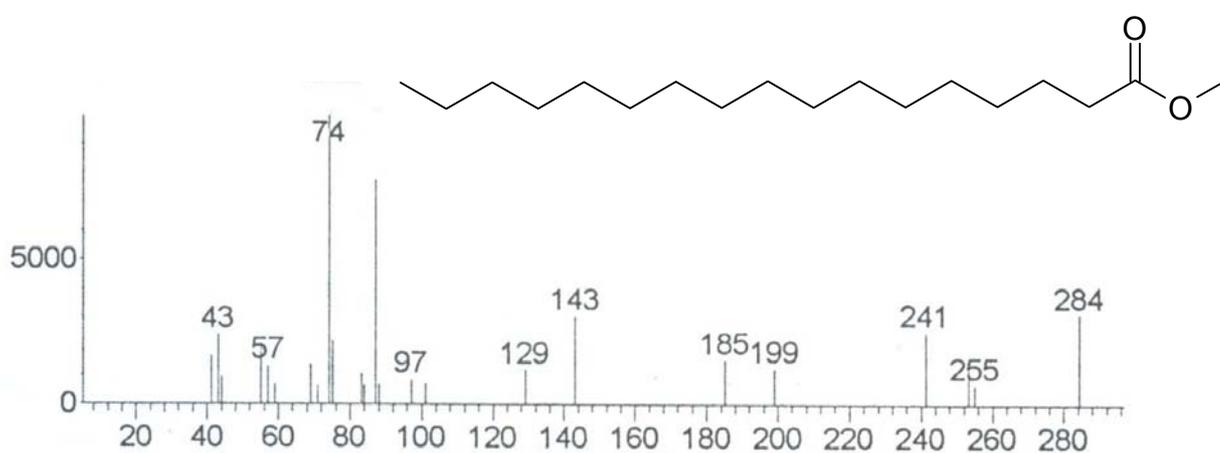
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
20,40	Éster metílico do ácido hexadecanóico	99 %
21,94	Éster metílico do ácido heptadecanóico	97%
22,97	Éster metílico do ácido 9,12 octadecadienóico	96 %
23,02	Éster metílico do ácido octadecenóico-9	99 %
23,36	Éster metílico do ácido octadecanóico	99 %
30,79	Éster metílico do ácido tetracosanóico	94 %



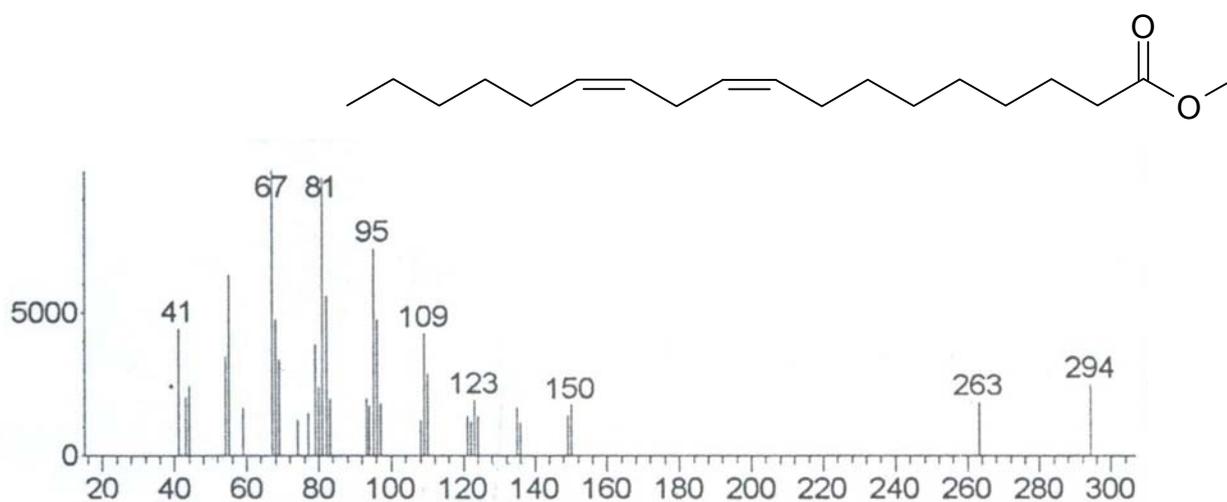
Cromatograma 5: Cromatograma da fração 15 da junção EH 80-107, obtido por CG-EM



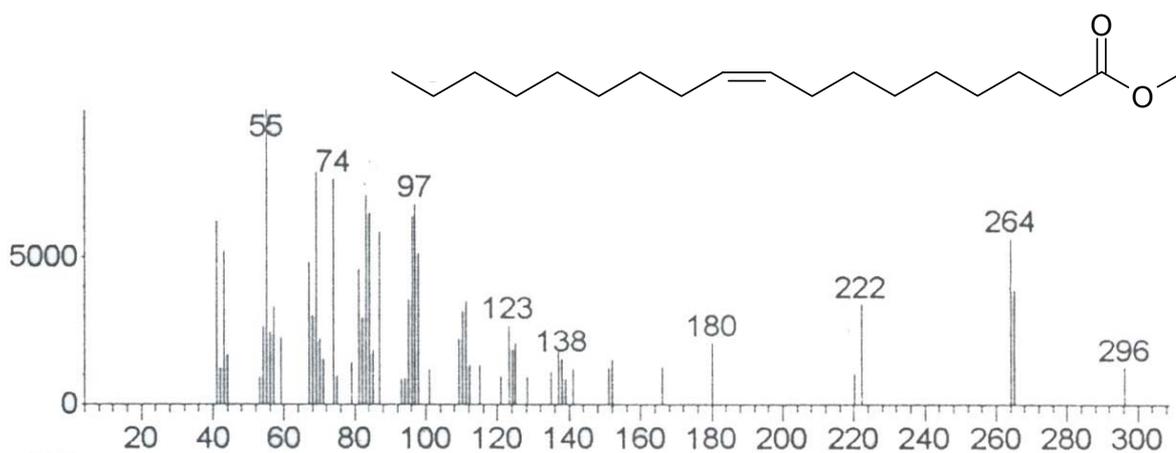
Espectro 19: Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico



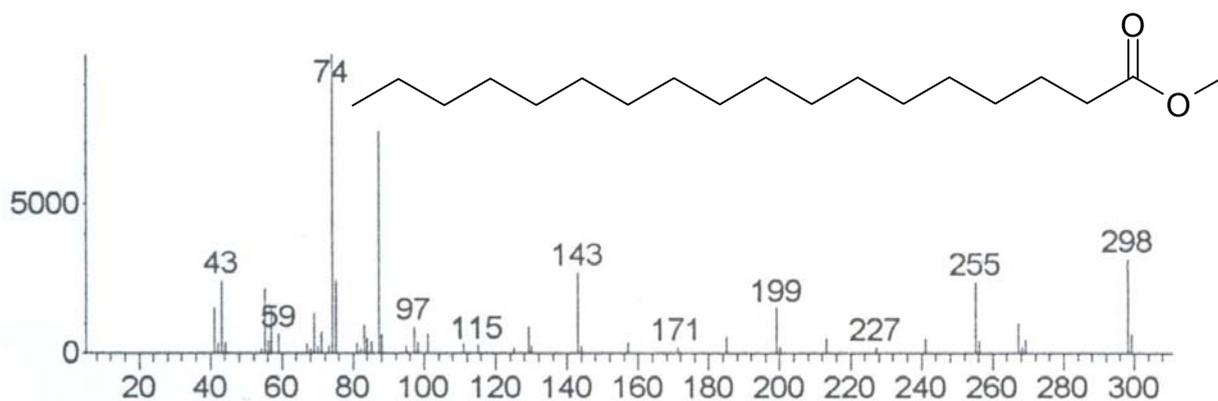
Espectro 20: Espectro de massas do éster metílico do ácido heptadecanóico



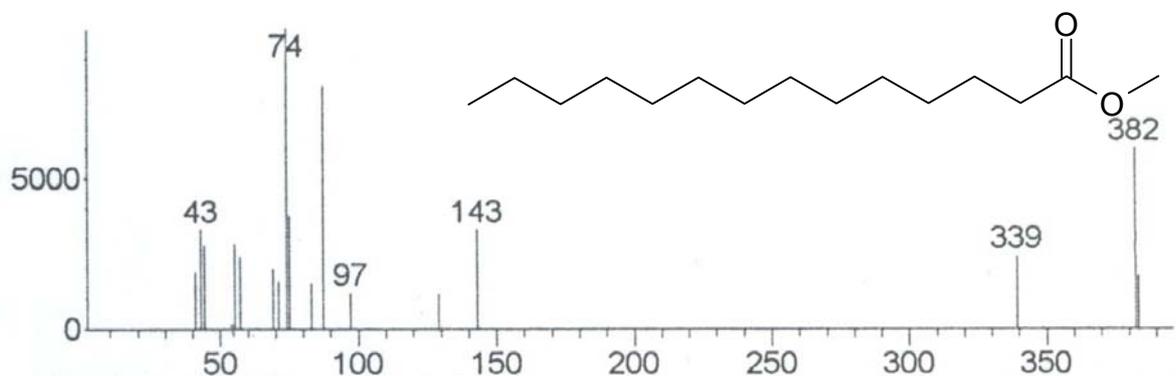
Espectro 21: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecadienóico-9,12



Espectro 22: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9



Espectro 23: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico



Espectro 24: Espectro de massas do éster metílico do ácido tetracosanóico

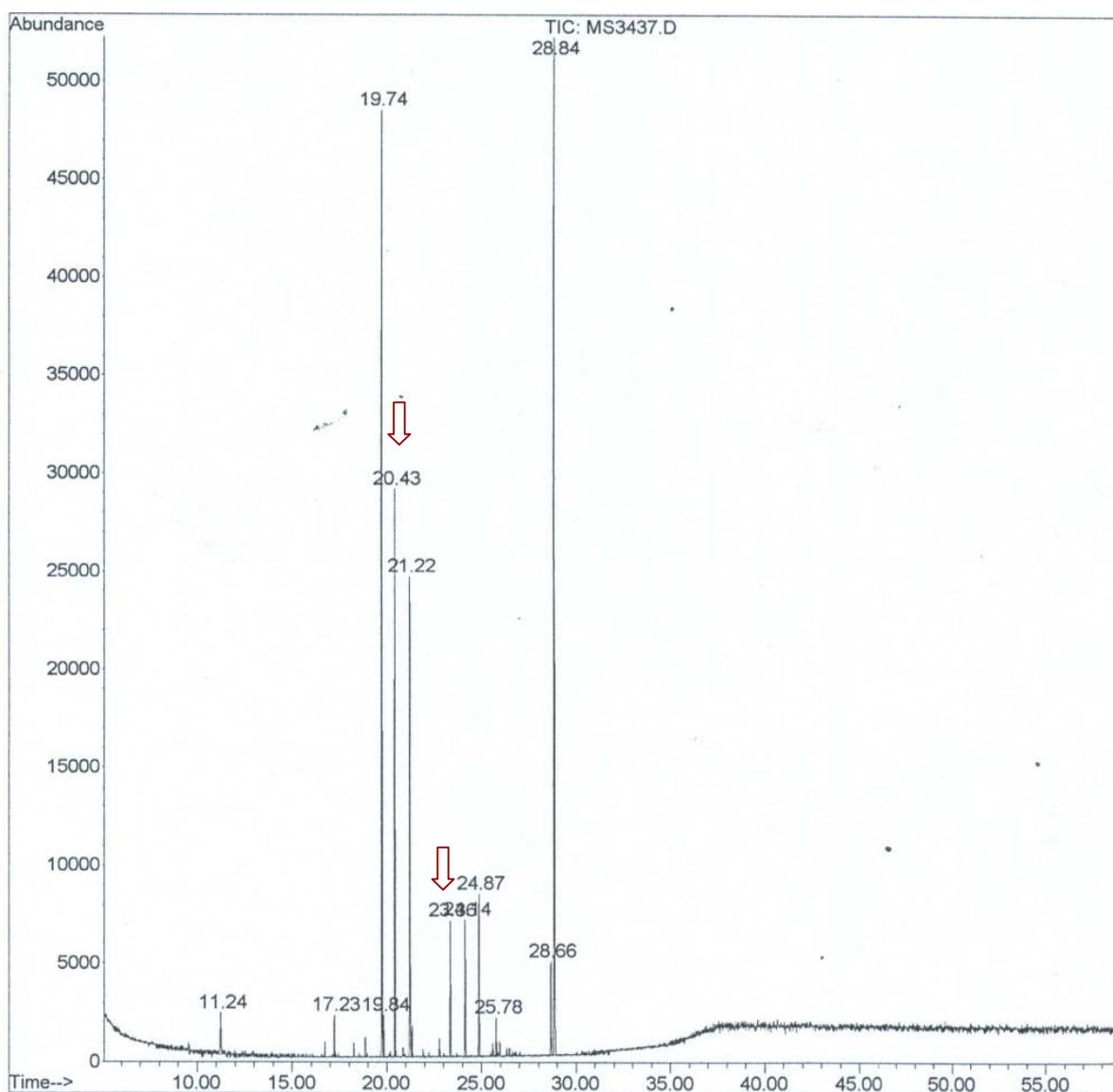
2 - Fração em Acetato de Etila da Partição do Extrato Bruto Etanólico das Folhas de *Copernicia cerifera*

O extrato bruto etanólico das folhas de *C. cerifera* foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). A fração em acetato de etila foi cromatografada, sendo eluída em diclorometano, gradientes crescentes de diclorometano/acetato de etila, acetato de etila, gradientes crescentes de acetato de etila/metanol até metanol puro. Assim foram obtidas 122 frações, que foram cromatografadas por cromatografia em camada delgada e reunidas em 11 junções. As junções 1, 2, 4 e 5 foram analisadas por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Por meio do cromatograma obtido foi possível a identificação das seguintes substâncias, com seus respectivos tempos de retenção: ésteres metílicos dos ácidos 4-metóxi-benzóico (11,20 min.), 4-hidróxi-benzóico (13,14 min.), éster dimetílico do ácido nonanedióico (14,33 min.), éster metílico do ácido 3,4 di-metóxi benzóico (15,34 min.), alfa-bisabolol (16,72 min.) e os ésteres metílicos dos ácidos 3-(4-metóxi-fenil) propenóico-2 (16,78 min.), 3,4,5 trimetóxi-benzóico (17,55 min.), 3(3,4-di-metóxi-fenil) propenóico-2 (20,26 min.), hexadecanóico (20,43 min.), octadecenóico-9 (23,02 min.) e octadecanóico (23,36 min.) min.) (Cromatograma 6 a 8, págs. 75, 77 e 79). As respectivas massas moleculares das substâncias citadas são: 166, 152, 185, 196, 222, 192, 226, 222, 270, 296 e 298 (Espectros 25 a 37, págs 76 a 82).

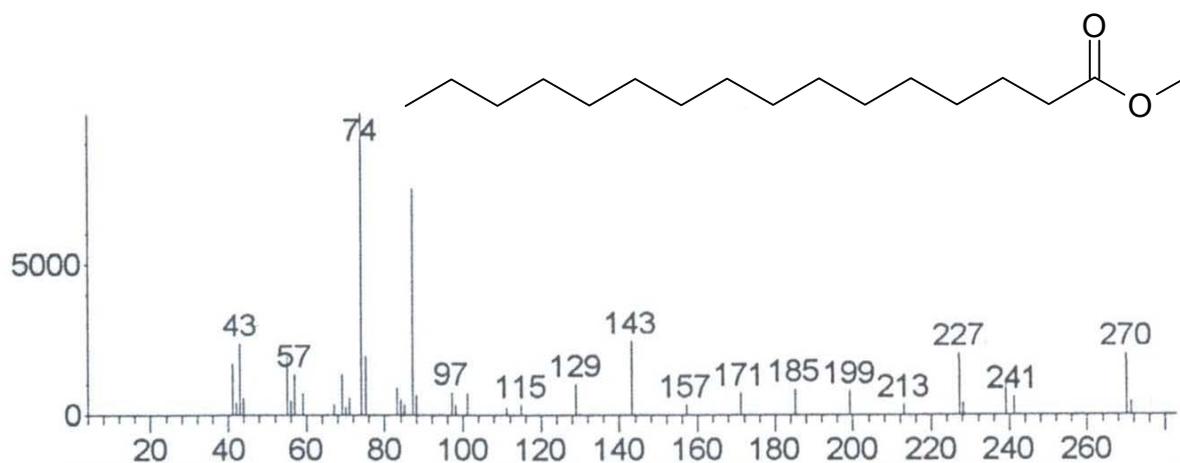
× **Junção 1: FAE 1-20** – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min.

Tabela 7- Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção FAE 1-20 da coluna de gel de sílica da fração de acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *C. cerifera*.

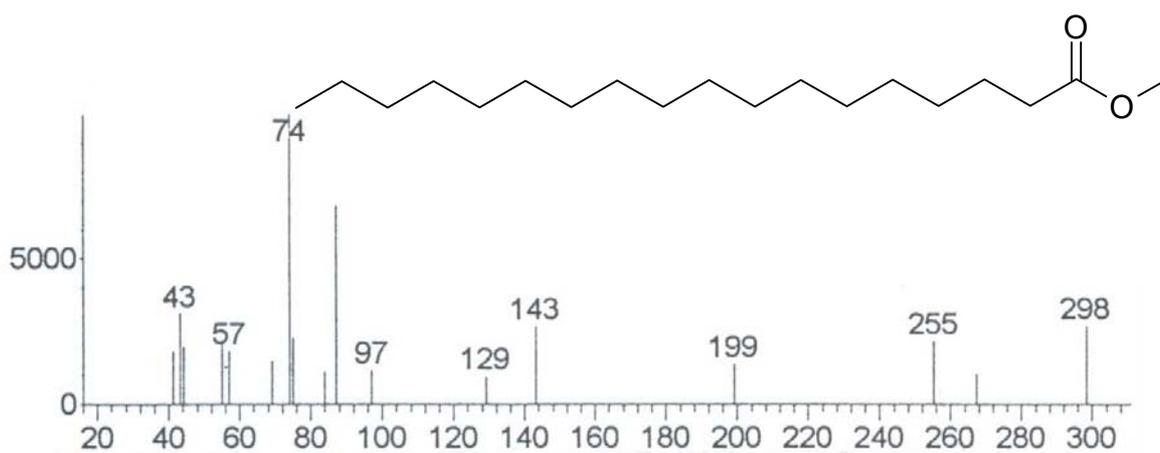
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
20,43	Éster metílico do ácido hexadecanóico	98 %
23,36	Éster metílico do ácido octadecanóico	94 %



Cromatograma 6: Cromatograma da junção FAE 1-20, obtido por CG-EM



Espectro 25: Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico



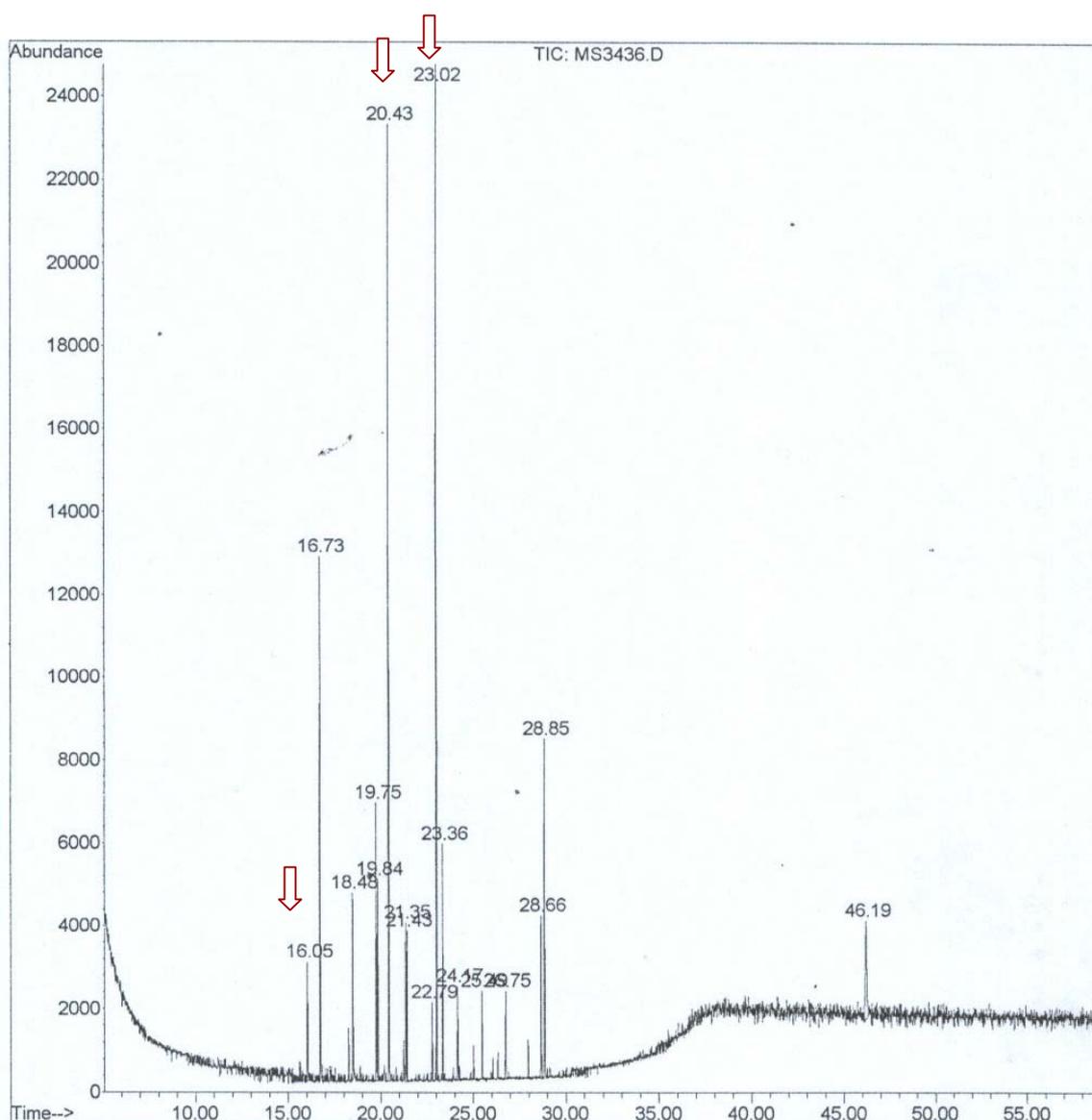
Espectro 26: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico

× **Junção 2: FAE 21-24V** – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo

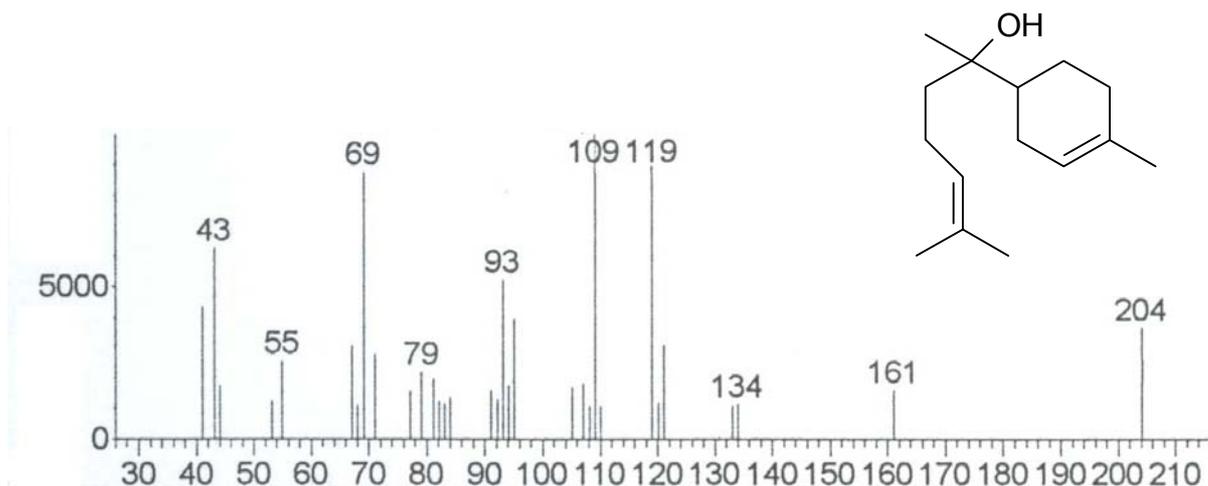
de retenção/min.

Tabela 8 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção FAE 21-24 da coluna de gel de sílica da fração de acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *C. cerifera*.

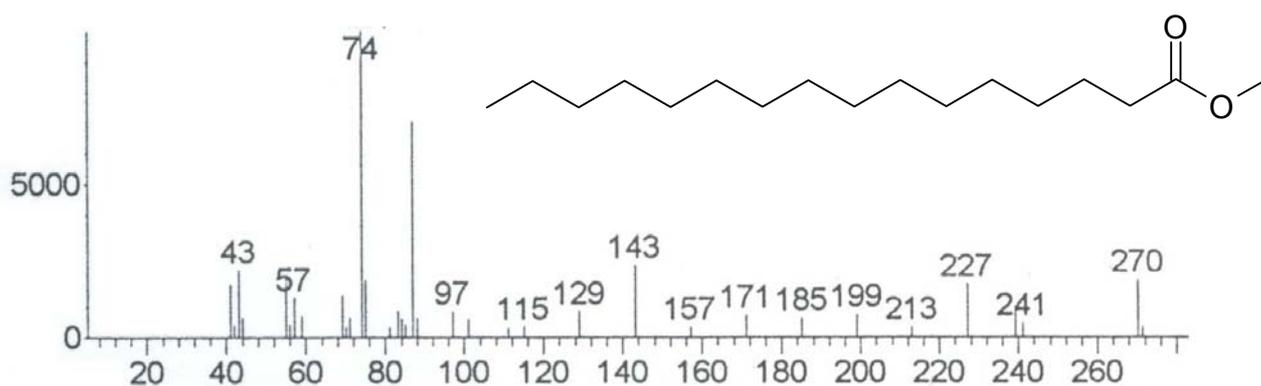
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
16,72	<i>Alfa</i> -bisabolol	91 %
20,43	Éster metílico do ácido hexadecanóico	98 %
23,02	Éster metílico do ácido octadecenóico-9	99 %



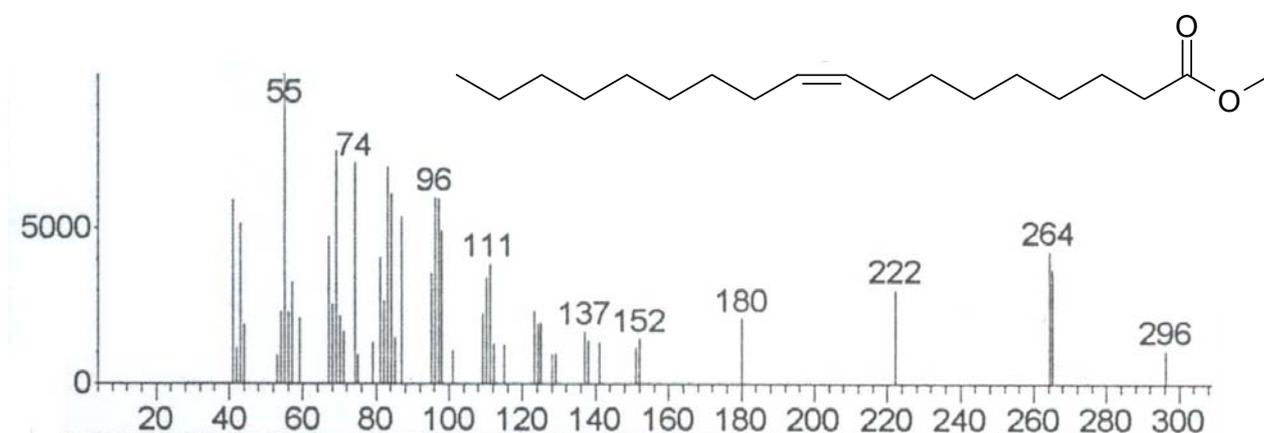
Cromatograma 7: Cromatograma da junção FAE 21-24, obtido por CG-EM



Espectro 27: Espectro de massas do alfa-bisabolol



Espectro 28: Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico

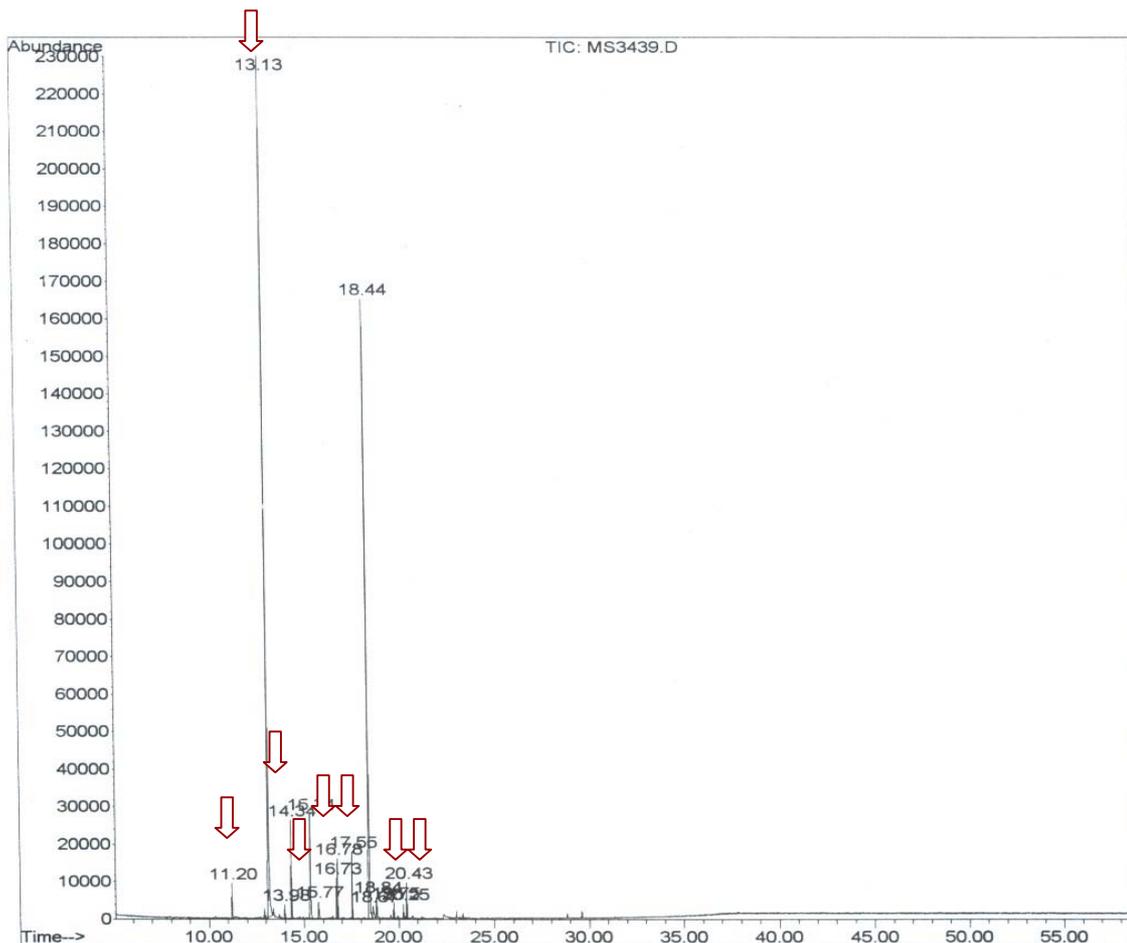


Espectro 29: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenoico-9

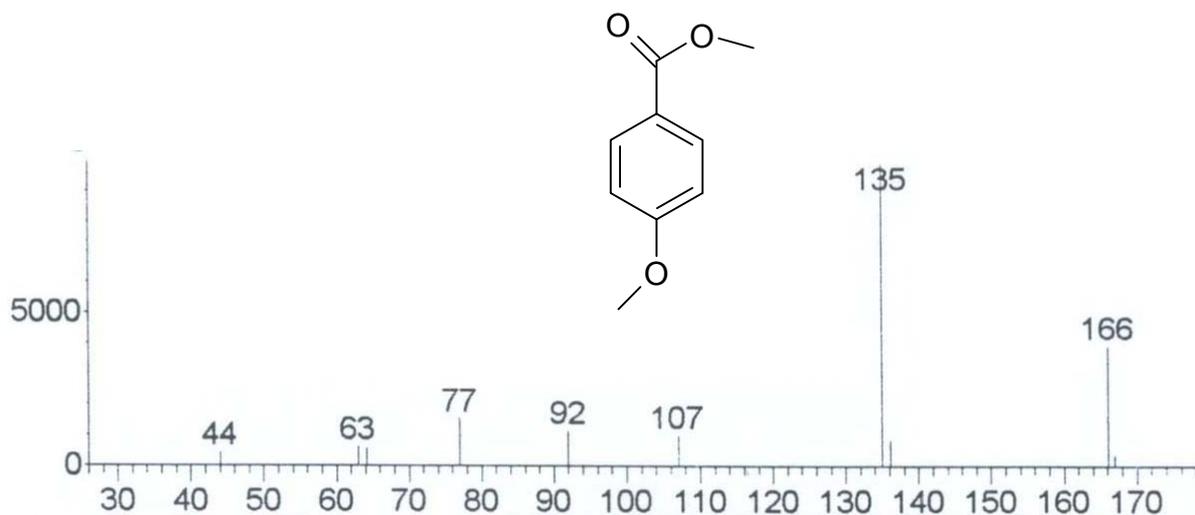
× **Junção 5: FAE 28-35** – Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min.

Tabela 9 - Substâncias identificadas em ordem crescente de tempo de retenção/min. na junção FAE 28-35 da coluna de gel de sílica da fração de acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *C. cerifera*.

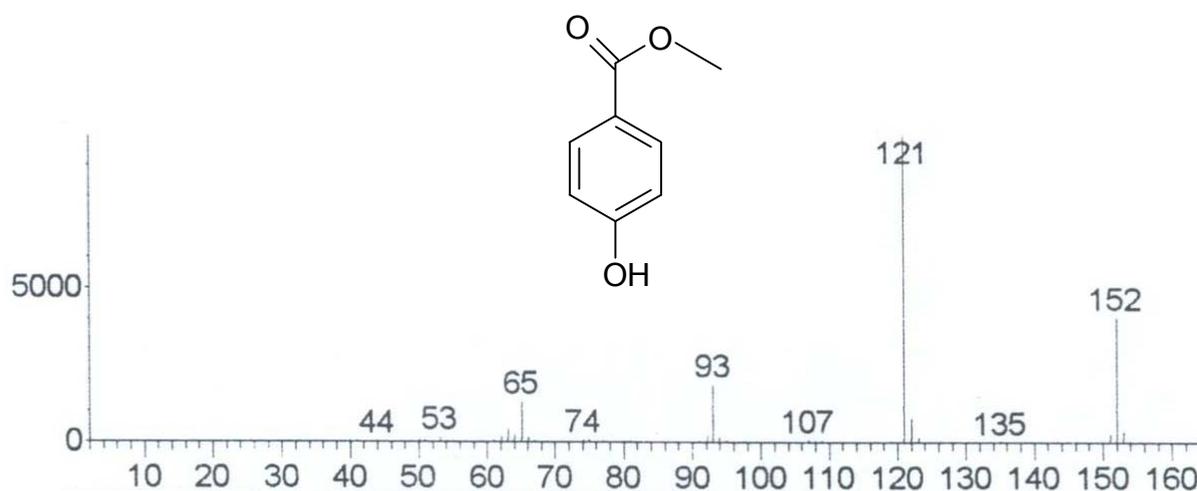
TR/min.	Substância	Índice de Certeza %
11,20	Éster metílico do ácido 4-metóxi- benzóico	91%
13,14	Éster metílico do ácido 4-hidroxi-benzóico	95 %
14,33	Éster di-metílico do ácido nonanedióico	91 %
15,34	Éster metílico do ácido 3,4 di-metóxi-o benzóico	97%
16,78	Éster metílico do ácido 3-(4-metóxi-fenil)-propenóico-2	97 %
17,55	Éster metílico do 3,4,5-trimetóxi-ácido benzóico	96 %
20,26	Éster metílico do 3-(3,4-dimetóxi-fenil)-ácido propenóico-2	90%
20,43	Éster metílico do ácido hexadecanóico	97%



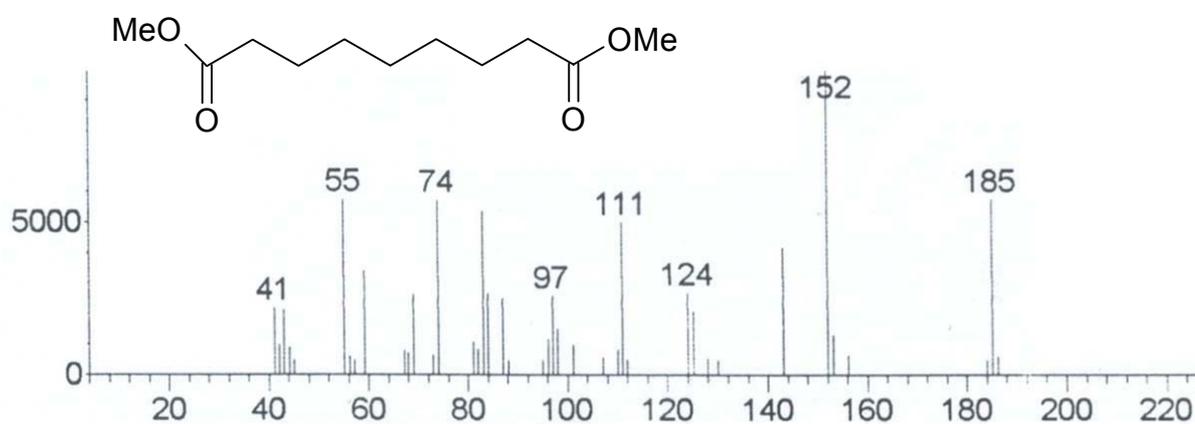
Cromatograma 8: Cromatograma da junção FAE 28-35, obtido por CG-EM



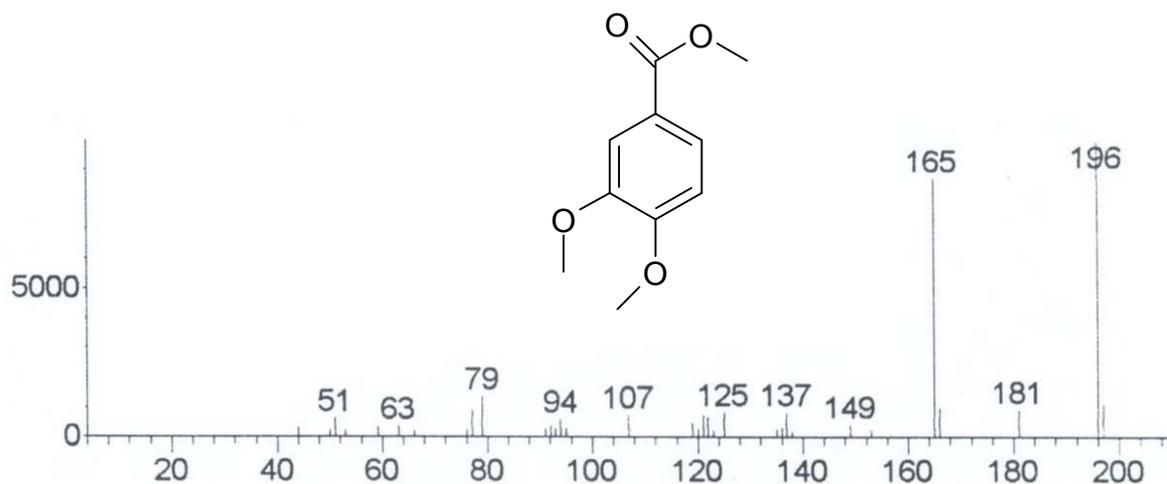
Espectro 30: Espectro de massas do éster metílico do ácido 4-metóxi-benzóico



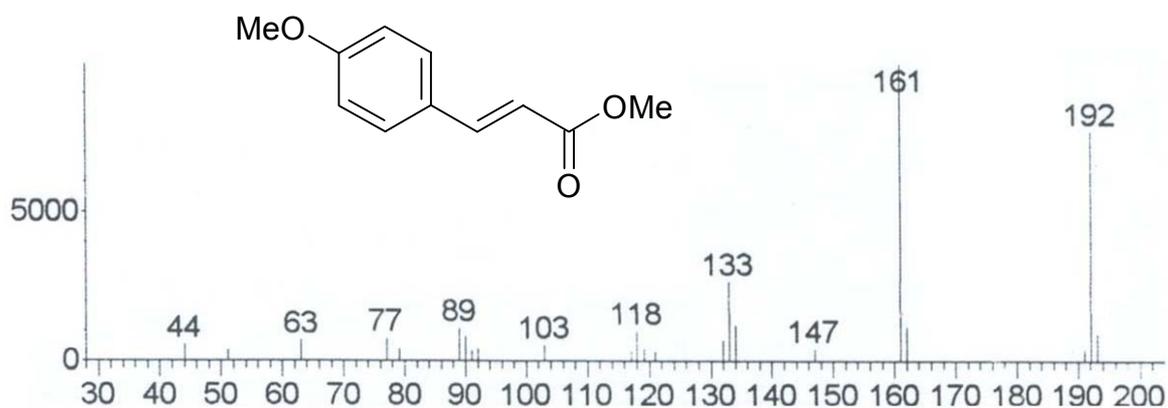
Espectro 31: Espectro de massas do éster metílico do ácido 4-hidróxi-benzóico



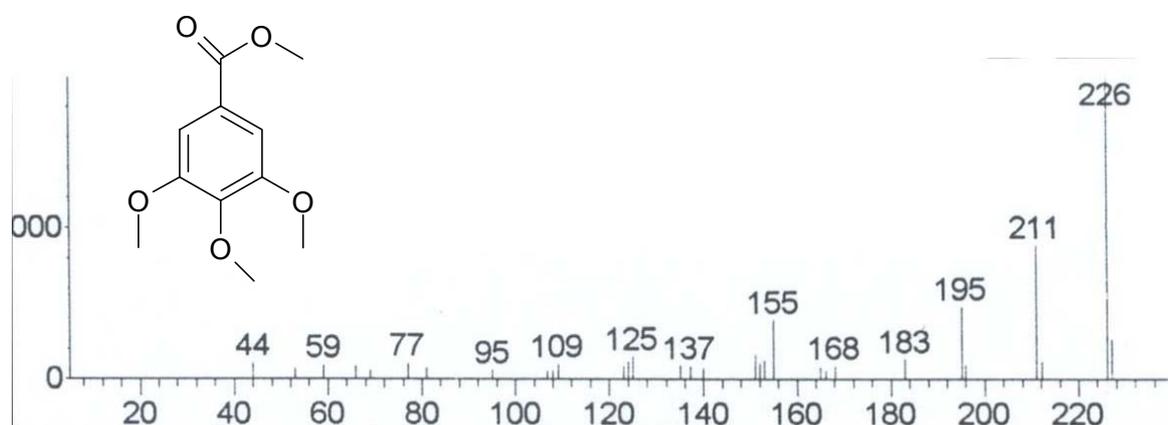
Espectro 32: Espectro de massas do éster dimetílico do ácido nonanedióico (ácido azeláico)



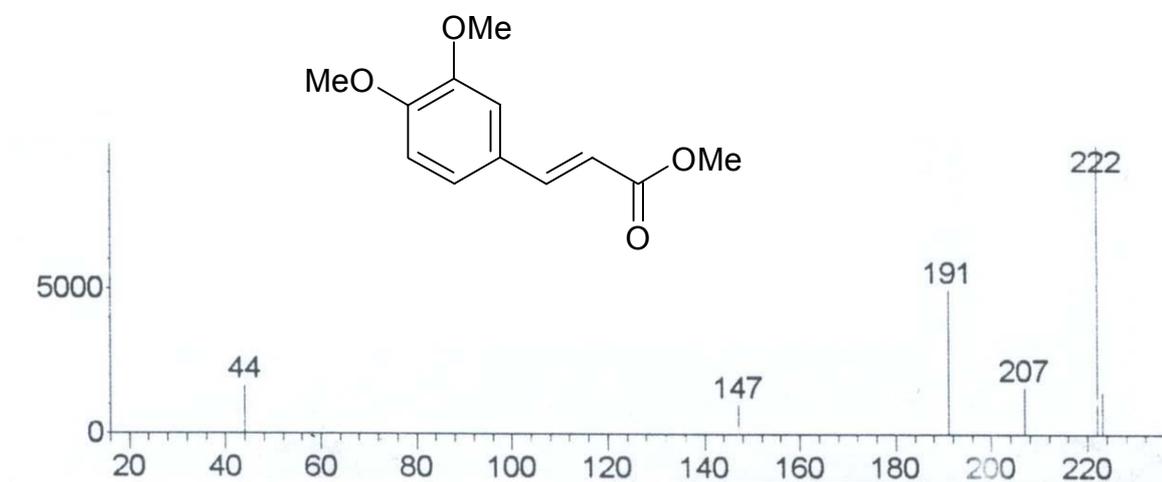
Espectro 33: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3,4-dimetóxi-benzóico



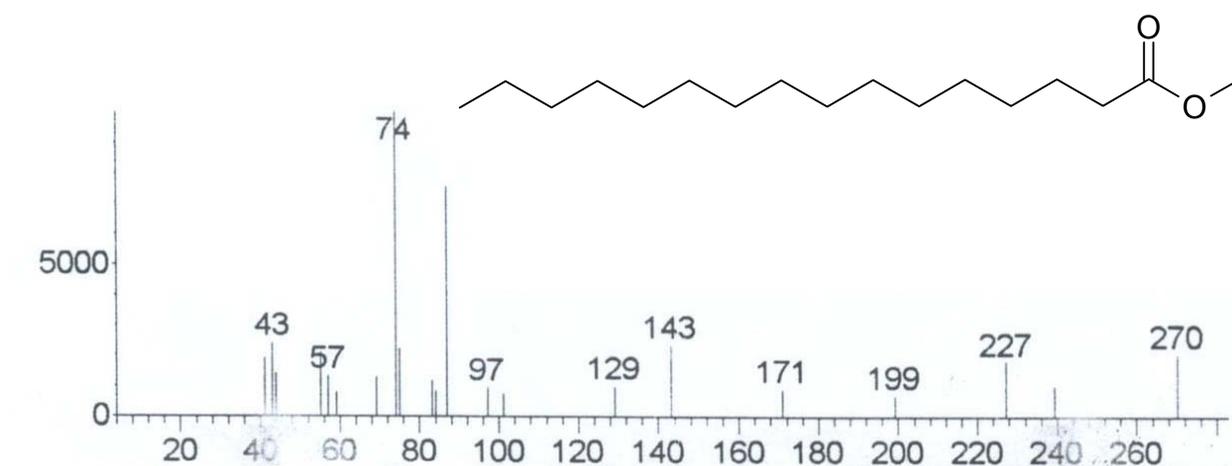
Espectro 34: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-(4-metóxi-fenil)propenóico-2



Espectro 35: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico



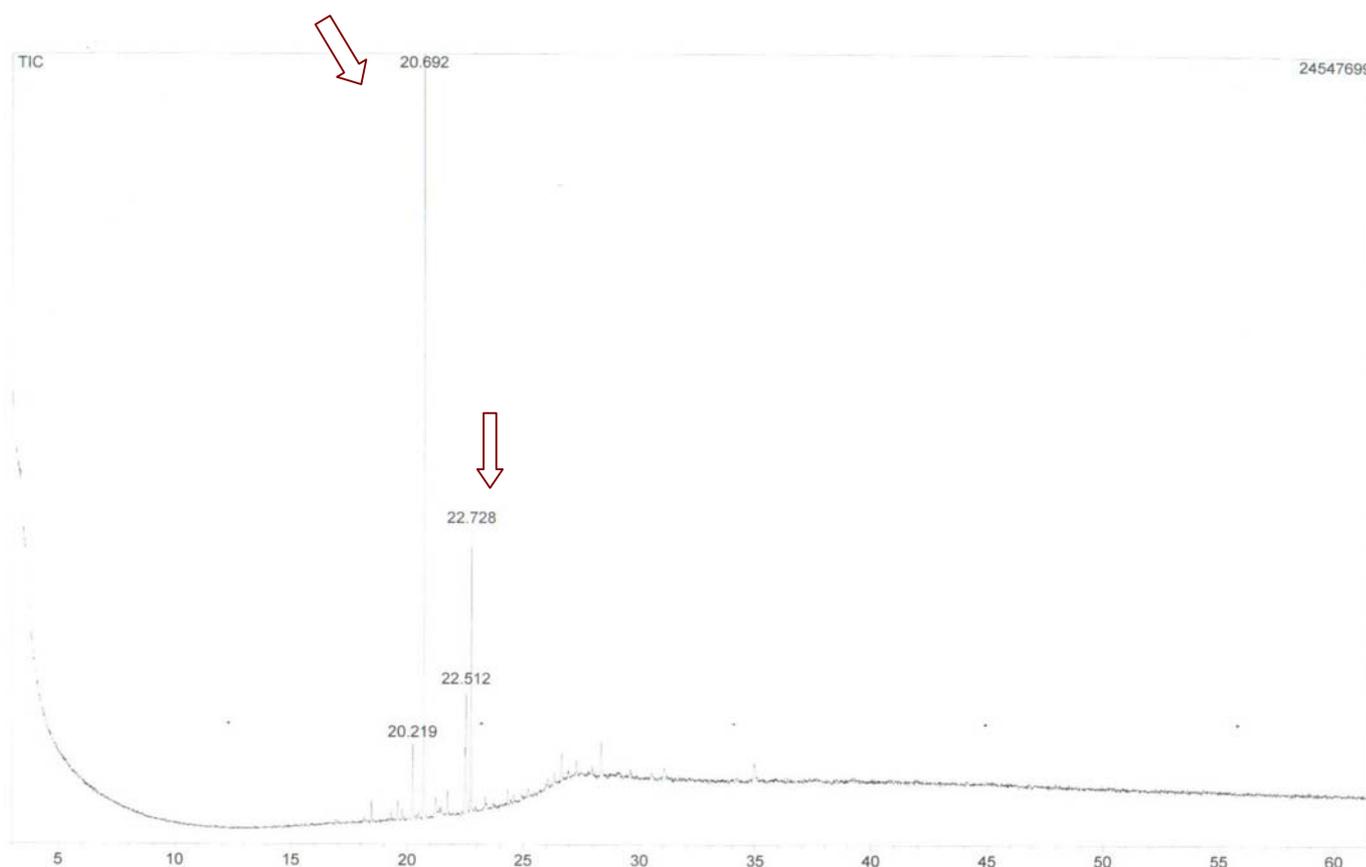
Espectro 36: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-(3,4- dimetoxifenil)-propenóico-2



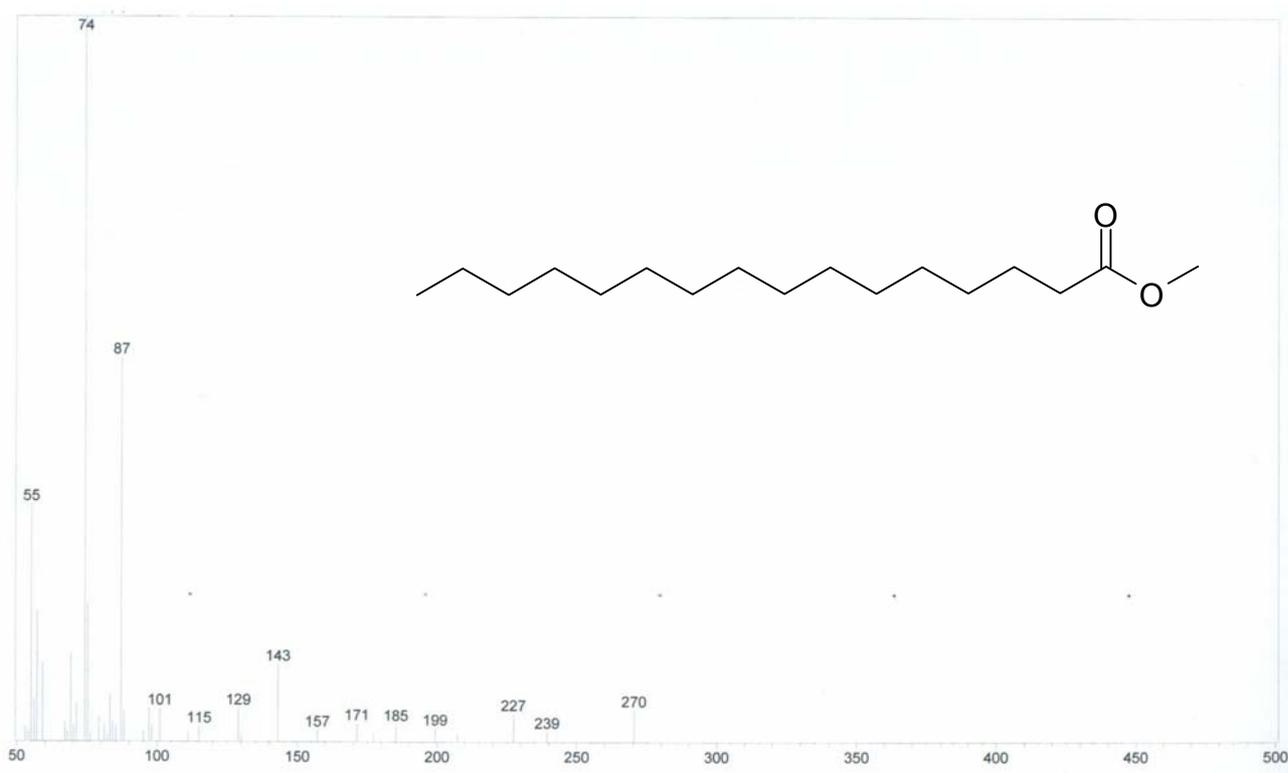
Espectro 37: Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico

3 - Óleos Fixos do Mesocarpo dos Frutos de *C. cerifera*

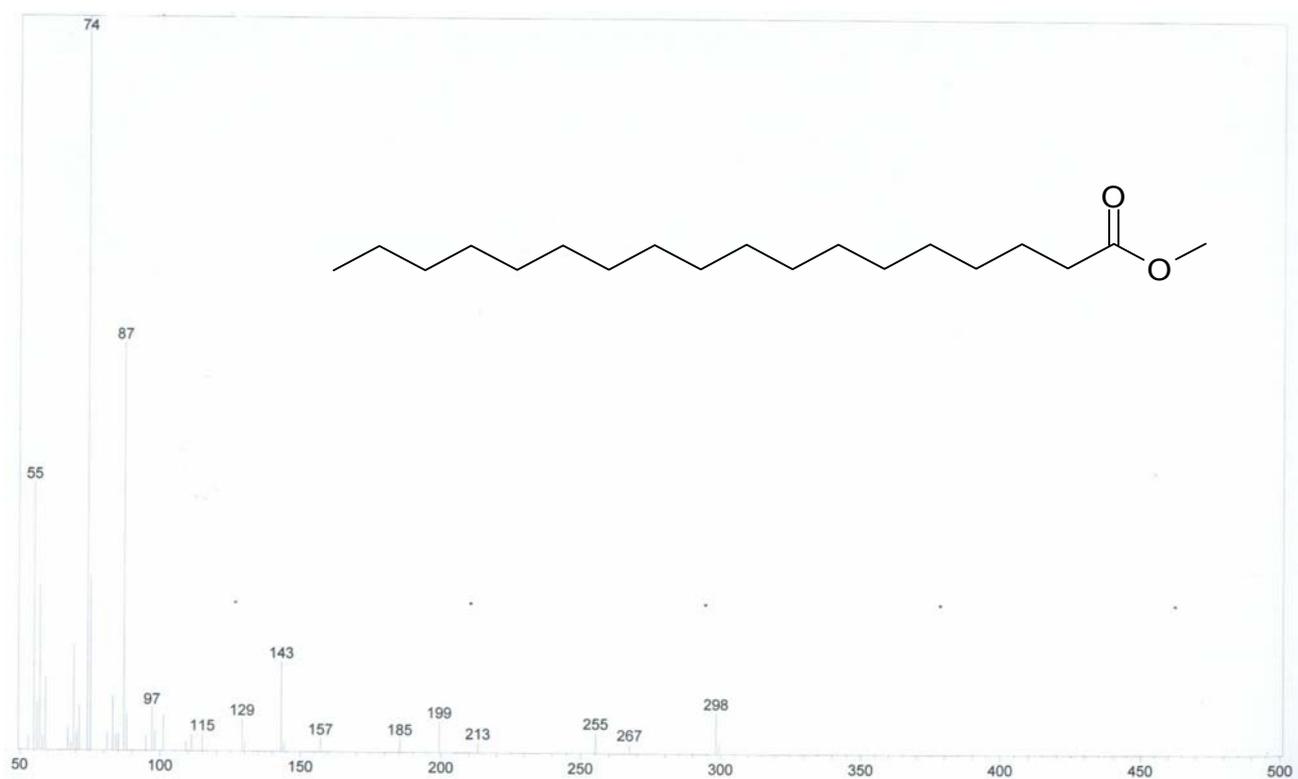
Os óleos fixos obtidos do mesocarpo dos frutos de *C. cerifera* através de extração pelo método Bligh e Dyer foram metilados e analisados por CG-EM. O cromatograma evidenciou uma mistura de substâncias, sendo possível identificar, através de seus espectros de massas, os ésteres metílicos de dois ácidos graxos: ácido hexadecanóico (20,69 min.) e o ácido octadecanóico (22,72 min.). As respectivas massas moleculares dessas substâncias 270 e 298 (Espectros 38 e 39, pág. 84).



Cromatograma 9: Cromatograma de óleos fixos obtido do mesocarpo dos frutos de *C. cerifera*, obtido em coluna DB-1 do cromatógrafo HP 5890 SII.

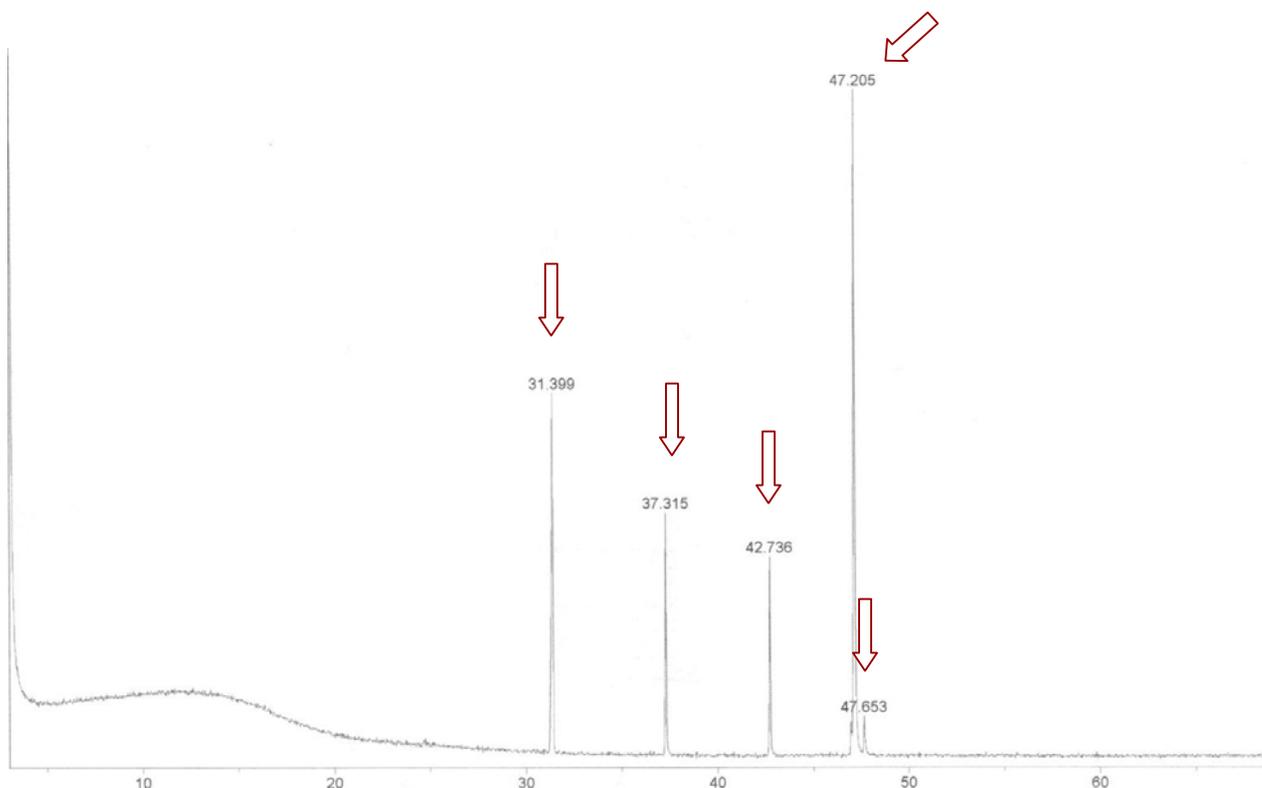


Espectro 38: Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico (ác. palmítico)

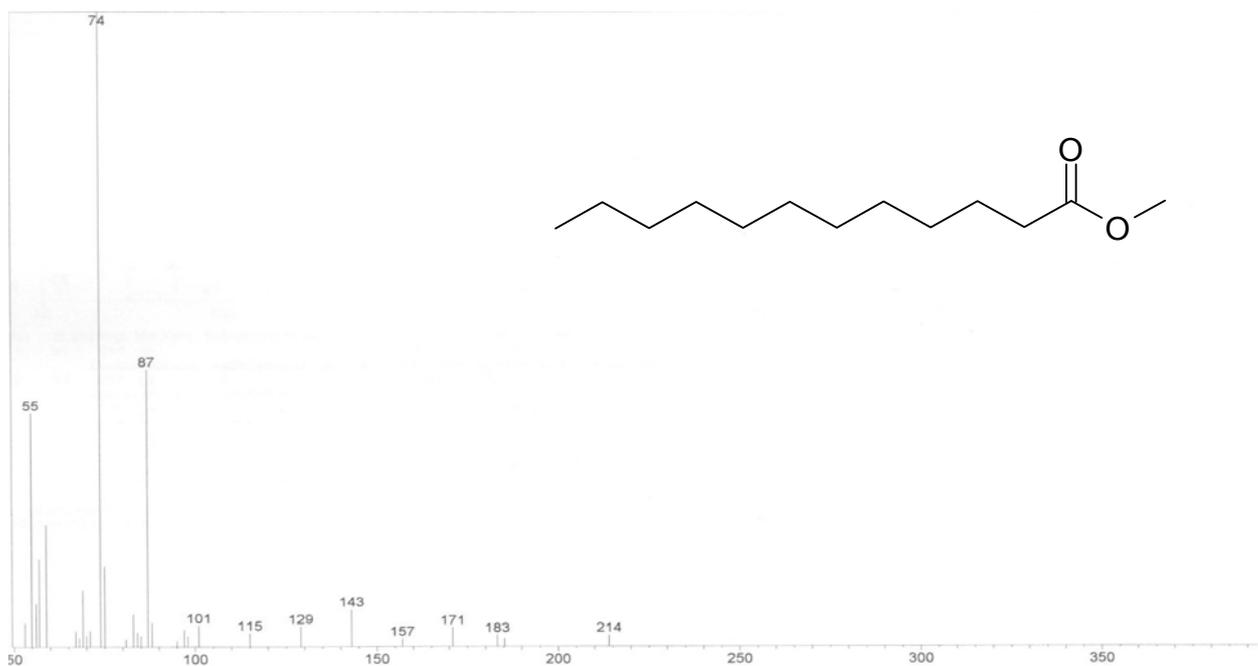


Espectro 39: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico (ác. esteárico)

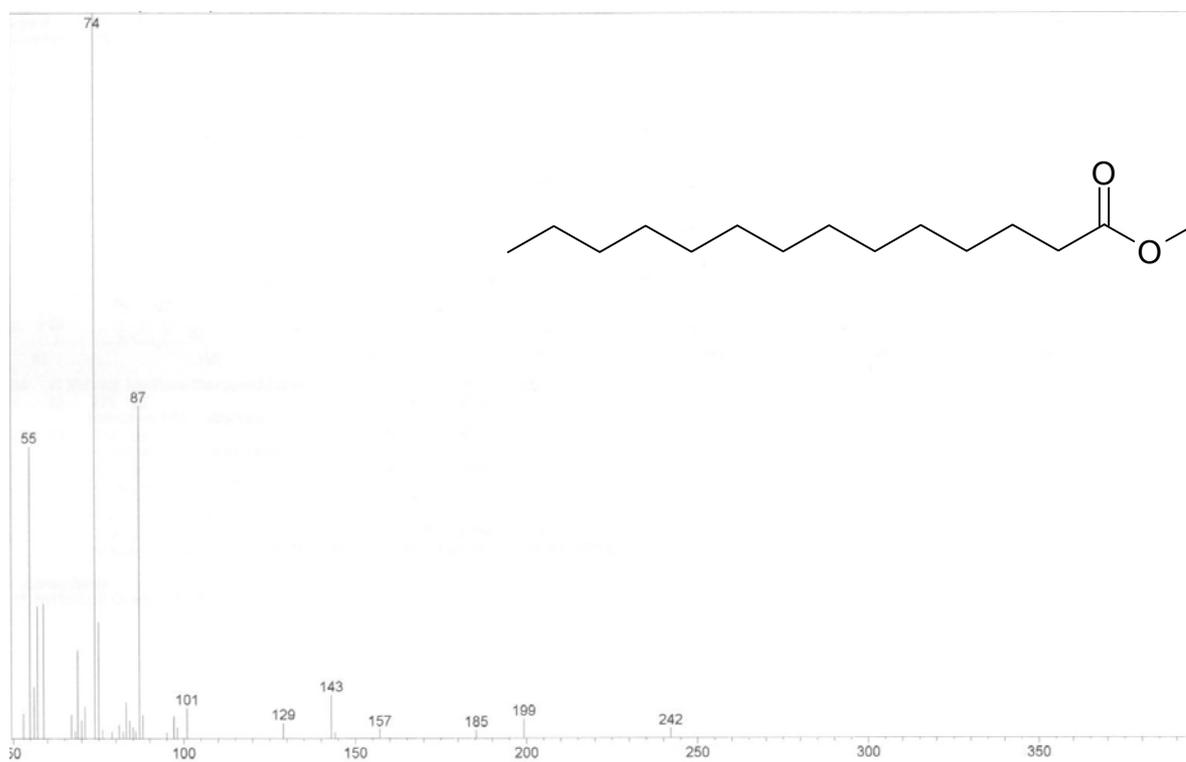
O cromatograma do óleo comercial da Herbarium de *Serenoa repens* foi obtido em coluna DB-1 do cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas QP5000 Shimadzu. A composição de ácidos graxos do óleo dos frutos de *Serenoa repens*, adquirido por doação do laboratório Herbarium, foi identificado por cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os espectros de massas revelaram a presença dos seguintes ésteres metílicos de ácidos graxos: ácido dodecanóico (31,39 min.), ácido tetradecanóico (37,31 min.), ácido hexadecanóico (43,73 min.), ácido octadecenóico-9 (47,20 min.) e o ácido octadecanóico (47,65 min.) (Cromatograma 10). As massas moleculares destas substâncias são, respectivamente, 214, 242, 270, 296, e 298 (Espectros 40 a 44, págs. 86 a 88)



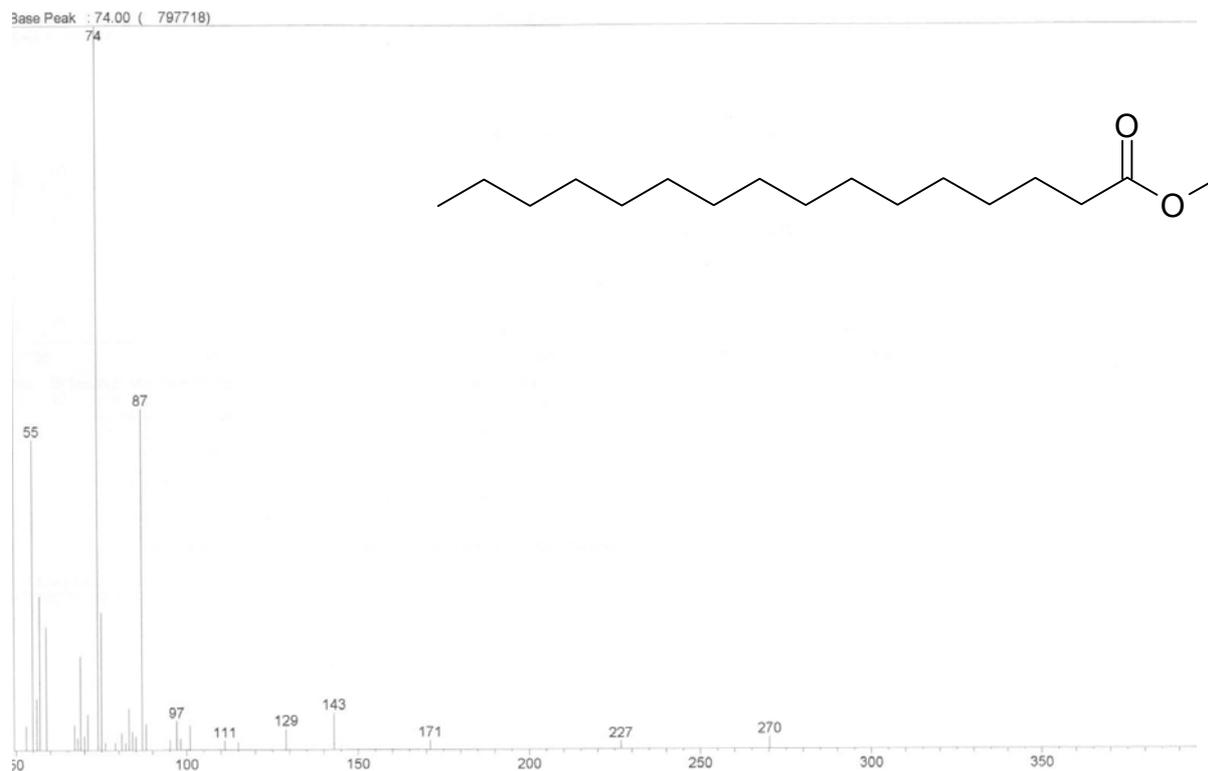
Cromatograma 10: Cromatograma do óleo comercial de *Serenoa repens* do laboratório Herbarium, obtido em coluna DB-1 do cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas QP5000 Shimadzu.



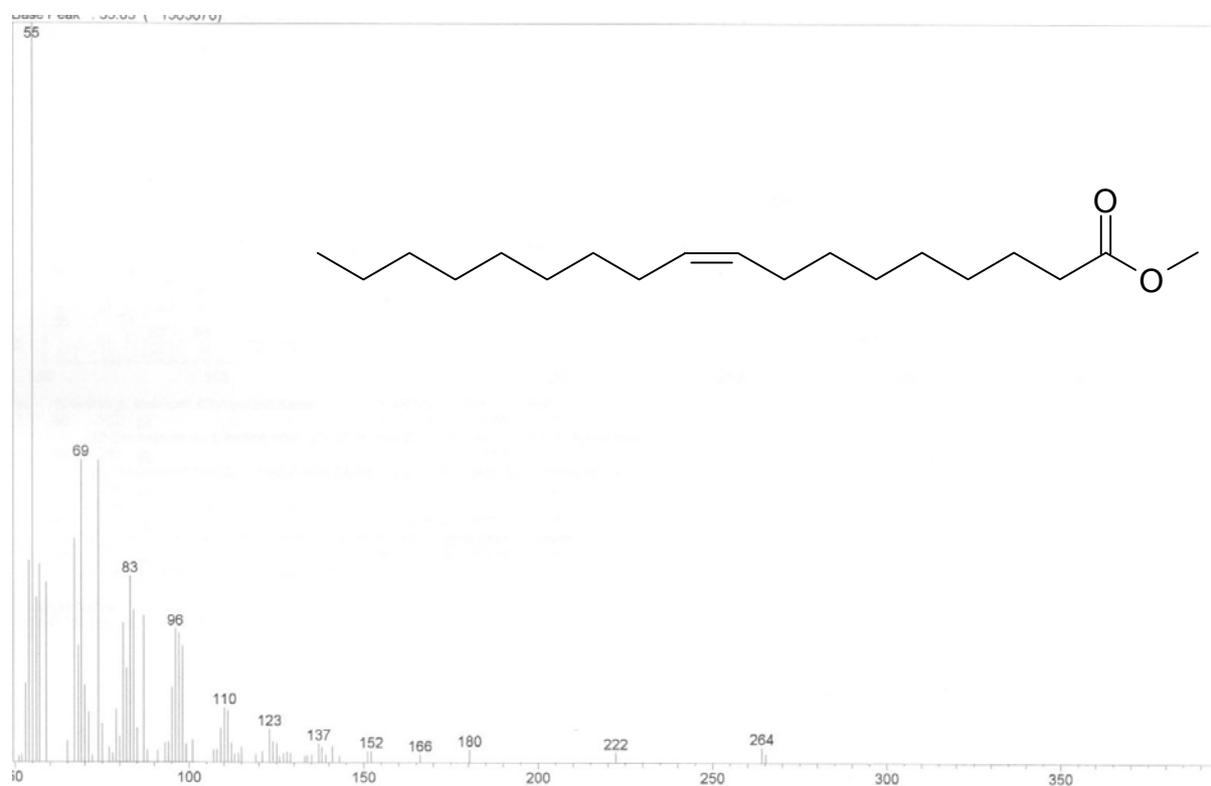
Espectro 40: Espectro de massas do éster metílico do ácido dodecanóico (ác. láurico)



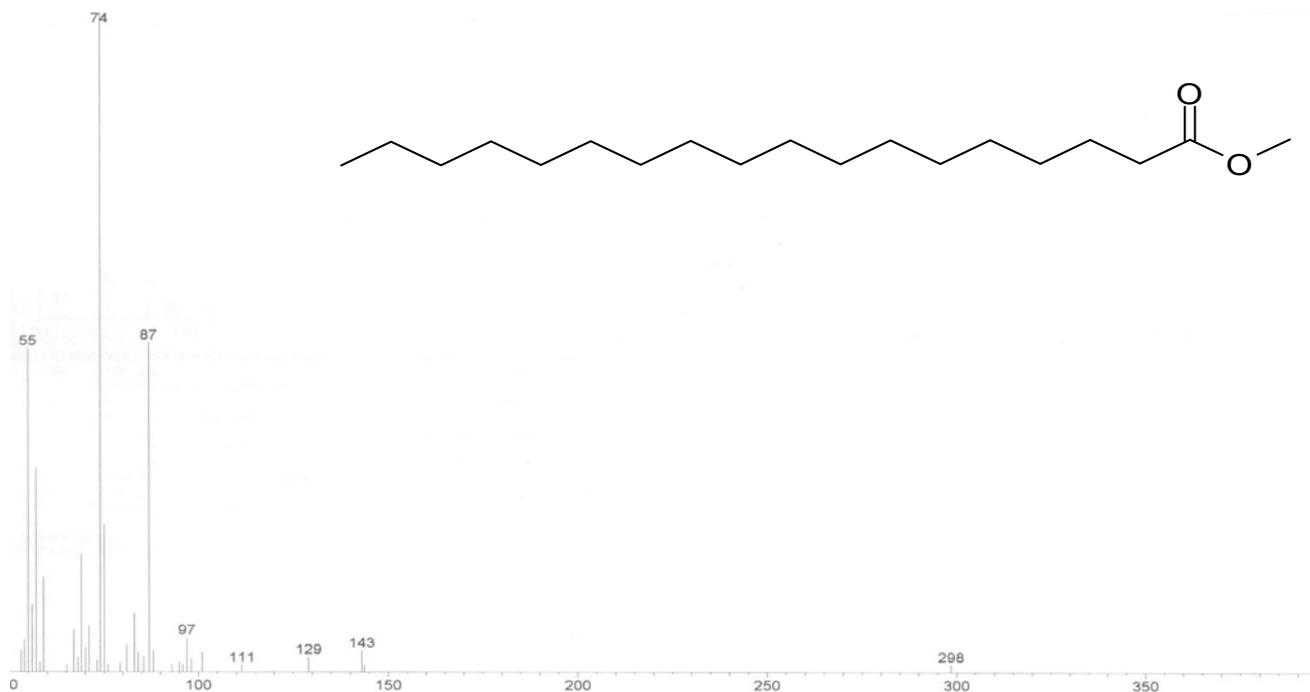
Espectro 41: Espectro de massas do éster metílico do ácido tetradecanóico (ác. mirístico)



Espectro 42: Espectro de massas do éster metílico do ácido hexadecanóico (ác. palmítico)



Espectro 43: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecenóico-9 (ác. oleico)



Espectro 44: Espectro de massas do éster metílico do ácido octadecanóico (ác. esteárico)

Comparando o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de *Serenoa repens* obtido do laboratório Herbarium, podemos observar que os mesmos encontram-se presentes nos extratos obtidos das folhas de *Copernicia cerifera*.

Através de comparação das informações (obtido da literatura) sobre a composição de ácidos graxos do extrato padronizado de *Serenoa repens*, o Permixon®, e o extrato obtido da Herbarium, podemos observar neste último a ausência do ácido linoleico (ácido 9,12-octadecadienóico), que também se encontra presente na palmeira brasileira estudada nesse trabalho. O ácido tetracosanóico encontra-se presente somente nas folhas de *C. cerifera*.

Um estudo realizado com o Permixon® avaliou a capacidade dos ácidos graxos de cadeia longa presentes nesse extrato de inibir as isoformas 1 e 2 da enzima 5α -redutase, o principal alvo no tratamento da hiperplasia prostática benigna (HPB). Neste estudo foi observado que os ácidos oléico e linoleico são capazes de

inibir a isoforma 1 da enzima, enquanto o ácido mirístico é capaz de inibir fortemente a isoforma 2. O ácido láurico é capaz de inibir as duas isoformas da enzima. No entanto, os ácidos palmítico e esteárico foram inativos tanto para a isoforma 1 quanto para a 2 da enzima 5 α -redutase (RAYNAUD *et al*, 2002).

Por meio da análise dos dados obtidos, tanto de maneira experimental quanto através da literatura, pode-se ter um indicativo de que os extratos apolares obtidos das folhas de *Copernicia cerifera* possam ter algum potencial terapêutico para o tratamento da HPB. Isto porque possui os ácidos graxos capazes de inibir a isoforma 1 da enzima 5 α -redutase. No entanto, são necessários estudos mais profundos, inclusive estudos toxicológicos que possam verificar a inocuidade desses extratos quando utilizados pelo homem.

Tabela 10 – Comparação entre a composição de ácidos graxos do óleo comercial de *Serenoa repens* e aquela encontrada nas folhas e frutos de *C. cerifera*.

Ácidos graxos	<i>S. repens</i> Herbarium	<i>S. repens</i> Permixon®	<i>C. cerifera</i> folhas	<i>C. cerifera</i> frutos
Ác. decanóico (ác. cáprico)				
Ác. dodecanóico (ác. láurico)	x	x		
Ác. tetradecanóico (ác. mirístico)	x	x		
Ác. hexadecanóico (ác. palmítico)	x	x	x	x
Ác. hexadecenoico-9 (ác. palmitoleico)				
Ác. octadecanóico (ác. esteárico)	x	x	x	x
Ác. octadecenoico-9 (ác. oléico)	x	x	x	
Ác. 9,12-octadecadienoico (ác. linoleico)		x	x	
Ác. tetracosanóico			x	

5 - Discussão dos Perfis de Fragmentação das Séries de Substâncias Identificadas em *C. cerifera*

Perfil de fragmentação de hidrocarbonetos de cadeia longa

O pico do íon molecular de um hidrocarboneto linear saturado aparece sempre, embora com baixa intensidade, em substâncias de cadeia longa. A seqüência de fragmentação é caracterizada por aglomerados de picos afastados uns dos outros por 14 unidades de massa (CH_2). O maior pico em cada aglomerado corresponde a um fragmento $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, que ocorre em massa $m/z = 14n + 1$ e é geralmente acompanhado por fragmentos C_nH_{2n} e $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$. Os picos mais intensos ocorrem em C_3 e C_4 e suas intensidades diminuem suavemente até $\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5$. O pico de perda de metila é normalmente fraco ou inexistente. As substâncias contendo oito ou mais átomos de carbono mostram espectros muito semelhantes e a identificação depende fundamentalmente do íon molecular.

Os espectros dos hidrocarbonetos saturados ramificados são semelhantes aos de cadeia linear, porém a diminuição progressiva das intensidades dos aglomerados é perturbada pelas fragmentações preferenciais correspondentes a cada ramificação.

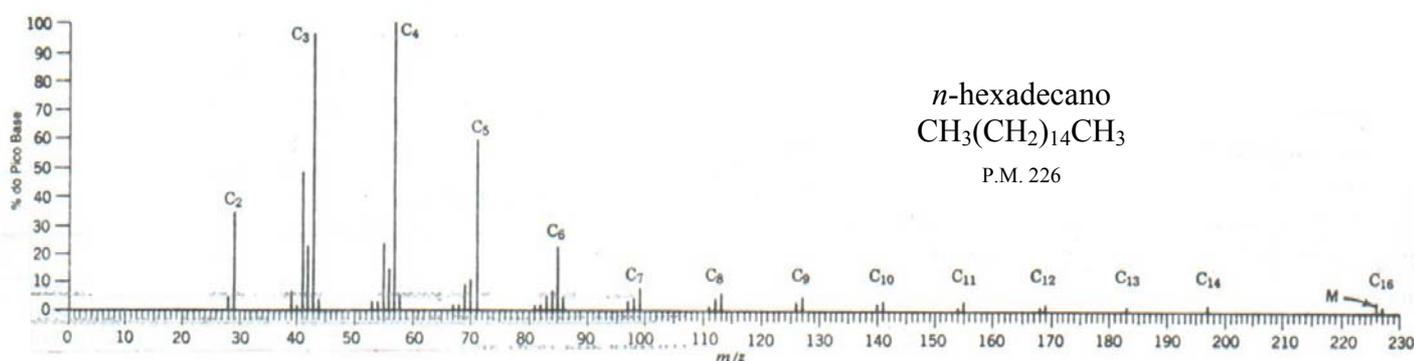


Figura 14: Exemplo de perfil de fragmentação de um hidrocarboneto de cadeia longa
Perfil de fragmentação de ácidos carboxílicos alifáticos

O pico do íon molecular dos ácidos monocarboxílicos lineares é fraco, porém pode ser geralmente observado. O pico mais característico (que é algumas vezes o pico base) ocorre em m/z 60 e é devido ao rearranjo de McLafferty. A ramificação no carbono α intensifica o fragmento.

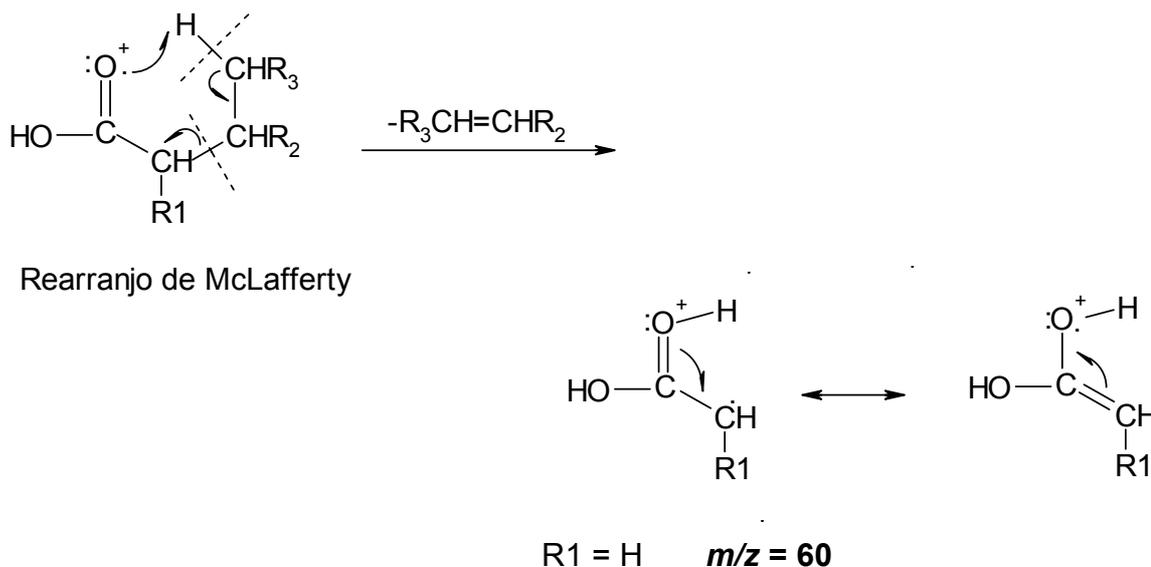


Figura 15: Rearranjo de McLafferty em ácidos carboxílicos

Em ácidos graxos de cadeia longa. O espectro mostra duas séries de picos que resultam da quebra de cada ligação C-C, com retenção de carga pelo fragmento contendo oxigênio (m/z 45, 59, 73, 87...) ou pelo fragmento alquila (m/z 29, 43, 57, 71, 85...). Além do pico de rearranjo de McLafferty, o espectro de um ácido graxo de cadeia longa assemelha-se às séries de aglomerados “hidrocarbônicos” a intervalos de 14 unidades. Em cada aglomerado, entretanto, existe um pico intenso em $C_nH_{2n-1}O_2$. O ácido hexadecanóico (P.M. 116), por exemplo, fragmenta-se da seguinte maneira:

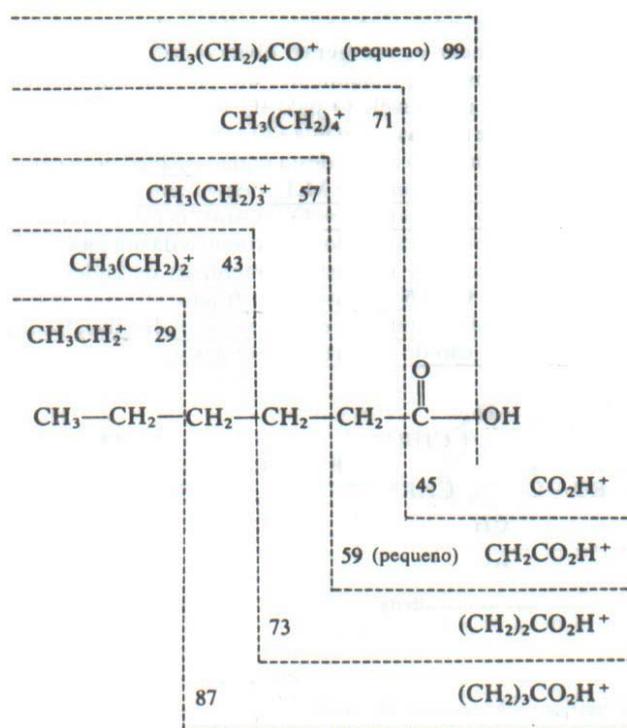


Figura 16: Perfil de fragmentação do ácido hexadecanóico

Perfil de fragmentação de ésteres de ácidos carboxílicos alifáticos

O pico do íon molecular do éster metílico de um ácido alifático de cadeia linear é, em geral, observado. Até mesmo os ésteres graxos mostram, geralmente, um pico do íon molecular pouco intenso na faixa de massas entre m/z 130 e 200, aproximadamente, tornando-se mais intenso acima desta região. O pico mais característico é devido ao rearranjo de McLafferty, com quebra da ligação β em relação ao grupo $\text{C}=\text{O}$. Assim, o éster metílico de um ácido alifático não ramificado no carbono α dá um pico intenso em m/z 74, o pico base dos ésteres metílicos de cadeia linear na faixa de C_6 a C_{26} . A estrutura do fragmento que retém a hidroxila e a

do substituinte em α podem ser deduzidas, freqüentemente, pela posição do pico resultante desta quebra.

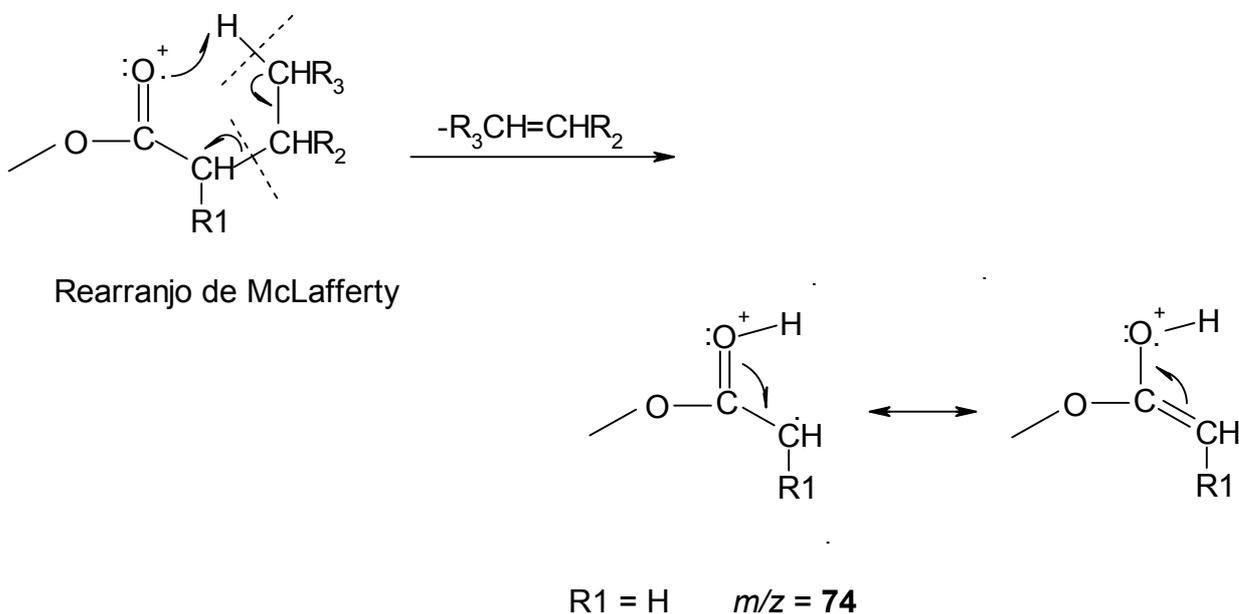


Figura 17: Rearranjo de McLafferty em ésteres de ácidos carboxílicos

Quatro íons podem resultar da quebra da ligação em relação ao grupo C=O.

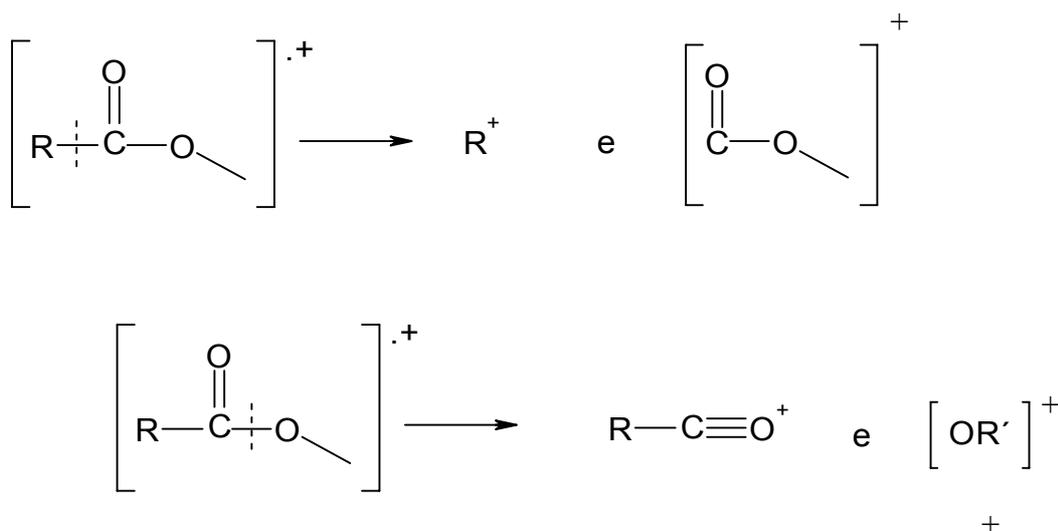


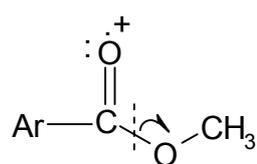
Figura 18: Íons resultantes da ligação α em relação o grupo C=O

O íon R^+ é intenso nos éteres de cadeia curta, mas diminui de intensidade rapidamente com o aumento da cadeia, sendo dificilmente perceptível já no hexanoato de metila. O íon $R-C\equiv O^+$ é característico dos ésteres. No caso dos ésteres metílicos ele é observado em M-31, e é o pico base do acetato de metila.

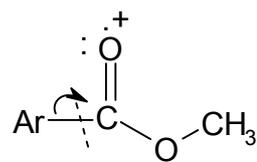
A seqüência de fragmentação dos ésteres metílicos de ácidos de cadeia linear, por exemplo, pode ser descrita de maneira análoga à utilizada para os ácidos lineares correspondentes. A quebra sucessiva das ligações C-C dá origem a íons alquilas (m/z 29, 43, 57,...) e a íons contendo oxigênio, $C_nH_{2n-1}O_2^+$ (m/z 59, 73, 87,...). Aparecem, assim, aglomerados hidrocarbônicos em intervalos de 14 unidades de massa e em cada um deles existe um pico ($C_nH_{2n-1}O_2$) intenso. O pico (m/z 87), que corresponde formalmente ao íon $[CH_2CH_2COOCH_3]^+$ é sempre mais intenso do que seus análogos, e a razão disto não é tão óbvia.

Perfil de fragmentação de ésteres de ácidos aromáticos

O pico do íon molecular dos ésteres metílicos dos ácidos aromáticos é intenso. Com o aumento do tamanho da porção alquila, a intensidade do pico do íon molecular diminuiu rapidamente, tornando-se praticamente nula acima de C_5 . O pico base resulta na eliminação de $\cdot OR$, enquanto que a eliminação de $\cdot COOR$ contribui para um outro pico intenso. Em ésteres metílicos estes picos ocorrem a M-31 e M-59, respectivamente.



M-31



M-59

Figura 19: Fragmentação com perda de M-31 e M-59

Estas duas fragmentações explicam os picos mais intensos encontrados nesse grupo de substâncias

II – ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Frente à inexistência de informações na literatura relacionadas com o estudo farmacológico das folhas e frutos de *Copernicia cerifera*, foram realizados ensaios farmacológicos no intuito de avaliar a presença ou não de extratos com atividade antioxidante, analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana.

1 – Ensaio Químico

Determinação da Atividade Antioxidante dos extratos de *C. cerifera*

O ensaio da atividade antioxidante (AAO) pelo método químico do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidralazila) é um procedimento de rotina realizado no laboratório do Prof. Dr. Fábio de Sousa Menezes. Nesse ensaio foram testados os extratos etanólicos de folhas (EEFO), frutos (EEFR) e casca (EECA) de *C. cerifera*. Como controle positivo foram utilizados uma solução padrão de rutina e uma solução etanólica de extrato de *Gingko biloba* EGb 761 (EEGB), tratados da mesma forma que as amostras citadas. Todos os testes foram realizados em triplicata, com um n igual a três (n=3), e os resultados expressos como média do percentual da AAO (%AAOM). Os valores de CE₅₀ (concentração necessária para se obter metade do efeito antioxidante máximo, estimado em 100%) foram obtidos por regressão logarítmica, com coeficientes de determinação $r^2 \geq 0,88$. O tratamento estatístico dos dados de três testes separados (ANOVA) evidenciou que estes são estatisticamente equivalentes ($p = 0,05$). Todos os extratos etanólicos de *C. cerifera* testados pelo método químico apresentaram % AAOM superior ao resultado do padrão de rutina e ligeiramente menor que o do *G. biloba* na maior concentração testada. Dentre todos os extratos testados, o de folhas

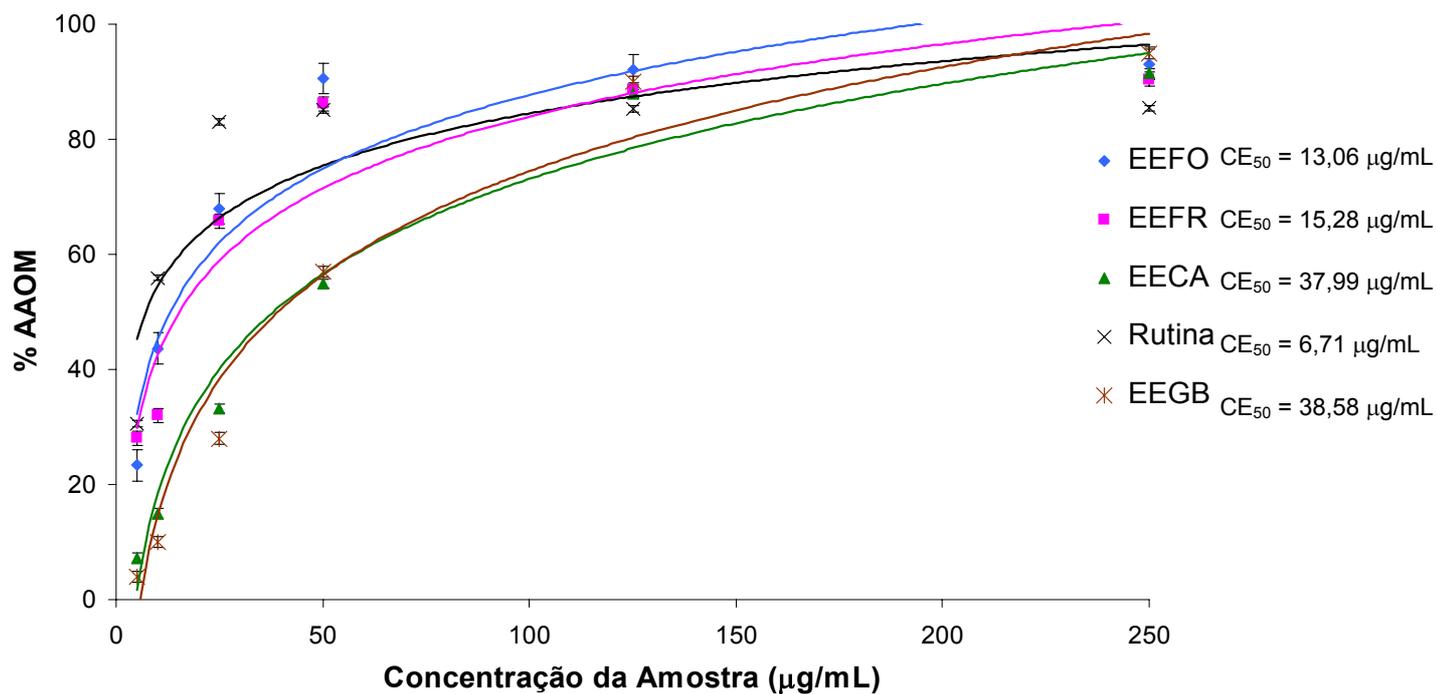
foi o que apresentou o maior percentual de AAO na concentração de 250 µg/ml. O extrato etanólico das cascas de *C. cerifera* foi o que apresentou menor AAOM dentre todos os três extratos testados, porém a maior concentração testada ainda se equipara ao % AAO do padrão de rutina. É importante verificar ainda que a CE_{50} para o extrato etanólico das cascas foi cerca de 6 vezes maior que o resultado observado para a solução de rutina, e cerca de 2 vezes para os extratos de folhas e frutos. Todos os extratos de *C. cerifera* testados apresentaram valor de CE_{50} menor do que o valor apresentado para o extrato de *G. biloba*, tendo sido o extrato das folhas da palmeira aproximadamente três vezes mais potente que esse primeiro (Tabela 11; Gráficos 1 e 2, pág 98).

Tabela 11: Percentual médio das atividades antioxidantes (% AAOM) dos extratos etanólicos de folhas (EEFO), frutos (EEFR) e cascas (EECA) de *C. cerifera*, solução etanólica do extrato de *G. biloba* EGb 761(EEGB) e do padrão de rutina e seus valores de CE_{50} .

Concentração dos extratos (µg/ml)	% AAOM ± DP				
	EEFO	EEFR	EECA	Rutina	EEGB
250	93,02 ± 0,34	90,44 ± 0,81	91,47 ± 0,46	85,38 ± 0,11	95,23 ± 0,43
125	92,05 ± 0,48	88,59 ± 1,83	87,90 ± 0,14	85,33 ± 0,85	90,07 ± 0,82
50	90,60 ± 0,84	86,16 ± 0,51	54,92 ± 0,87	85,11 ± 0,01	57,02 ± 0,55
25	67,96 ± 3,61	65,77 ± 1,38	33,22 ± 0,41	82,94 ± 0,11	28,14 ± 1,37
10	43,64 ± 10,03	32,07 ± 1,43	14,99 ± 1,51	58,35 ± 0,39	10,03 ± 3,25
5	23,36 ± 1,22	28,05 ± 1,41	7,20 ± 1,54	30,61 ± 1,89	4,57 ± 1,51
CE_{50}	13,06	15,28	37,99	6,71	38,58

Os resultados obtidos para os extratos de *C. cerifera*, quando comparados com aqueles observados para o extrato de *Ginkgo biloba* (Tanakan® líquido, que corresponde ao extrato padronizado de *Ginkgo biloba* EgB 761), demonstraram que os mesmos foram superiores aqueles encontrados para o *G. biloba*, sobretudo no que se refere à potência desses extratos, expressos em valores de CE_{50} .

Atividade Antioxidante de Extratos de *C. cerifera*



Atividade Antioxidante (AAO) de Extratos de *C. cerifera*

250 µg/ml
 125 µg/ml
 50 µg/ml
 25 µg/ml
 10 µg/ml
 5 µg/ml

a,

Gráfico 2: Percentual médio da atividade antioxidante (% AAOM) versus concentração das amostras dos extratos testados de *C. cerifera*, *G. biloba* e rutina testados. Representação por barras.

Observando o gráfico representado em forma de barras, pode-se ter uma visão melhor dos perfis de % de AAOM dos extratos testados, uma vez que o gráfico representado por curvas apresentou linhas sobrepostas. Pode-se observar que a atividade anti-radical livre *in vitro* da rutina se apresenta um pouco diferente das demais, uma vez que diferentes concentrações apresentam % de AAO muito semelhantes. Também apresenta o menor valor de CE_{50} , o que a torna um antioxidante neste teste mais potente que os extratos utilizados. Depois da rutina, o extrato testado que apresentou menor valor de CE_{50} foi o extrato etanólico de folhas de *C. cerifera*. Seu valor de CE_{50} foi praticamente o dobro do padrão de rutina, e neste teste pode-se afirmar que este extrato apresenta metade da potência apresentada pelo padrão testado. De todos os extratos testados, o que apresentou menor potência foi o extrato etanólico das cascas de *C. cerifera*, que se mostrou cerca de 6 vezes menos potente que o padrão de rutina, porém sua potência pode ser comparada àquela encontrada para o extrato de *G. biloba*. Importante ressaltar que todos os extratos de *C. cerifera* testados apresentaram-se mais potentes que o padrão de *G. biloba* testado. No entanto, no que se refere ao efeito relacionado com as maiores doses, todos os extratos são equiparáveis aos dois padrões de antioxidantes testados. Com isso, podemos sugerir que os extratos etanólicos de *C. cerifera* possuem substâncias antioxidantes em seus constituintes. A exemplo da atividade bastante elevada observada para EEFO, pode-se sugerir que esse extrato foi muito antioxidante. Isto ocorreu provavelmente, devido à presença de substâncias encontradas na partição em acetato de etila, que são derivadas do ácido gálico (C_6-C_1) e derivadas do ácido cinâmico (C_6-C_3). Essas substâncias, que foram identificadas com as hidroxilas metiladas, poderiam estar na planta com as hidroxilas livres, e dessa maneira seriam capazes de doar um radical hidrogênio para a

molécula de DPPH, o que justificaria o resultado encontrado. Esses extratos merecem ter, posteriormente, suas frações resolvidas, a fim de tentar identificar quais possíveis grupos de substâncias possam estar exercendo esses efeitos nos extratos estudados.

2 – Ensaio Biológicos

Avaliação da Atividade Antioxidante dos Extratos

de *C. cerifera in vivo*

As células de *S. cerevisiae* foram crescidas em meio YPD 2% (2% de glicose; 1% de extrato de levedo; 2% de peptona), a 28°C/160 rpm, em frascos cônicos contendo 20% do seu volume preenchido com o meio. As células foram coletadas com uma concentração de 0,5 – 1,0 mg (peso seco)/ml e re-inoculadas em meio fresco contendo somente a droga (nesse caso, o peróxido de *tert*-butila) ou droga juntamente com o extrato (na concentração final de 5 mg/ml de meio). A concentração inicial de células em todas as condições foi de 0,1 mg/ml e os cultivos permaneciam a 28°C/160 rpm em frascos cobertos com papel laminado. Após 3,5 ou 17 h de incubação, determinou-se a tolerância celular por plaqueamento em meio YPD 2% sólido. As colônias foram contadas após 72 h de crescimento a 28°C e os resultados expressos como a porcentagem de sobrevivência calculada em relação ao cultivo que não recebia nenhuma droga (controle). O extrato de *G. biloba* utilizado como padrão antioxidante não demonstrou proteção neste teste, não havendo percentual de sobrevivência nos dois tempos testados para as células de *S.*

cerevisiae. Neste ensaio foram testados os extratos etanólicos de folhas e frutos de *C. cerifera* (Tabela 12 e Gráfico 3).

Com relação à atividade antioxidante, os dois extratos etanólicos totais testados apresentaram os seguintes resultados, como pode ser visto na tabela a seguir:

Tabela 12: Percentuais de sobrevivência der células de *Sacaromyces cerevisiae* relacionados à atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folhas (EEFO) e frutos de carnaúba (EEFR).

Extrato	Tempo de incubação (h)	Controle		Droga		Droga + Extrato	
		mg cel./ml	Sobrevivência (%)	mg cel./ml	Sobrevivência (%)	mg cel./ml	Sobrevivência (%)
Folhas	3,5	-	-	-	-	-	-
	17	2,88	100	0,11	0	0,56	11,5
Frutos	3,5	0,45	100	0,10	0	0,41	33
	17	2,8	100	0,10	0	0,5	6,6

Atividade Antioxidante de Extratos de *C. cerifera* sobre células de *S. cerevisiae*

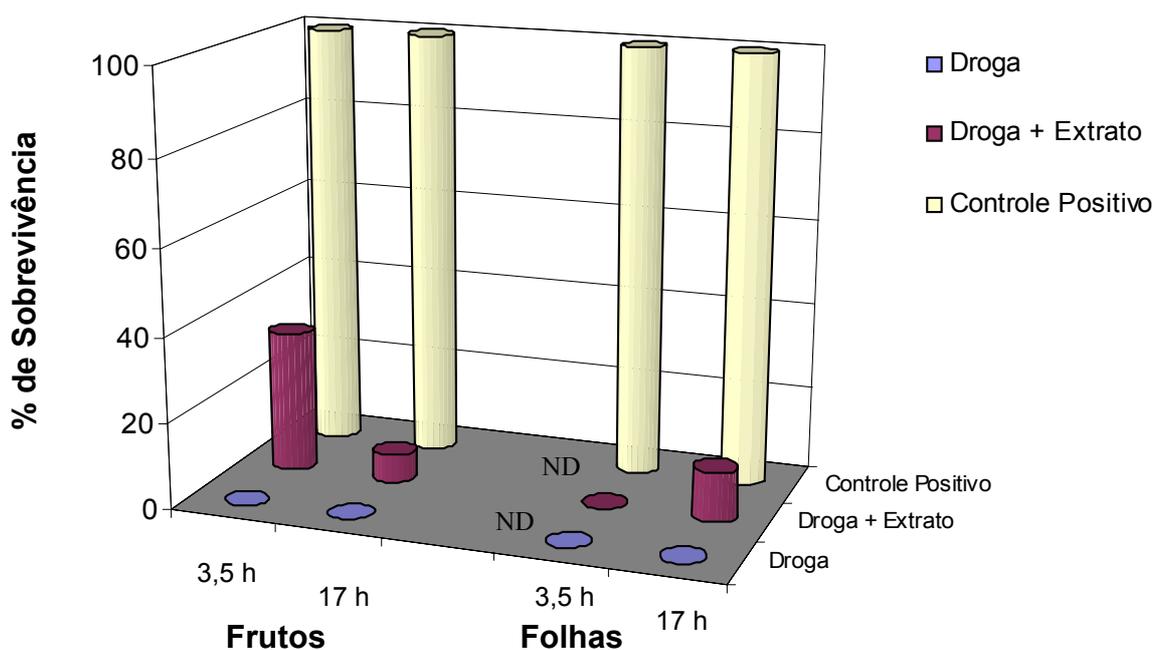


Gráfico 3: Atividade antioxidante, expressa em percentual de sobrevivência, dos extratos etanólicos de frutos e folhas de *C. cerifera*. ND = não determinado

Através da observação dos valores plotados nos gráficos, onde são expressos os percentuais de sobrevivência das células de *S. cerevisiae*, pode-se verificar a ação dos extratos etanólicos de frutos e folhas de *C. cerifera* na proteção dessas mesmas células. A atividade antioxidante sobre as células de *S. cerevisiae* não foi determinada (ND) para o extrato etanólico de folhas no tempo de 3,5 horas. Para o tempo de 17 horas, foi determinado um percentual de sobrevivência de 11,5%. A respeito dos frutos de *C. cerifera*, pode-se verificar que os extratos de frutos apresentaram atividade antioxidante nos dois tempos testados. Nesse caso, o tempo de 3,5 horas apresentou resultado melhor que o tempo de 17 horas. Este resultado pode se dar provavelmente pelo fato de que, no decorrer do tempo do experimento, estejam sendo consumidas as substâncias que possam estar atuando como antioxidante. Uma vez consumidas as substâncias com atividade antioxidante, o agente químico responsável pelos danos celulares na cepa de fungo utilizada no experimento atuaria novamente sobre as células. Isto justificaria a diminuição do percentual de sobrevivência, em relação àquela contada com 3,5 hs.

Comparando os extratos de folhas e frutos, pode-se verificar que o extrato das folhas, no tempo de 17 horas de experimento, apresentou resultado superior aquele apresentado pelos frutos, sendo o primeiro cerca de 1,7 vezes maior que o segundo. Pode-se sugerir então, que esse perfil de resultado seja repetido para os extratos testados de folhas e frutos no tempo de 3,5 horas (o percentual de sobrevivência das células para o extrato de folhas no tempo de 3,5 horas não foi determinado experimentalmente). Da mesma forma pode-se sugerir que o extrato de folhas apresente resultado de percentual de sobrevivência das células maior para o tempo de 3,5 horas que aquele encontrado para o tempo de 17 horas, tal como ocorreu com o extrato dos frutos.

No entanto, é difícil a comparação entre as metodologias dos ensaios químicos e com células, uma vez que os resultados apresentados no ensaio químico são bem semelhantes para os dois extratos, sobretudo no valor de CE_{50} encontrado. Isso sugere claramente que os mecanismos de ação antioxidantes nos dois testes são diferentes.

Avaliação da Atividade Analgésica dos Extratos de *C. cerifera*

- **Placa Quente ou “Hot Plate”**

Para a avaliação da atividade analgésica utilizando o teste da placa quente, foram utilizados 5 camundongos, os quais foram tratados com as soluções dos extratos brutos hexânicos dos frutos (EHFR) e folhas (EHFO) e os extratos etanólico (EEFO) e butanólico de folhas (EBFO), todos eles na dose de 100mg/kg. Para avaliar a atividade dos extratos foi medido o tempo que os animais permaneciam sobre a chapa quente na temperatura de $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$, até reagirem ao estímulo térmico. O tempo de *cut off* estabelecido para este teste é de 30 segundos, e se refere ao tempo máximo no qual o animal pode permanecer sobre a chapa quente, sem causar danos e lesões nos tecidos das patas. O fentanil é um analgésico opióide utilizado na dor aguda e também em casos de anestesia, e neste experimento foi utilizado como controle positivo. PBS e DMSO 20% são utilizados como diluente e solvente, respectivamente.

Para avaliar o efeito dos extratos de *C. cerifera*, deve-se comparar os resultados com aqueles observados para o fentanil na dose de 0,3 mg/kg, utilizado como controle positivo. A Tabela 13, pág. 104, mostra os valores médios, em segundos, com seus respectivos desvios padrão. A seguir, tem-se o Gráfico 4, pág. 104, onde é possível visualizar os efeitos dos extratos ao longo do tempo do teste.

Os valores de tempo negativos referem-se ao tempo anterior à administração dos extratos.

De todos os extratos testados, apenas os extratos etanólico de folhas e hexânico de frutos apresentaram discreta atividade analgésica 30 minutos após sua administração. Para o extrato etanólico de folhas, seu efeito máximo se deu 60 minutos após sua administração. Ao fim do experimento, os valores dos tempos de reação retornaram aqueles observados no início do experimento (Tabela 13; Gráfico 4).

Tabela 13: Efeito dos extratos EBFO, EEFO, EHFO e EHFR de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação (em segundos) no teste da placa quente. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 5).

Tempo (minutos)	PBS (segundos)	DMSO 20% (segundos)	Fentanil 0,3 mg/mkg (s)	EBFO 100mg/kg (s)	EEFO 100mg/kg (s)	EHFO 100mg/kg (s)	EHFR 100mg/kg (s)
- 60	10,49 ± 0,91	9,59 ± 0,51	10,37 ± 0,70	10,51 ± 0,56	10,90 ± 0,72	9,19 ± 1,13	12,08 ± 0,24
- 30	11,84 ± 0,67	11,90 ± 0,40	10,47 ± 0,97	10,67 ± 0,47	10,55 ± 1,02	8,95 ± 0,90	11,25 ± 0,63
30	12,20 ± 0,68	11,86 ± 0,59	29,35 ± 0,38	11,21 ± 1,11	15,09 ± 0,63	9,94 ± 1,44	16,46 ± 0,48
60	12,20 ± 0,99	12,64 ± 0,51	27,86 ± 1,30	11,40 ± 1,39	16,75 ± 0,41	10,75 ± 0,84	15,03 ± 0,38
90	12,47 ± 1,30	11,85 ± 0,59	16,01 ± 1,19	11,83 ± 0,93	12,18 ± 1,06	10,91 ± 0,71	12,62 ± 0,31
120	12,51 ± 0,56	11,46 ± 0,85	16,18 ± 1,40	9,86 ± 0,22	10,90 ± 0,55	10,39 ± 0,64	10,31 ± 0,45

Teste da Placa Quente ou Hot Plate

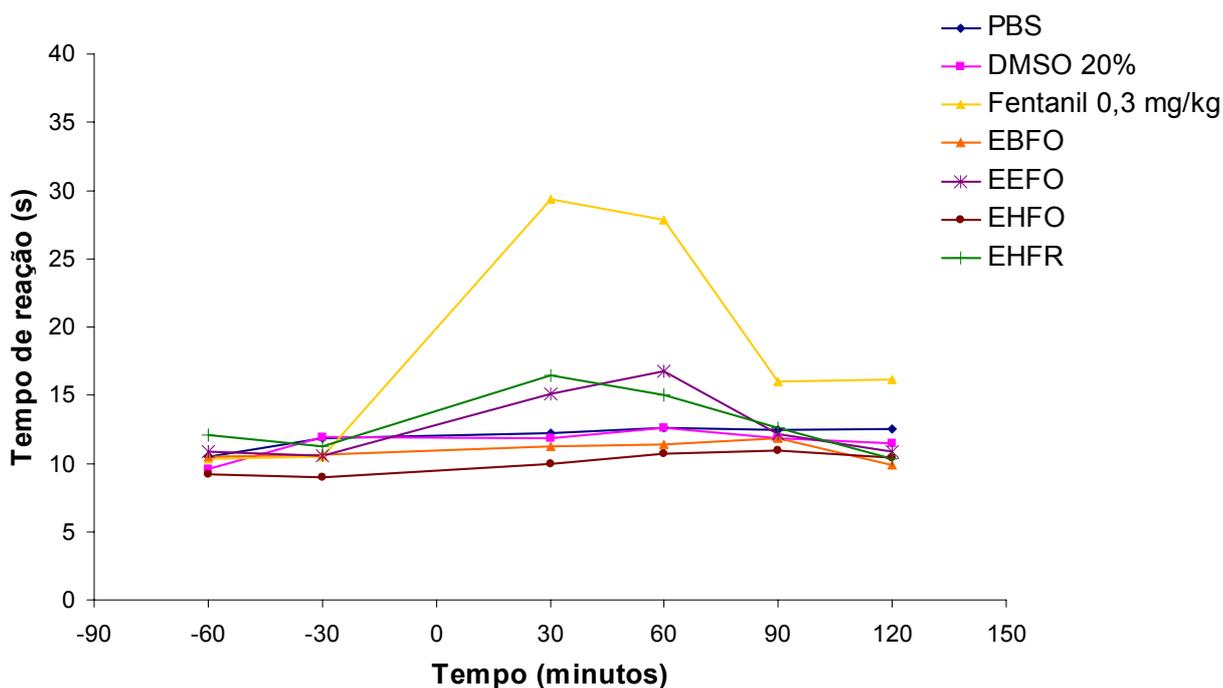


Gráfico 4: Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste da placa quente

- **Retirada da Cauda ou “Tail Flick”**

Para a avaliação da atividade analgésica utilizando o teste da retirada da cauda, foram utilizados 5 camundongos, os quais foram tratados com as soluções dos extratos brutos hexânicos dos frutos (EHFR) e folhas (EHFO) e os extratos etanólico (EEFO) e butanólico de folhas (EBFO), todos eles na dose de 100mg/kg. Para avaliar a atividade dos extratos foi medido o tempo que os animais levaram para tirar a cauda do banho a $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$. Os limiares de respostas ao teste foram normatizados através do índice de antinocicepção da retirada da cauda (IARC). O fentanil é um analgésico opióide utilizado na dor aguda e também em casos de anestesia, também é utilizado neste experimento como controle positivo. PBS e DMSO 20% também são utilizados como diluente e solvente nos extratos testados, respectivamente. Os extratos etanólico de folhas (EEFO) e hexânico de frutos (EHFR) foram os extratos que apresentaram maior atividade nesse teste (Tabela 14; Gráfico 5, pág. 106). Os extratos butanólico e hexânico de folhas (EBFO e EHFO) não apresentaram resultados relevantes nesse teste.

Tabela 14: Efeito dos extratos EBFO, EEFO, EHFO e EHFR de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de retirada da cauda (em segundos) no e valores de IARC. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n = 5). * $p < 0,05$ (teste T de Student)

Tempo (minutos)	PBS (segundos)	DMSO 20% (segundos)	Fentanil 0,3 mg/mkg (s)	EBFO 100mg/kg (s)	EEFO 100mg/kg (s)	EHFO 100mg/kg (s)	EHFR 100mg/kg (s)
- 40	3,02 \pm 0,06	3,04 \pm 0,10	3,33 \pm 0,15	3,03 \pm 0,60	3,04 \pm 0,54	3,20 \pm 0,21	3,10 \pm 0,45
- 20	2,96 \pm 0,12	3,14 \pm 0,10	3,16 \pm 0,10	3,07 \pm 0,40	3,10 \pm 0,08	3,10 \pm 0,35	3,20 \pm 0,31
20	2,97 \pm 0,066	2,98 \pm 0,12	7,50 \pm 0,24	3,27 \pm 0,16	6,09 \pm 0,56	3,30 \pm 0,04	6,04 \pm 0,12
40	3,02 \pm 0,14	2,78 \pm 0,12	11,03 \pm 0,24	3,43 \pm 0,24	7,50 \pm 0,75	3,34 \pm 0,57	6,00 \pm 0,34
60	2,78 \pm 0,17	3,30 \pm 0,60	9,95 \pm 0,26	3,40 \pm 0,14	7,78 \pm 0,31	3,41 \pm 0,86	5,60 \pm 0,05
80	3,00 \pm 0,13	3,00 \pm 0,12	8,55 \pm 0,12	3,49 \pm 0,19	5,40 \pm 0,09	2,99 \pm 0,41	5,50 \pm 0,80
100	3,06 \pm 0,211	2,98 \pm 0,14	4,79 \pm 0,38	2,94 \pm 0,09	4,86 \pm 0,046	2,98 \pm 0,09	3,10 \pm 0,35
120	2,72 \pm 0,860	3,14 \pm 0,10	3,29 \pm 0,16	2,94 \pm 0,10	3,54 \pm 0,12	2,87 \pm 0,16	2,99 \pm 0,04

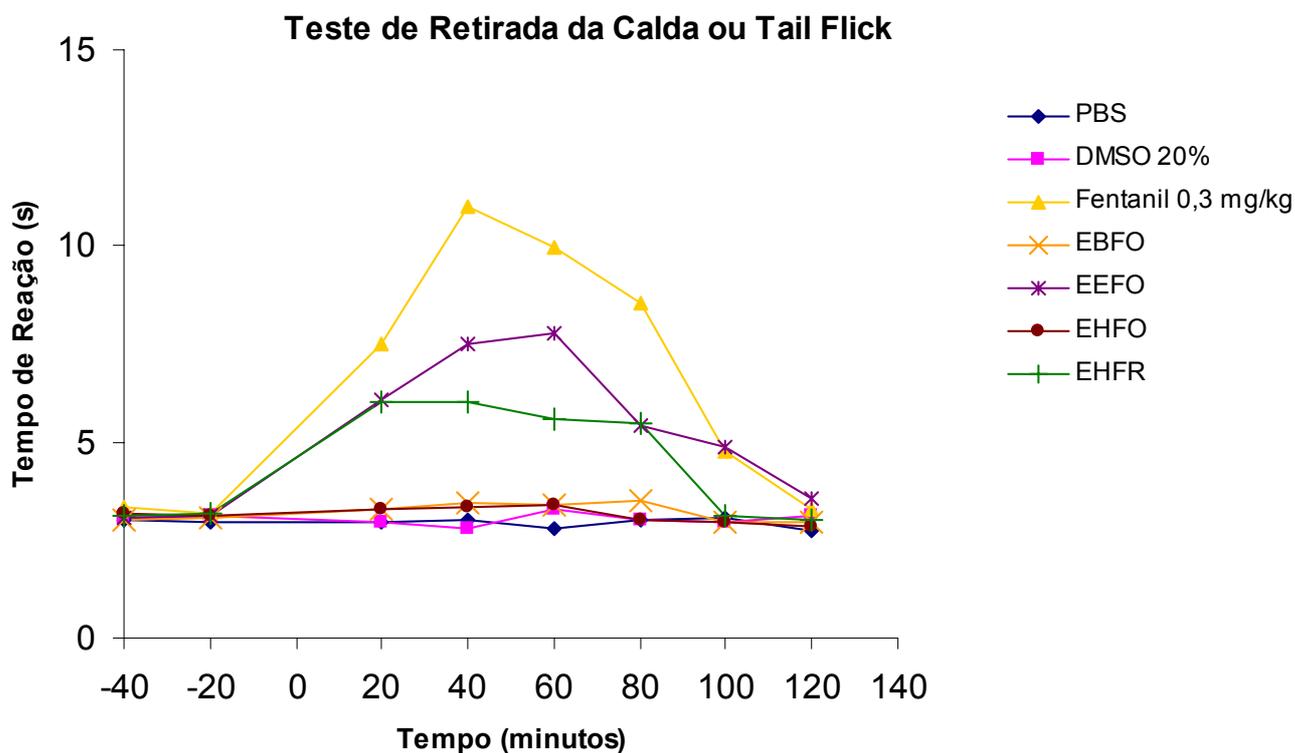


Gráfico 5: Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste de retirada da cauda.

- **Contorções Induzidas por Ácido Acético**

Administrou-se por via oral as soluções dos extratos etanólico de folhas (EEFO) e hexânico de frutos (EHFR) na dose de 100 mg/kg. Após a administração do ácido acético por via intraperitoneal, contou-se o número de contorções. Observou-se que os dois extratos testados na dose de 100 mg/kg obtiveram resultados semelhantes com aquele obtido para a indometacina na dose de 10 mg/kg. Apesar da dose utilizada dos extratos ser de 10 vezes maior que aquela utilizada para o padrão (a indometacina), pode-se dizer que os resultados foram bastante significativos no modelo de analgesia utilizado para esse teste.

Os valores estão apresentados na tabela a seguir, e através do gráfico é possível visualizar os efeitos dos extratos testados (Tabela 15; Gráfico 6)

Tabela 15: Efeito dos extratos de *C. cerifera* na dose de 100 mg/kg sobre o tempo de reação (em segundos) no teste das contorções abdominais. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão (n=7).

* $p < 0,0001$ (teste t de Student)

Controles/Extratos	PBS (segundos)	DMSO 20% (segundos)	Indometacina 10 mg/mkg	EEFO 100mg/kg	EHFR 100mg/kg
Nº de Contorções	59,14 \pm 1,18	54,14 \pm 1,16	24,7 \pm 1,18	22,6 \pm 0,60	26,30 \pm 0,90
% de inibição	----	0	58,23	61,78	55,53

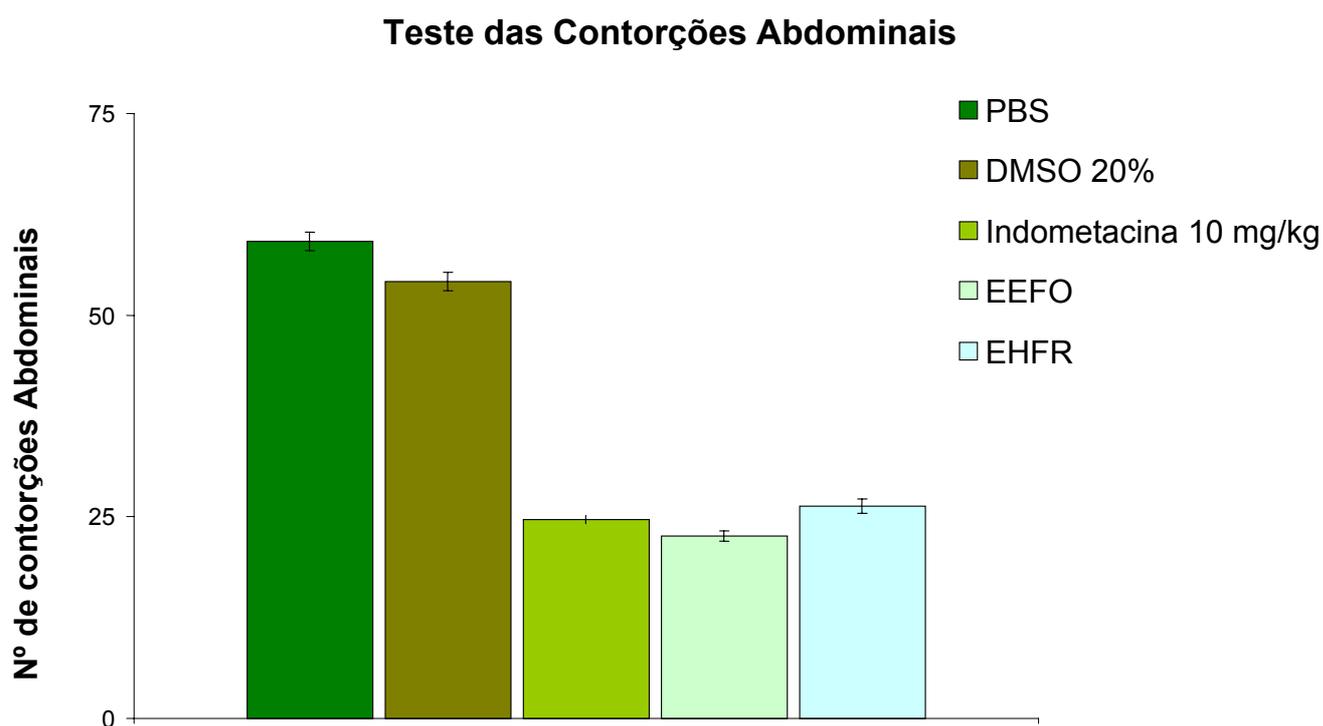


Gráfico 6: Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético

- **Teste da Formalina**

Os animais foram tratados com as soluções dos extratos brutos hexânicos dos frutos (EHFR) e folhas (EHFO) e os extratos etanólico (EEFO) e butanólico de folhas (EBFO) de *C. cerifera*, todos na dose de 100mg/kg. Administrou-se formalina, em injeção via subplantar, em uma das patas traseiras do camundongo e mediu-se então o tempo no qual o animal permaneceu lambendo a pata durante os primeiros 5 minutos, também conhecidos como Fase I ou neurogênica e no intervalo de 15 a 30 minutos, conhecido como Fase II ou tardia. O fentanil na dose de 0,3 mg/kg foi utilizado como analgésico, e a indometacina na dose de 10 mg/kg como antiinflamatório.

De todas as substâncias testadas, pode-se verificar que o fentanil, utilizado como padrão analgésico, foi aquele que mostrou melhor resposta. Comparativamente, a indometacina, utilizada como padrão antiinflamatório, apresentou resultado de redução do tempo de reação de 16,67% (tendo o valor de 100% aquele encontrado para o PBS). Este valor foi inferior ao do fentanil, que apresentou uma redução do tempo de reação de 64,41 % nessa fase. Isto pode ser explicado pelo fato do efeito antiinflamatório “levar mais tempo para se apresentar” do que o efeito analgésico, que neste caso se dá através do bloqueio dos receptores opióides, ao contrário da indometacina, que se dá através do bloqueio enzimático da ciclooxigenase, dentre outros mecanismos.

Comparando os efeitos dos extratos testados de *C. cerifera* na Fase I do teste da formalina, o extrato etanólico de folhas foi aquele que apresentou o melhor resultado, estando seu efeito compreendido entre aqueles encontrados para o fentanil e a indometacina, que foi de 35,43%. Pode-se então sugerir que o extrato etanólico de folhas possa estar atuando sobre os nociceptores localizados na pata

traseira dos animais em teste. O extrato hexânico dos frutos apresentou resultado semelhante ao da indometacina nessa fase, que foi de 18,28% para o extrato. Os demais extratos testados não apresentaram resultados relevantes nesta fase do teste, sendo seus resultados semelhantes aqueles apresentados para o PBS e o DMSO 20% (Tabela 16; Gráfico 7).

Tabela 16: Efeito dos extratos de *C. cerifera* na dose de 100 mg/kg sobre o tempo de reação (em segundos) no teste da formalina Fases I e II. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão (n=5).

* $p < 0,05$ (teste T de Student)

Fases	PBS (segundos)	DMSO 20% (segundos)	Fentanil 0,3 mg/mkg (s)	Indometacina 10 mg/mkg (s)	EBFO 100mg/kg (s)	EEFO 100mg/kg (s)	EHFO 100mg/kg (s)	EHFR 100mg/kg (s)
I	82,58 \pm 3,46	78,33 \pm 2,00	29,39 \pm 0,51	68,82 \pm 2,70	86,67 \pm 3,45	53,32 \pm 1,38	84,94 \pm 1,98	67,48 \pm 1,41
II	117,2 \pm 2,48	116,5 \pm 2,56	71,32 \pm 1,75	61,33 \pm 2,02	10,67 \pm 0,47	10,55 \pm 1,02	8,95 \pm 0,90	11,25 \pm 0,63

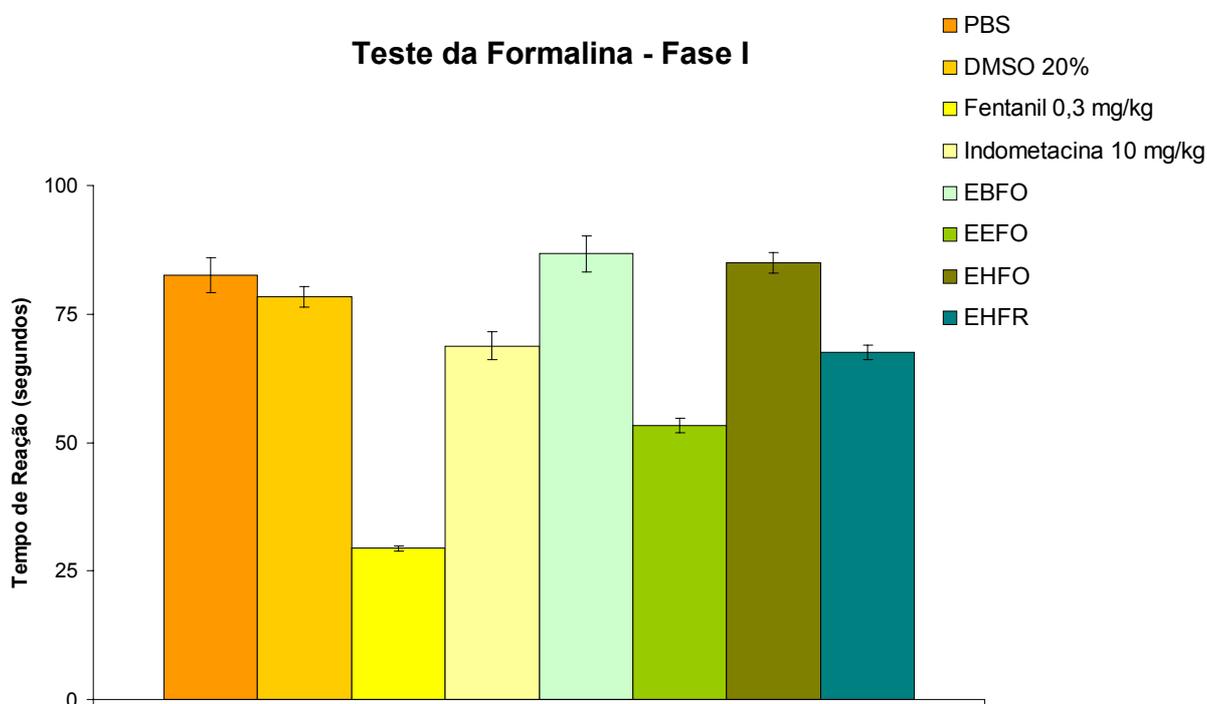


Gráfico 7: Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste da Formalina Fase I.

Analisando os resultados obtidos para a Fase II do teste da formalina, a indometacina apresentou o melhor resultado entre as substâncias testadas, como era de se esperar. Nesta fase, o efeito antiinflamatório se sobrepõe ao efeito analgésico do opióide (fentanil) utilizado como padrão, porém de maneira mais discreta que aquele apresentado na primeira fase. Nesta fase, o extrato etanólico de folhas também foi aquele que apresentou melhor resposta dos extratos testados, seguido do extrato hexânico dos frutos. No entanto, estes resultados foram comparativamente menores que aqueles apresentados na Fase I do teste. Tomando como base os resultados encontrado para o PBS (utilizado como veículo), pode-se dizer que a indometacina apresentou uma redução de resposta de 47,68%, o fentanil de 39,15% e uma discreta redução de resposta de 18,76% para o extrato etanólico de folhas e 11% para o extrato hexânico dos frutos. Os demais extratos não apresentaram resultados positivos (Tabela 16, pág 109; Gráfico 8).

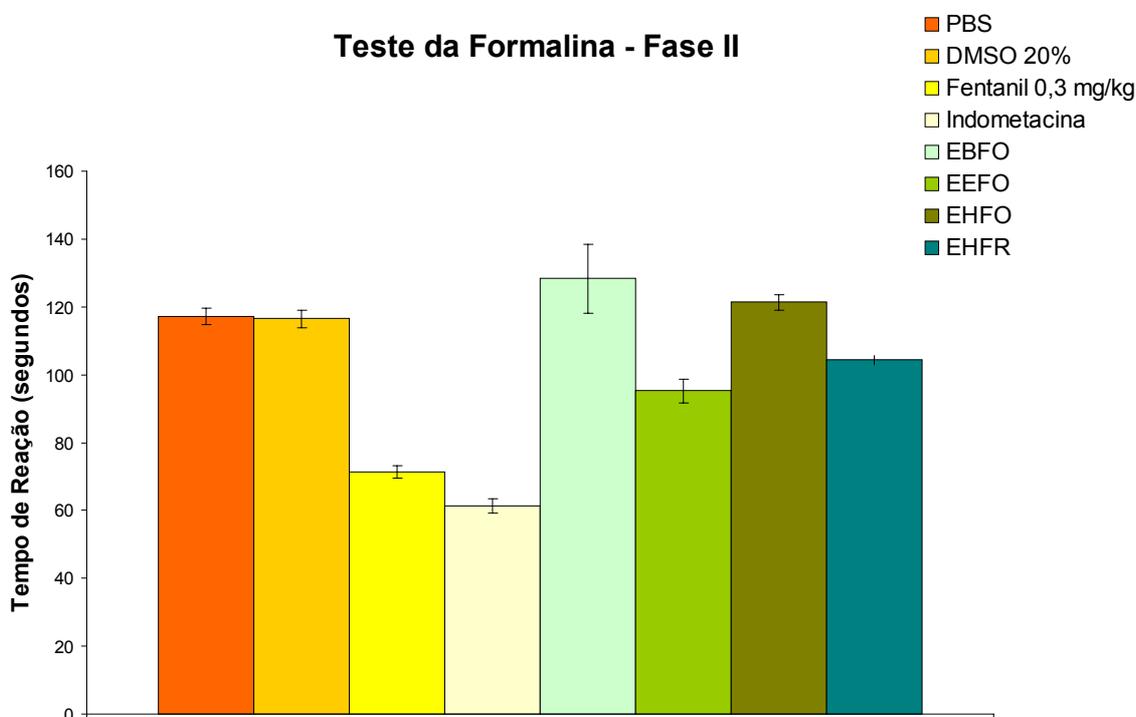


Gráfico 8: Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o tempo de reação no teste da Formalina Fase II.

Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos Extratos de *C. cerifera*

- **Edema de Orelha**

No teste do edema de orelha, os camundongos foram tratados com as soluções dos extratos brutos hexânicos de frutos (EHFR) e folhas (EHFO) e os extratos etanólico (EEFO) e butanólico de folhas (EBFO) de *C. cerifera*, todos elas na dose de 100mg/kg, por via oral. Cada animal recebeu, na superfície interna da orelha, uma solução de óleo de cróton. Os animais foram sacrificados para a remoção de discos de cada orelha, os quais foram pesados para cálculo de diferença de peso entre as orelhas.

Através da análise dos dados obtidos através das medições dos discos, pode-se verificar que a dexametasona, utilizada como padrão de antiinflamatório esteroídico, apresentou o melhor resultado, como era de se esperar. Seguindo da dexametasona, obteve-se melhor resultado com a indometacina, utilizada como padrão antiinflamatório não esteroídico. Comparando os resultados dos extratos testados com os padrões utilizados, pode-se verificar que o extrato etanólico das folhas foi aquele obteve o melhor resultado, seguido de uma discreta atividade para o extrato hexânico dos frutos. Tomando como sendo 100% o valor médio do resultado obtido com o PBS, o extrato etanólico das folhas apresentou uma redução de cerca de 37,2% no edema de orelha dos animais tratados com esse extrato. Para os animais tratados com o extrato hexânico dos frutos, essa redução foi de cerca de 15,6 %. Os demais extratos não apresentaram efeito sobre a redução do edema de orelhas dos animais tratados com os extratos neste ensaio (Tabela 17, pág. 112; Gráfico 9, pág. 112).

Tabela 17: Efeito dos extratos de *C. cerifera* na dose de 100 mg/kg sobre edema de orelha, na dose de 100 mg/kg de extrato. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão (n=5).

* $p < 0,05$ (teste t de Student)

PBS (mg)	DMSO 20% (mg)	Dexametason a 0,5 (mg)	Indometacina 10 mg/mkg (mg)	EBFO 100mg/kg (s)	EEFO 100mg/kg (s)	EHFO 100mg/kg (s)	EHFR 100mg/kg (s)
3,52 \pm 0,22	3,21 \pm 0,14	0,35 \pm 0,10	1,48 \pm 0,26	3,31 \pm 0,19	2,21 \pm 0,14	3,38 \pm 0,18	2,972 \pm 0,06

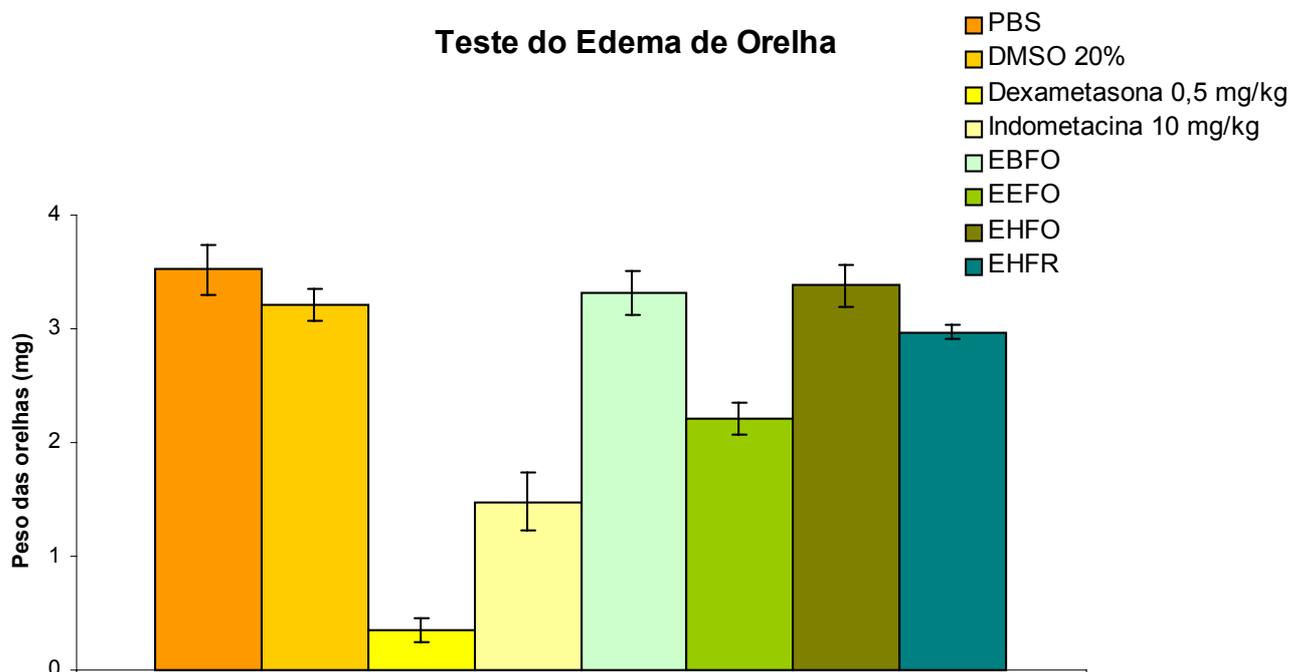


Gráfico 9: Efeitos dos extratos de *C. cerifera*, na dose de 100 mg/kg, sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *C. cerifera*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana (AAM) foram utilizadas as cepas de bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (suscetível à oxacilina e penicilina) e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e as Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 (beta-lactamase negativa) e o bacilo ácido-resistente *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294. Foram empregadas as metodologias de microdiluição em caldo e de Alamar Blue. Nessa última metodologia foi avaliada a atividade antimicrobiana sobre micobactérias. Foram avaliados os extratos hexânico e etanólico de folhas e frutos, todos eles na concentração de 100 µg/ml.

- **Microdiluição em Caldo:** Utilizou-se o caldo Mueller-Hinton inoculado com as cepas selecionadas para o teste. As soluções dos extratos testados foram adicionadas às placas contendo o meio de cultura já inoculado, obtendo-se uma concentração de 100 µg/ml. Os resultados dos testes foram avaliados após 24 horas de inoculação (Tabela 18; Gráfico 10, pág 114).

Tabela 18: Avaliação da inibição do crescimento microbiano das cepas incubadas com os extratos hexânico (EHFR) e etanólico (EEFR) de frutos e hexânico de folhas (EHFO) para o teste de microdiluição em caldo.

Microorganismo	% de Inibição			
	Controle	EHFR	EEFR	EHFO
<i>P. aeruginosa</i>	0%	47	61	26
<i>S. aureus</i>	0%	48	15	78
<i>E. faecalis</i>	0%	0	36	15
<i>E. coli</i>	0%	63	73	61

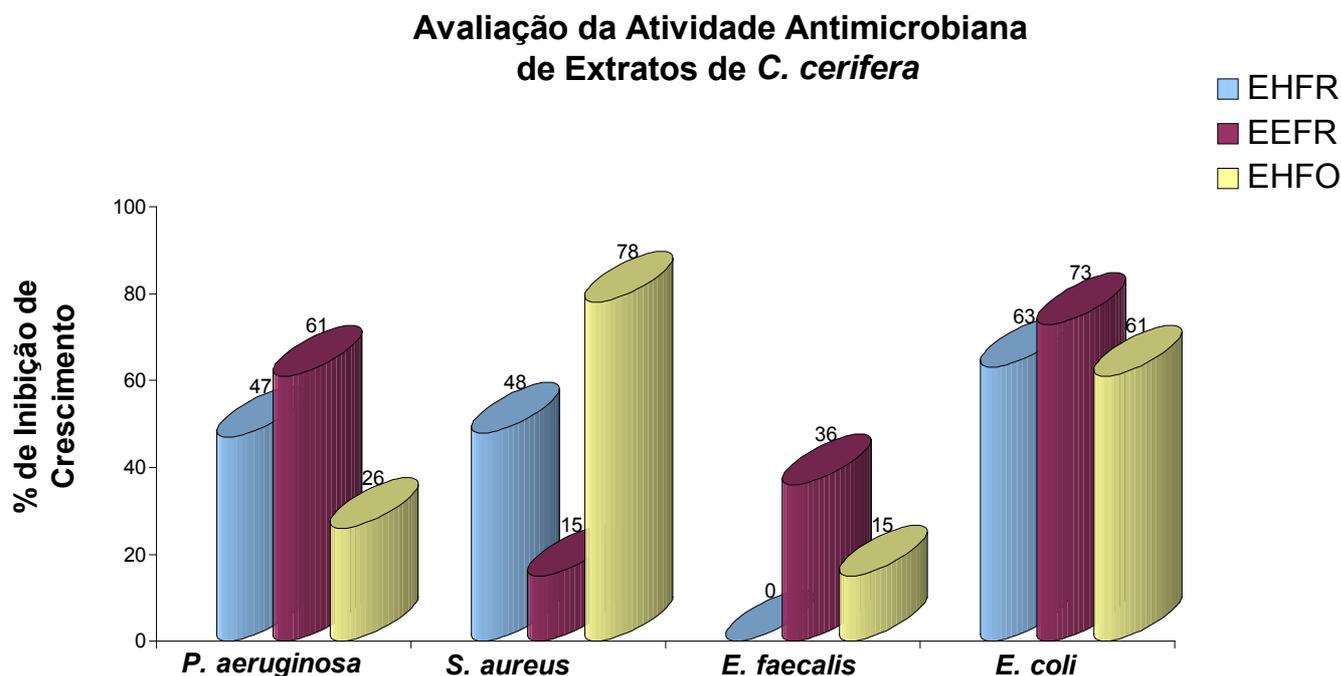


Gráfico 10: Avaliação da atividade antimicrobiana (AAM) dos extratos de *C. cerifera*. Percentuais de inibição de crescimento microbiano após incubação com os extratos hexânico (EHFR) e etanólico (EEFR) de frutos e hexânico de folhas (EHFO).

Pode-se observar através dos percentuais de inibição apresentados no gráfico anterior que os extratos testados de *C. cerifera* apresentam a capacidade de inibir o crescimento microbiano de maneira relevante, dependendo do tipo de microorganismo e do extrato a serem testados. Dentre todas as cepas testadas, a que apresentou menor percentual de inibição do crescimento frente aos extratos foi a cepa de *E. faecalis*. Neste caso, dos três extratos testados, o único que não apresentou nenhum percentual de inibição do crescimento microbiano foi o extrato hexânico dos frutos. Os extratos etanólico de frutos e hexânico de folhas apresentaram leve inibição do crescimento da cepa desta enterobactéria.

Ao contrário do que foi observado com a cepa de *E. faecalis*, a cepa de *E. coli* testada teve seu crescimento celular inibido de maneira significativa pelos três extratos testados. Dentre eles, o extrato etanólico dos frutos foi o que apresentou maior capacidade antimicrobiana.

Para a cepa e *P. aeruginosa* testada, o extrato etanólico dos frutos foi o que apresentou maior percentual de inibição, ao passo que o extrato hexânico de folhas apresentou o menor resultado. No que se refere à cepa de *S. aureus* testada, e ao contrário do que foi observado com a cepa de *P. aeruginosa*, o extrato etanólico dos frutos apresentou o menor dos três resultados, ao passo que o extrato hexânico das folhas apresentou o maior percentual de inibição de crescimento microbiano. O percentual de inibição do extrato hexânico das folhas sobre o *S. aureus* foi o melhor resultado dentre todas as cepas e extratos testados.

- **Alamar Blue:** Os extratos testados foram diluídos em DMSO e depois em 0,1 ml de 7H9 nas microplacas, obtendo-se uma concentração de 100µg/ml. Para este teste, empregou-se a solução de Alamar Blue nas placas e observou-se mudança de coloração do azul para o rosa. A MIC seria definida como a menor concentração do extrato capaz de evitar mudança na coloração. Como resultado deste teste, a cepa de *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 foi resistente a todos os extratos testados. Para uma melhor avaliação desses resultados, seriam necessários outros testes utilizando esta mesma metodologia onde fossem testadas frações de diferentes polaridades (frações mais purificadas) daquelas testadas para confirmar a resistência desse microorganismo aos extratos em estudo. Uma vez que alguma fração mais purificada venha a apresentar efeito inibitório sobre o crescimento desta micobactéria, poderemos sugerir que há interação entre diferentes componentes dos

extratos brutos que não permitem que este mesmo extrato possa exercer atividade sobre as células microbianas testadas. Uma vez que o *M. tuberculosis* apresentasse resistência às frações mais purificadas, poderíamos então sugerir a não atividade destes extratos sobre o crescimento microbiano da cepa testada.

CONCLUSÕES

Sobre os resultados obtidos com o estudo fitoquímico dos extratos das folhas e farmacológico com os extratos das folhas e frutos de *C. cerifera* pode-se concluir que:

1. O estudo fitoquímico das folhas de carnaúba, a saber os extratos hexânico bruto e a fração em acetato de etila do extrato etanólico total, apresentaram uma série de ácidos graxos de cadeia longa. A série encontrada tem início no ácido hexadecanóico, também conhecido como ácido palmítico (C₁₆) e por fim no ácido tetracosanóico (C₂₄). Essas substâncias foram identificadas na forma de seus ésteres metílicos. Foi possível também a identificação de um sesquiterpeno, um diterpeno, derivados do ácido benzóico e derivados arilpropanoídicos. Isso evidencia um equilíbrio entre derivados da via do ácido acético e da via do ácido chiquímico.
2. Foi identificada também uma série de hidrocarbonetos de cadeia longa, iniciada pelo tricosano, um hidrocarboneto linear de cadeia longa de 23 carbonos, e por fim um hidrocarboneto de 31 carbonos, o untriacontano.
3. A presença de substâncias com efeitos antibacterianos também foi encontrada nos extratos estudados, como por exemplo, o ácido nonanedióico, também conhecido como ácido azeláico, que atualmente é bastante utilizado em formulações manipuladas para o tratamento da acne.
4. Quanto à atividade antioxidante pelo teste químico, o extrato etanólico das folhas foi o que apresentou melhor atividade dentre todos os extratos testados, sendo superior aquele encontrado para o *Gingko biloba*, porém

- inferior aquele encontrado para o padrão rotina, uma substância pura com reconhecida atividade antioxidante.
5. Em relação à avaliação da atividade antioxidante pelo teste *in vivo*, onde foi utilizada uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, foi observado que, em geral, o extrato hexânico das folhas foi o mais ativo dos extratos testados. O extrato de *G. biloba* não mostrou proteção nesse teste.
 6. Sobre a atividade analgésica apresentada pelos extratos de *C. cerifera*, os extratos etanólico das folhas e hexânico dos frutos apresentaram resultados superiores aos demais extratos, tanto para o teste da placa quente, quanto para o teste de retirada da cauda. Neste último teste, o extrato etanólico de folhas apresentou resultado superior ao extrato hexânico dos frutos.
 7. No teste das contorções abdominais, todos os dois extratos testados apresentaram resultados compatíveis com aqueles observados para a indometacina. No entanto, o extrato etanólico das folhas apresentou um resultado discretamente superior aquele encontrado pela substância padrão.
 8. Nos testes de atividade analgésica e antiinflamatória, novamente o extrato etanólico das folhas apresentou o melhor resultado dentre todos os extratos testados, tanto no teste da formalina (nas fases I e II) quanto no teste do edema de orelha.
 9. Na avaliação da atividade antimicrobiana, onde se avaliou o percentual de inibição do crescimento de cepas bacterianas, os diferentes extratos apresentaram diferentes resultados em função da cepa testada. Para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (beta-lactamase negativa) o extrato etanólico dos frutos apresentou o melhor percentual de inibição de

crescimento. Neste último microorganismo, os demais extratos testados (hexânico de frutos e folhas) também apresentaram bons resultados. Para o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (suscetível à oxacilina e penicilina) o extrato hexânico das folhas apresentou perfil de inibição de crescimento superior aos demais extratos.

10. Na avaliação da atividade antimicrobiana em cepa de *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294, nenhum dos extratos testados apresentou resultado significativo.
11. Por fim, conclui-se, a partir de todos os resultados obtidos, que os extratos de *C. cerifera* e suas frações merecem atenção especial, sobretudo sob o ponto de vista farmacológico, no sentido de tentar identificar quais as possíveis substâncias que poderiam estar agindo farmacologicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-AMSHA, R. *et al.* Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects. *Free Radic Biol Med*, **30**, 636-642. 2001.

AOKI, K. *et al.* Modification of apoptosis-inducing activity of gallic acid by saliva. *Anticancer Res.*, **21**, 1879-1883. 2001.

ARCE, L.; RIOS, A. & VOLCARCEL, M. Determination of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Beefsteak, Mest Extract, and Fish by Cappillary Zone. *J. Chromatogr.*, **827**, 113-120. 1998.

BEM-BASSAT, J., PERETZ, E., SULMAN, F. G. Analgesimetry and ranking of analgesic drug by the receptacle method. *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **122**, 434-447. 1959.

CAMPBELL, W. B. & HALUSHKA, P. V. Autacóides derivados de lipídios *In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Gilman, A. G. Mc Graw-Hill Interamericana Editores. Rio de Janeiro, Brasil. p. 438.1996.

CHAMBERS, H. F. & SANDE, M. A. Fármacos Antimicrobianos. *In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Gilman, A. G. Mc Graw-Hill Interamericana Editores. Rio de Janeiro, Brasil, p. 757 e 758. 1996.

COLLINS, L. A. & FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **46** (5), 1004-1009. 1997.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. *Robbins. Patologia Estrutural e Funcional*. Ed. Guanabara Koogan S.A. 6ª Edição, p. 921e 922. 2000

CRUZ, M. A. *et al.* A Identification and partial characterization of a chitinase and a β -1,3-glucanase from *Copernicia cerifera* wax. *Plant Phys. Bioch.* **40**(1), 11-16. 2002.

DALLWITZ, M.J. A general system for coding taxonomic descriptions. *Taxon*, **29**, 41-45. 1980.

DE ALMEIDA CUNHA, B.C., DINI, M.E. Preparation and characterization of a carnauba wax derivative. *Revista Farm. Bioquímica Universidade de São Paulo.* **12** (2), 119-124. 1974.

DEBRUYNE, F. *et al.* Evaluation of the Clinical Benefit of Permixon and Tamsulosin in Severe BPH Patients – Permal Study Subset Analysis. *European Urology* (Article in Press). 2004.

GUIDON, N. & LESSA, A. Osteobiographic Analyses of Skeleton I, Sítio dos Caqueiros, Serra da Capivara National Park, Brazil 11,060 BP: First Results *American Journal of Physical Anthropology* 118, 99-110, 2002.

HEIM DE BALSAC, F., HEIM DE BALSAC, H. & MAHEU, J. Oil-beating palms of Guiana. *Bull. Agence Gén. Colonies*, **24**, 260-274. 1931.

HO, C. T. *et al.* Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev. Med.*, **21**, 520-525. 1992.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; SAKAGUCHI, N.; LI, Z; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y.; JIANG, B.Y. & CHEN, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull*, **18**, 1526-1530. 1995.

INSEL, P. A. Fármacos Analgésico-antipirético e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. *In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Gilman, A. G. Mc Graw-Hill Interamericana Editores. Rio de Janeiro, Brasil. p. 451.1996.

JONES, D.L. *Palms Throughout the World*. Smithsonian Institute Press, Washington, D.C. 1995.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. 6ª Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1998.

KERRY, N. L. & ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidative in vitro. *Atherosclerosis*, **135**, 93-102. 1997.

KOGA, T. *et al.* Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food. Chem.*, **47**, 1892-1897. 1999.

KURAISHI, Y., HARADA, Y., ARATANI, I. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algescic tests. *Brain Research*, **273**, 245-252. 1983.

LACERDA, M. E. G. Extratos vegetais: qualidade e monitoramento. *Tese de Doutorado*, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1999.

LANDRAULT, N. *et al.* antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food. Chem.*, **49**, 3341-3348. 2001.

LEVIN, R. M. & DAS, A. K.. A scientific basis for the therapeutic effects of *Pygeum africanum* and *Serenoa repens*. *Urological Research*, **28**(3), 201-209.2000.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 3ª Edição, Volume I, Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 2000.

LUBER, P. *et al.* Comparison of broth microdilution, E test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of clinical Microbiology*, **41** (3), 1062-1068. 2003.

LUBRANO, C., ROBIN, J.R. & KHAIAT, A. Fatty-acid, sterol and tocopherol composition of oil from the fruit mesocarp of 6 palm in French-Guiana. *Oleagineux*, **49** (2), 59-65. 1994.

MAZLIAK, P. Etude des diols des cires de pomme et de carnaúba. *Phytochemistry*, **1**(2), 79-85. 1962.

MAZLIAK, P. Etude des hydroxyacides des cires de pomme et de carnaúba. *Phytochemistry*, **2**(3), 253-61. 1963.

MENSOR *et al.* Screenig of Brazilian Plant Extracts for antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Res.* **14**, 1-4. 2000.

PARENT, R. A. *et al.* Reproduction and subchronic feeding study of carnauba wax in rats. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **21**(1), 89-93. 1983a.

PARENT, R. A. *et al.* Subchronic feeding study of carnauba wax in beagle dogs. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **21**(1), 85-87. 1983b.

PIO CORREA, M. *Dicionário das Plantas Úteis no Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1931, p. 51-54.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S. & SLAWIŃSKA, D. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. *Current Topics in Biophysics*, **26** (2), 217-227. 2002.

PRANCE, G.T., BALÉE, W., BOOM, B.M. & CARREIRO, R.L. Quantitative ethnobotany and the case of conservation in Amazônia. *In: Ethnobotany: Evolution of a Discipline* Edited by Richard Evans Schultz e Siri von Reis. *Dioscorides Press*, Theodore R. Dudley, PhD., General Editor, Portland, Oregon, USA. 1995.

RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3ª Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 178-192; 485-487; 543-544. 1997..

REISINE, T. & PASTERNAK, G. Analgésicos e antagonistas opióides. *In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Gilman, A. G. *Mc Graw-Hill Interamericana Editores*. Rio de Janeiro, Brasil. p. 379.1996.

ROWLAND, I. R. *et al.* Short-term toxicity study of carnauba wax in rats. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **20**(4), 467-471. 1982.

SAKAGAMI, H.; SATOH, K.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. & OKUDA, T. Possible role of radical intensity and oxidation potential for gallic acid-induced apoptosis. *Anticancer Res.*, **17**, 377-380. 1997.

SCHIANTERELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D. AND PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzneim.-Forsch. Drug. Res.* 32: 230- 235, 1982.

SCHMIDT, K.N.; TRAENCKNER, E.B.; MEIER, B. & BAEUERLE, P. A. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem*, **270**, 27136-27142. 1995.

SILVA, S. *Frutas no Brasil*. 4ª edição, Empresa das Artes, Nobel, São Paulo. 2001.

STEWART, L. *A Guide to Palms and Cycads of the World*. Angus & Robertson, Sydney, Austrália. 1994.

TERASAKA, H. *et al.* Induction of apoptosis by dopamine in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.*, **20**, 243-250. 2000.

WAGNER, H. & BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second Edition. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 1996.

WATSON, L. & DALLWITZ, M. J.. The families of Angiosperms: Automated description, with interactive identification and information retrieval. *Aust. Syst. Bot.*, **4**, 681-695. 1994.

WHITTLE, B. A. The use of change in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Br. J. Pharmacol.*, 22, 246-253. 1964.

ZOFEMLER, W.B. *Guide to flowering plant families*. The University of North Carolina Press. Chapel Hill and London. 1994.

Documentos Iconográficos

<http://www.deltadorioparnaiba.com.br/39.htm>, acesso em 10/05/2004.

<http://www.pi.gov.br/piaui.php?id=1>, acesso em 08/05/2003.

<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/divpol/nordeste/pi/apresent/index.htm>, acesso em 10/05/2004.

<http://www.guianet.com.br/.../www.guianet.com.br%2Fpi%2F>, acesso em 05/04/2004

http://www.piemtur.pi.gov.br/localiza_the.html, acesso em 09/05/2003.

<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamataraty/web/port/divpol//nordeste/pi/apresent/index.htm>, acesso em 09/05/2004.

http://www.piauihp.com.br/capitania_do_piaui.htm, acesso em 09/05/2004.

<http://www.piauihp.com.br/piaui/teresina/rio.jpg>, acesso em 10/04/2004.

<http://www.piemtur.pi.gov.br/cidades/teresina.html#>, acesso em 10/05/2004.

<http://www.piauihp.com.br/piaui/teresina/predios1.jpg>, acesso em 10/05/2004.

www.shinybike.com/wpe1.jpg, acesso em 24/09/2003.

http://www.floridata.com/ref/c/cope_pru.cfm, acesso em 24/09/2003.

<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/carnauba.html>, acesso em
acesso em 14/10/2003.

<http://www.terrabrasileira.net/folclore/regioes/2artes/nd-piaui.html>, acesso em
10/05/2004.

<http://www.terradosolbrasil.com.br/p5.html>, acesso em 10/05/2004.

http://www5.prossiga.br/arranjos/vortais/carnauba_pi_panorama.html, acesso
em 10/05/2004.

<http://www.steviacomercial.com.br/carnauba.htm>, acesso em 14/10/2003.

http://www.pvp.com.br/pvpport/carnauba_wax.htm, acesso em 24/09/2003.

http://www.sertao.org.br/programas_semiarido.htm, acesso em 10/5/2004.