

**Danielle de Almeida Barbosa**

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE**  
***Genipa americana* L. (RUBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadoras: Prof<sup>a</sup> Nancy dos Santos Barbi  
Prof<sup>a</sup> Suzana Guimarães Leitão

**Rio de Janeiro**  
**2008**

*FICHA CATALOGRÁFICA*

B238a Barbosa, Danielle de Almeida.  
Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L.  
(Rubiaceae) / Danielle de Almeida Barbosa; orientadoras Nancy dos  
Santos Barbi e Suzana Guimarães Leitão. -- Rio de Janeiro : UFRJ,  
Faculdade de Farmácia, 2008.  
xxiii, 115f.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ, Fa-  
culdade de Farmácia, 2008.

Referências Bibliográficas: f. 106-115.

1. *Genipa americana* L. 2. Rubiaceae. 3. Fitoquímica. 4. Avali-  
ação farmacológica. I. Barbi, Nancy dos Santos. II. Leitão, Suzana  
Guimarães. III. Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa  
americana* L. (Rubiaceae).

CDD 615.321

**Danielle de Almeida Barbosa**

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE *Genipa americana* L. (RUBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2008.

**Orientadores**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nancy dos Santos Barbi - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzana Guimarães Leitão - UFRJ

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Freiman de Souza Ramos - UFRJ

---

Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luisa Palhares de Miranda - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eline Matheus - UFRJ

**D**edico este trabalho aos meus pais, **João Bosco** e **Shirley** e a minha irmã **Caroline** que sempre acreditaram em mim.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde, pela família, pelos amigos e por ter a certeza que sempre esteve e estará comigo nos momentos alegres e principalmente nos mais difíceis.

À minha Mãe, pela grande mulher que sempre foi e pela grande amiga que é e que me ensina a cada dia a dar valor à vida e aproveitá-la como se cada dia fosse o último de minha vida, amando e respeitando todos a minha volta. Mãe, com você ao meu lado não desistirei nunca. Te amo!

Ao meu Pai, que sempre me mostrou que todo o tempo que gastamos em buscar conhecimento não é um desperdício, pois tudo que aprendemos é útil, tanto as coisas boas quanto as ruins. Pai, obrigada pelo apoio e por me mostrar que tudo pelo que passei só serviu para que eu caminhasse mais e mais.

À minha irmã, Caroline, que do jeito dela, às vezes com palavras fortes e marcantes, me fez levantar diante dos obstáculos e me mostrou que mais do que minha irmã, ela é a minha melhor amiga e que seu desejo é me ver feliz e vencedora. Te amarei sempre por toda a minha vida!

Ao meu cunhado, Daniel, que considero como o irmão que nunca tive. Que sempre teve uma palavra de carinho e incentivo em todos os momentos de minha vida. Obrigada meu irmão!

Aos meus avós falecidos, que quando ainda vivos sempre me acolheram com tanto amor e carinho em suas vidas e, principalmente ao meu avô paterno João que apesar de ser um homem de poucas palavras, nunca esquecerei quando me disse que quando Deus fecha uma porta abre uma janela. Continuem olhando por mim aonde quer que vocês estejam.

À minha avó Luzia, que mesmo que sejam raros os nossos encontros é sempre carinhosa e atenciosa.

À minha irmã de coração Fernanda, que durante os quase quinze anos de amizade sempre esteve ao meu lado, me oferecendo sua mão amiga para que eu superasse os obstáculos que surgiram a minha frente. Uma amizade que já mostrou suportar até uma separação por milhares de quilômetros. Te amo Nanda!

À Mariana e a Sabrina, minhas amigas e irmãs de coração, que me fazem acreditar que não importa a quantidade de amigos que temos, pois se forem verdadeiros já podemos nos considerar pessoas afortunadas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nancy dos Santos Barbi por me orientar nesta tese e por ter acreditado em mim. Agradeço também pela grande amiga que foi durante todo esse tempo e ter me apoiado nos momentos mais difíceis, me fazendo lembrar a todo instante de levantar a cabeça e seguir em frente.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzana Guimarães Leitão por ter aceitado ser minha co-orientadora e assim ter transmitido parte do seu conhecimento com carinho e atenção.

À Banca examinadora.

Às minhas colegas de mestrado Flávia e Gabriela que me deram apoio e ajudaram em meus experimentos e pelas maravilhosas viagens que fizemos juntas.

À minha colega de mestrado Érica, que se tornou mais do que uma amiga e sim, uma irmã e confidente. Obrigada pelo carinho e apoio neste tempo que passamos juntas.

Ao Emílio, esposo da Érica, por me ajudar com carinho e atenção na formatação.

À Angélica Castanheira por ter auxiliado no planejamento multivariado.

Ao Prof. Dr. Roy Edwards Bruns do Instituto de Química da UNICAMP por ter auxiliado na parte do planejamento multivariado e por sempre estar disposto a arranjar um minuto do seu tempo para tirar as dúvidas que apareciam ao longo do caminho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gisela Dellamora Ortiz e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por terem de forma direta ou indireta contribuído para que este trabalho fosse realizado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Freiman de Souza Ramos por ter contribuído com a revisão do trabalho e por durante os seminários no mestrado ajudar com algumas informações que enriqueceram esta tese.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luisa Palhares de Miranda e seu aluno Leandro Silva pela ajuda na elaboração dos gráficos de atividade antioxidante.

Ao Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva pela revisão detalhada e atenciosa dessa Tese.

Aos alunos do laboratório da Prof<sup>a</sup>. Suzana, Aline, Danilo, Fernanda e Lisiex que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho se realizasse.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Sampaio dos Santos por terem sido as primeiras a me mostrarem o maravilhoso mundo da pesquisa.

Ao Dr. Sebastião Neto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro pela identificação da espécie.

À Professora Sônia Nakamura, Cristina, Roberta e Sheyla que me receberam no LACMAC e me deram apoio e incentivo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Ribeiro Leite Moura e ao pessoal do seu laboratório e do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos por todo o auxílio que me deram durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza que além de ter sido um grande mestre, demonstrou ser um grande amigo e ouvinte durante o mestrado. Espero ter a honra de realizar mais trabalhos com você.

Ao Marcos, Alexandre, Ana, Aline, Carol, Juliana e a todos os demais alunos e funcionários do laboratório de microbiologia por estarem sempre prontos para me ajudar.

Ao Prof. Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva, do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, pela ajuda nos experimentos.

À Cristina, da Central Analítica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, pelas análises realizadas para que pudessem fazer parte deste trabalho.

À Marilene e ao Thiago, da Secretaria de Pós-Graduação do Programa em Ciências Farmacêuticas, por sempre se mostrarem disponíveis a resolver qualquer assunto e com o maior carinho.

À todos aqueles amigos e familiares que passaram na minha vida e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

BARBOSA, Danielle de Almeida. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

A espécie *Genipa americana* L. (Rubiaceae) é amplamente distribuída pelo Brasil, da Amazônia até São Paulo. Popularmente é conhecida por “jenipapo”, “janipapo”, “jenipapeiro” e “jenipá”, dentre outras denominações. O fruto, comestível, tem reputação de antiasmático, afrodisíaco, antianêmico, diurético e útil nas afecções do baço, fígado e icterícia. Os frutos maduros, secos e moídos, foram extraídos com metanol em banho ultrassônico, e o extrato obtido particionado em hexano, diclorometano e butanol. Na fração hexânica, foram identificados principalmente, ácidos graxos e fitoesteróides, como o ergosta-4,6,22-trieno, 4,4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno,  $\beta$ -sitosterol, tremulona, campesterol e estigmasterol, além do ácido cinâmico, descritos para a espécie *G. americana* pela primeira vez neste trabalho. Na fração em diclorometano foi identificada a 6,7-dimetóxi-cumarina, também descrita pela primeira vez para a espécie em estudo. Foi traçado um perfil comparativo para os extratos metanólicos dos frutos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom, onde foram avaliados para cada técnica: rendimento, potencial antioxidante, teor de fenóis totais e perfil cromatográfico quantitativo e qualitativo por CLAE a 240nm. A técnica por Soxhlet apresentou melhor rendimento: 51,12%, ou seja, 10,36% a mais do que por ultrassom e 8,49% a mais do que por maceração. Contudo, na extração por ultrassom tem-se a vantagem de se utilizar um tempo menor, temperaturas baixas e menor quantidade de solvente. A otimização para a extração dos frutos por ultrassom, empregando um planejamento composto central, mostrou que o melhor rendimento é obtido nas seguintes condições: 1g de extrato, 30ml de metanol e um tempo de extração de 50 minutos. Na avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, o extrato obtido por maceração mostrou ser menos potente do que aqueles obtidos por Soxhlet e por ultrassom, sendo que os últimos não apresentaram diferença significativa entre os valores de  $CE_{50}$ . Com relação ao conteúdo de compostos fenólicos, os valores encontrados para

maceração, Soxhlet e ultrassom foram 4,65; 4,89 e 4,90mg de ácido gálico/g de extrato, respectivamente, o que poderia, em parte, explicar uma atividade antioxidante baixa. Na avaliação do perfil cromatográfico por CCD e CLAE, foi possível verificar que, nas condições de análise, não houve diferença na composição química dos extratos metanólicos obtidos pelas três técnicas. Porém, quantitativamente, observou-se diferenças para determinadas substâncias, de acordo com a técnica utilizada. A análise da fração volátil dos frutos de jenipapo por CG/EM, mostrou predominância de ácidos graxos e de seus ésteres metílicos correspondentes. Os constituintes majoritários foram os ácidos octanóico e hexanóico, heptadienal, nonanol e o octanoato de metila. Na avaliação da atividade antimicrobiana, o óleo essencial do jenipapo exibiu uma potente atividade contra todos os microrganismos testados. O óleo apresentou um espectro de ação amplo, inclusive sobre amostras bacterianas reconhecidamente resistentes a antibióticos sintéticos, como é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, as concentrações utilizadas para o óleo de jenipapo foram menores do que a de outros óleos descritos na literatura e possuidores de atividade antimicrobiana. O óleo apresentou ainda uma atividade antioxidante de 66,83%, pelo método do DPPH.

## ABSTRACT

BARBOSA, Danielle de Almeida. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The *Genipa americana* L. species (Rubiaceae) is widely distributed in Brazil from Amazônia to São Paulo and is popularly known as "jenipapo", "janipapo", "jenipapeiro" and "jenipá" among other names. Its edible fruit has a reputation as antiasthmatic, aphrodisiac, antianemic, diuretic and useful in the spleen and liver affections and jaundice. The riped, dried and crushed fruits were extracted with methanol in ultrasonic bath and the extract obtained partitioned between hexane, methylene chloride and butanol. From the hexanic fraction mainly fatty acids and phytosteroids such as ergosta-4,6,22-triene, 4,4-dimethyl-cholesta-6,22,24-triene,  $\beta$ -sitosterol, tremulone, campesterol and stigmasterol were identified, in addition to cinnamic acid, described here for the first time for this species. In the methylene chloride fraction the 6,7-dimethoxy-coumarin was identified, also described for the first time for the species under study. It was mapped out a comparative profile for fruits methanol extracts obtained by maceration, Soxhlet and ultrasound, for which were evaluated: yield, antioxidant potential, content of total phenols and qualitative and quantitative HPLC chromatographic profiles at 240nm. The Soxhlet extraction technique gave a better yield: 51.12%, or 10.36% more than by ultrasound and 8.49% more than by maceration. However, the extraction by ultrasound has the advantage of using a shorter time, low temperatures and lesser amount of solvent. The optimization for the extraction of fruit by ultrasound, using a central composite design, showed the best yield under the following conditions: 1g of plant material, 30ml of methanol and a time for extraction of 50 minutes. In assessing the antioxidant activity by the method of DPPH, the extract obtained by maceration proved to be less potent than those obtained by Soxhlet and by ultrasound, and the last showed no significant difference between the values of observed  $EC_{50}$ . Regarding to the content of phenolic compounds, the values found for maceration, Soxhlet and ultrasound were 4.65, 4.89 and 4.90mg of gallic acid per gram of extract, respectively, which could, in part, explain a low antioxidant activity. In the

assessment the chromatographic profile by TLC and HPLC it was concluded that, in terms of analysis, there was no difference in the chemical composition of methanol extracts obtained by the three techniques. However, quantitatively, differences were observed for certain substances, according to the technique used. The analysis of the volatile fraction of the fruits of jenipap by GC/MS showed a predominance of fatty acids and their corresponding methyl esters. The major constituents were octanoic and hexanoic acids, heptadienal, nonanol and methyl octanoate. In the assessment of antimicrobial activity, the essential oil of jenipapo exhibited a potent activity against all microorganisms tested. The oil presented a broad spectrum of action, including samples of known bacterial resistance to synthetic antibiotics such as the *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant, *Enterococcus faecium* vancomycin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, the concentrations used in the jenipapo oil were lower than that of other oils described in the literature and possession of antimicrobial activity. The oil also showed an antioxidant activity of 66.83% by the method of DPPH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae (BOLZANI <i>et al.</i> , 2001).....	3
Figura 2 - <i>Genipa americana</i> L. (Disponível em <a href="http://www.achetudoeregiao.com.br/.../jenipapo.jpg">http://www.achetudoeregiao.com.br/.../jenipapo.jpg</a> . Acesso em: 15 de abril 2007). ..	7
Figura 3 - Flor do jenipapeiro (Disponível em <a href="http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/15b.jpg">http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/15b.jpg</a> . Acesso em: 15 de abril 2007). .....	8
Figura 4 - Jenipapo (Disponível em <a href="http://www.geocities.com/.../Imagens/Jenipapo2.jpg">http://www.geocities.com/.../Imagens/Jenipapo2.jpg</a> . Acesso em: 15 de abril 2007). .....	9
Figura 5 - Iridóides de <i>G. americana</i> L. ....	13
Figura 6 - Monoterpenóides de <i>G. americana</i> L. ....	14
Figura 7 - Aparelho de ultrassom. ....	16
Figura 8 - Representação esquemática da cavitação acústica: ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante o tempo de sonicação (KORN <i>et al.</i> , 2005).....	17
Figura 9 - Estrutura celular vegetal (VINATORU, 2001).....	18
Figura 10 - Fluxograma da preparação do extrato metanólico e as respectivas partições em hexano, diclorometano e 1-butanol dos frutos maduros de <i>Genipa americana</i> .....	31
Figura 11 - Fracionamento da fração hexânica proveniente do extrato metanólico dos frutos maduros de <i>Genipa americana</i> . ....	33
Figura 12 - Óleo essencial de jenipapo. ....	38
Figura 13 - Círculo amarelo (100µl de emulsão do óleo), círculo vermelho (controle da esterilidade da emulsão), círculo azul (controle da esterilidade do caldo BHI), círculo verde (controle do crescimento do inoculo em caldo BHI).....	42
Figura 14 - Influência do tempo de extração na eficiência da extração dos frutos secos de <i>G. americana</i> . Amostra: 10g; volume de solvente: 40ml, com apenas um ciclo em cada tempo. ....	48
Figura 15 - Influência do volume de solvente na eficiência da extração dos frutos secos de <i>Genipa americana</i> . Amostra: 10g; tempo de extração: 25 minutos. ....	48
Figura 16 - Influência do número de ciclos na eficiência da extração dos frutos secos de <i>Genipa americana</i> . Amostra: 10g; volume de solvente: 100ml em cada ciclo de 25 minutos.....	49

Figura 17 - Modelo gráfico de superfície de resposta para o modelo quadrático ( $X_1$ = massa e $X_2$ = número de ciclos de extração).....	53
Figura 18 - Representação gráfica comparando os rendimentos nos três tipos de extração.....	55
Figura 19 - Esquema do seqüestro do radical estável DPPH <sup>*</sup> por um antioxidante (RH) (YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 1998).....	56
Figura 20 - Gráfico da relação entre atividade antioxidante (AA%) e ln da concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) para cada um dos extratos metanólicos e para o padrão <i>Ginkgo biloba</i> . ....	57
Figura 21 - Comparação entre os valores de $CE_{50}$ para os extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos. ** $p < 0,01$ para Soxhlet e ultrassom quando comparados à maceração. Teste $t$ de Student. ....	58
Figura 22 - Avaliação qualitativa da atividade antioxidante dos extratos metanólicos obtidos por maceração (M), Soxhlet (S) e ultrassom (U), usando rutina (R) como padrão. (a) Cromatoplaça revelada com anisaldeído sulfúrico, (b) Cromatoplaça revelada com DPPH 0,3mM. ....	59
Figura 23 - Curva padrão do ácido gálico. ....	60
Figura 24 - Avaliação qualitativa da possível presença de componentes fenólicos nos extratos metanólicos obtidos por maceração (M), Soxhlet (S) e ultrassom (U), usando rutina (R) como padrão. (a) Cromatoplaça revelada com anisaldeído sulfúrico, (b) Cromatoplaça revelada com Folin-Ciocalteu 10%. ....	62
Figura 25 - Avaliação qualitativa por CCD revelada com anisaldeído sulfúrico dos extratos metanólicos obtidos por maceração (M), Soxhlet (S) e ultrassom (U).....	63
Figura 26 - Cromatograma do padrão genipina que foi submetido à CLAE. Condições: acetonitrila:água acidificada (TFA, pH3,0; 15:85) como fase móvel e detecção por absorção no UV (240nm) em coluna de fase inversa (C18). ....	65
Figura 27 - Espectro no UV do padrão genipina ( $t_r = 8,32$ min., 240nm). ....	65
Figura 28 - Espectro no UV do geniposídeo (Wang <i>et al.</i> , 2004) ....	66
Figura 29 - Cromatogramas dos extratos obtidos por maceração (a), Soxhlet (b) e ultrassom (c) que foram submetidos à CLAE. Condições: acetonitrila:água acidificada (TFA, pH3,0; 15:85) como fase móvel e detecção por absorção no UV (240nm) em coluna de fase inversa (C18). ....	68
Figura 30 - Espectro no UV das substâncias eluídas em 1,95, 2,40 e 4,27 min. do extrato metanólico dos frutos de <i>G. americana</i> , obtido por maceração. ....	69
Figura 31- Espectro no UV das substâncias eluídas em 4,85 e 4,69min. dos extratos metanólicos dos frutos de <i>G. americana</i> , obtidos por maceração e Soxhlet. ....	70

Figura 32 - Espectro no UV da substância eluída em 3,31min. do extrato metanólico dos frutos de <i>G. americana</i> , obtido por maceração.....	71
Figura 33 - Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos dos frutos verdes com casca (a) e sem casca (b) submetidos à CLAE. Condições: acetonitrila:água acidificada (TFA, pH3,0; 15:85) como fase móvel e detecção por absorção no UV (240nm) em coluna de fase inversa (C18). ....	71
Figura 34 - Espectro no UV das substância eluídas em 8,61 e 8,59min. do extrato aquoso dos frutos verdes de <i>G. americana</i> .....	72
Figura 35 - Espectro no UV das substância eluídas em 2,59, 3,23, 4,93 e 5,01 do extrato aquoso dos frutos verdes de <i>G. americana</i> .....	73
Figura 36 - Cromatograma da fração FHJ2-5.....	75
Figura 37 - Espectro de massas e estrutura química do 4,4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno. ....	77
Figura 38 - Espectro de massas e estrutura química da tremulona. ....	77
Figura 39 - Cromatograma da fração FHJ18-20.....	78
Figura 40 - Cromatograma da fração FHJ21-22.....	80
Figura 41 - Espectro de massas e estrutura química do campesterol.....	81
Figura 42 - Espectro de massas e estrutura química do estigmasterol.....	82
Figura 43 - Espectro de massas e estrutura química do $\beta$ -sitosterol.....	82
Figura 44 - Cromatograma da fração FHJ41-43.....	83
Figura 45 - Espectro de massas e estrutura química do ácido cinâmico. ....	83
Figura 46 - Cromatograma da fração FDJ.....	84
Figura 47 - Espectro de massas e estrutura química da 6,7-dimetóxi-cumarina. (a) Espectro de massas da amostra injetada e (b) Espectro de massas da 6,7-dimetóxi-cumarina fornecido pela biblioteca de espectros.....	85
Figura 48 - Aparelhos do tipo Clevenger modificados.....	88
Figura 49 - Cromatograma obtido por CG/EM da fração volátil dos frutos de jenipapo coletado em fevereiro de 2006 e conservado sob refrigeração.....	89
Figura 50 - Cromatograma obtido por CG/EM da fração volátil dos frutos de jenipapo coletado em fevereiro de 2007.....	91
Figura 51 - Cromatograma obtido por CG/EM da fração volátil dos frutos de jenipapo coletado em fevereiro de 2008.....	93

Figura 52 - Placas mostrando halo de inibição formado para *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* MSSA. ....99

Figura 53 - Porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial de *G. americana* e do padrão BHT na concentração de 1mg/ml usando duas concentrações diferentes para o radical DPPH (0,1mM e 0,3mM). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=3). \* $p < 0,05$ . Teste *t* de Student. .... 102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do planejamento composto central com os respectivos níveis das variáveis. ....	30
Tabela 2 - Uso popular de partes da planta <i>G. americana</i> . ....	45
Tabela 3 - Matriz do planejamento do processo univariado no processo de otimização da extração dos frutos de <i>G. americana</i> por ultrassom. ....	47
Tabela 4 - Resultados experimentais para rendimentos (%) para as combinações dos níveis dos fatores do planejamento composto central. ....	51
Tabela 5 - Resultados ANOVA para o modelo quadrático para o rendimento como uma função dos níveis dos fatores codificados da massa, volume e tempo. ....	52
Tabela 6 - Condições e rendimentos (%) da extração dos frutos de <i>G. americana</i> em metanol, por maceração, Soxhlet e ultrassom. ....	54
Tabela 7 - Valores de atividade antioxidante (AA%) e CE <sub>50</sub> (µg/ml) para os extratos metanólicos e para o padrão <i>Ginkgo biloba</i> testados com DPPH*. ....	57
Tabela 8 - Conteúdo de compostos fenólicos presentes nos extratos metanólicos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom. ....	60
Tabela 9 - Substâncias identificadas na fração FHJ2-5 com seus tempos de retenção e concentração. ....	76
Tabela 10 - Substâncias identificadas na fração FHJ18-20 com seus tempos de retenção e concentração. ....	79
Tabela 11 - Substâncias identificadas na fração FHJ21-22 com seus tempos de retenção e concentração. ....	81
Tabela 12 - Composição da fração volátil do jenipapo coletado em fevereiro de 2006. ....	90
Tabela 13 - Composição da fração volátil do jenipapo coletado em fevereiro de 2007. ....	92
Tabela 14 - Composição da fração volátil do jenipapo coletado em fevereiro de 2008. ....	94
Tabela 15 - Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo pelo método da difusão em ágar. ....	98
Tabela 16 - Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo pelo método de microdiluição em caldo, expressa como concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB). ....	100

Tabela 17 - Atividade antioxidante (%) do óleo essencial de <i>G. americana</i> e do padrão BHT <sup>a</sup> .....	101
--	-----

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>et al.</i>	e colaboradores
Rich.	Richard
DMT	N,N-dimetiltriptamina
5-HT <sub>2A</sub>	serotonina
β	beta
MAO-A	monoaminoxidase tipo A
FLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
m	metro
cm	centímetro
mm	milímetro
KHz	quilohertz
$\cdot\text{OH}$	radical hidroxila
$\text{O}_2\cdot^-$	ânion radical superóxido
$\text{ROO}\cdot$	hidroperoxila
BHT	butil-hidróxi-tolueno
BHA	butil-hidróxi-anisol
P.A.	para análise
°C	graus Celsius
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
nm	nanometro
ml	mililitro
W	Watts
D.A.D.	detetor de feixe de diodos
μl	microlitro
μm	micrometro
CG/EM	cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
IE	impacto de elétrons
eV	elétron Volts

<i>m/z</i>	relação massa/carga
min.	minuto
N	normal
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
mg	miligrama
CE <sub>50</sub>	concentração necessária para se obter metade do efeito máximo estimado em 100%
<i>p</i>	nível de significância
kg	quilograma
g	grama
%	porcentagem
dp	desvio padrão
FHJ	fração hexânica do jenipapo
Hex.	hexano
AcOEt	acetato de etila
MeOH	metanol
CC	cromatografia em coluna
CHCl <sub>3</sub>	clorofórmio
FDJ	fração diclorometano do jenipapo
µg	micrograma
mM	milimolar
AA%	percentual de atividade antioxidante
ABS	absorvância
UV	ultravioleta
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de sódio
TFA	ácido trifluoroacético
pH	potencial de hidrogênio
NIST	National Institute of Standards and Technology
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
BHI	Brain Heart Infusion Broth
ATCC	American Type Culture Collection
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistente à vancomicina

ESBL <sup>+</sup>	betalactamase de espectro estendido
h	hora
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
CMI	concentração mínima inibitória
CMB	concentração mínima bactericida
subCMI	subconcentração mínima inibitória
R <sup>•</sup>	espécie radicalar
ln	logaritmo neperiano
log	logaritmo
R <sub>f</sub>	fator de retenção
CG-O	cromatografia em fase gasosa-olfatometria
AEDA	aroma extract dilution analysis
ppb	partes por bilhão
γ	gama
α	alfa

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	A família Rubiaceae .....	2
1.2	O gênero <i>Genipa</i> .....	6
1.3	A espécie <i>Genipa americana</i> Linnaeus.....	6
1.3.1	Botânica e Sistemática (CORRÊA, 1969; LORENZI, 2000; MORS <i>et al.</i> , 2000; DELPRETE <i>et al.</i> , 2005). .....	6
1.3.2	Importância econômica .....	9
1.3.3	Importância ecológica .....	10
1.3.4	Estudos químicos e farmacológicos na espécie <i>Genipa americana</i> ....	11
1.4	Extração por ultrassom .....	15
1.5	Compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	19
1.6	Óleos essenciais .....	21
2	OBJETIVOS .....	24
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	25
3.1	Materiais e métodos.....	25
3.1.1	Equipamentos, reagentes e soluções .....	25
3.2	Abordagem etnofarmacológica da planta.....	27
3.3	Obtenção e identificação do material botânico .....	27
3.4	Extração dos frutos de <i>G. americana</i> .....	28
3.4.1	Planejamento univariado na otimização da extração dos frutos por ultrassom.....	28
3.4.2	Planejamento multivariado (planejamento composto central) na otimização da extração dos frutos por ultrassom .....	29
3.4.3	Análise da superfície de resposta .....	30
3.5	Obtenção e fracionamento do extrato metanólico dos frutos .....	30
3.5.1	Análise da fração hexânica .....	32
3.5.2	Análise da fração em diclorometano .....	33
3.6	Extração por maceração, Soxhlet e por ultrassom.....	34
3.6.1	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Genipa americana</i> obtidos por técnicas de extração diferentes .....	34
3.6.2	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos.....	36
3.6.3	Perfil cromatográfico por CCD e CLAE dos extratos metanólicos obtidos por técnicas de extração diferentes .....	37
3.7	Óleo essencial do fruto de <i>Genipa americana</i> .....	38
3.7.1	Obtenção e análise química da fração volátil do jenipapo .....	38
3.7.2	Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo .....	38
3.7.3	Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de jenipapo.....	43

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4.1	Abordagem etnofarmacológica da planta.....	45
4.2	Planejamento e otimização para extração dos frutos de <i>G. americana</i> .....	46
4.3	Planejamento composto central e análise da superfície de resposta.....	50
4.4	Comparação da técnica de extração por ultrassom com técnicas convencionais .....	53
4.4.1	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Genipa americana</i> obtidos por técnicas de extração diferentes .....	55
4.4.2	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos.....	59
4.4.3	Perfil cromatográfico por CCD e CLAE dos extratos metanólicos obtidos por técnicas de extração diferentes .....	62
4.5	Obtenção do extrato metanólico e rendimento da extração a partir dos frutos de <i>Genipa americana</i> .....	73
4.6	Fracionamento do extrato metanólico dos frutos de <i>Genipa americana</i> .....	74
4.6.1	Identificação de substâncias na fração hexânica.....	74
4.6.2	Identificação de substâncias na fração diclorometano.....	84
4.7	Óleo essencial do fruto de <i>Genipa americana</i> .....	86
4.7.1	Avaliação química das frações voláteis .....	86
4.7.2	Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo.....	98
5	CONCLUSÕES .....	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	106

# 1 INTRODUÇÃO

As três últimas décadas foram marcadas por grandes avanços na ciência e tecnologia que permitiram um melhor conhecimento sobre as propriedades dos alimentos. Em paralelo, verificou-se que o aumento da expectativa de vida, aliado às crescentes informações veiculadas sobre saúde, despertaram no consumidor a busca por alimentos mais saudáveis no intuito de prevenir e tratar as doenças. A partir daí o alimento passou a ter conotação de promotor da saúde, com redução dos riscos de doenças (MORAES & COLLA, 2006). São os chamados alimentos funcionais, que devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas.

Paralelamente à importância nutricional dos alimentos de origem vegetal, busca-se também uma potencial ação farmacológica, que possa ser conferida por seus metabólitos especiais.

O número de trabalhos voltados para o estudo fitoquímico e farmacológico de espécies vegetais, que fazem parte da cultura alimentar em várias partes do mundo, aumenta constantemente. Caules, flores, folhas, raízes, tubérculos, sementes e frutos são alvo de cientistas, que trabalham de forma interdisciplinar para ampliar o conhecimento e a qualidade de vida do homem moderno. A observação dos padrões alimentares das diferentes culturas espalhadas pelo mundo e a baixa incidência de doenças em determinadas populações vem sendo objeto de algumas pesquisas. O consumo de óleo de oliva, frutas frescas e vegetais na dieta Mediterrânea, por exemplo, tem sido associado à baixa incidência de doenças cardiovasculares e câncer, principalmente devido à elevada proporção de componentes bioativos como

vitaminas, ácidos graxos monoinsaturados, flavonóides e polifenóis (ORTEGA, 2006).

A importância do consumo de frutas e vegetais tem sido enfatizada em vários estudos epidemiológicos para a prevenção de doenças crônicas, tais como câncer e doenças cardiovasculares. Estes benefícios têm sido relacionados a uma variedade de constituintes presentes nestes alimentos, como compostos fenólicos e fibras alimentares. Muitas das frutas pesquisadas são comuns no Brasil, como é o caso da maçã, que possui elevada concentração de compostos fenólicos possuidores de atividade antioxidante (LEONTOWICZ *et al.*, 2002). Estudos demonstram que o suco de uva apresenta os mesmos efeitos benéficos do vinho tinto, favorecendo acesso às pessoas que não podem consumir bebida alcoólica (SPIER *et al.*, 2007).

Dentro desse contexto se situa a espécie *Genipa americana* Linnaeus, planta nativa da América do Sul e bastante comum em grande parte do Brasil, distribuindo-se da Amazônia até São Paulo, pertencente à família Rubiaceae e objeto deste trabalho.

## 1.1 A família Rubiaceae

Rubiaceae é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas, compreendendo o quarto lugar de todo o reino vegetal em número de espécies (cerca de 10.700) abrigadas em aproximadamente 637 gêneros (GERMANO FILHO, 1999). Esta família encontra-se distribuída por todo o mundo, sendo que a maior parte é própria das regiões mais quentes, principalmente dos trópicos. A América do Sul supera em número de espécies todas as demais regiões do planeta, englobando 30% do total, muitas endêmicas do Brasil. As Rubiáceas brasileiras, compreendidas em cerca de 110 gêneros e 1700 espécies, são amplamente distribuídas nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Floresta Atlântica e Cerrado,

predominando sob a forma de árvores e semi-arbustos (BOLZANI *et al.*, 2001; CHIQUIERI *et al.*, 2004).

De acordo com a classificação botânica realizada por Robbrecht em 1988, a família Rubiaceae encontra-se atualmente dividida em quatro subfamílias: Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Rubioideae. Cada uma destas subfamílias apresenta um perfil típico para iridóides (Ixoroideae), alcalóides indólicos (Cinchonoideae) e antraquinonas (Rubioideae), que são considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae (Figura 1) (BOLZANI *et al.*, 2001). Em um estudo para avaliação do perfil quimiotaxonômico da família, verificou-se a presença de iridóides glicosilados em várias espécies, a partir do qual se pode concluir que estes metabólitos, possivelmente, estão presentes em praticamente todas as subfamílias de Rubiaceae (HIROYUKI *et al.*, 1988).

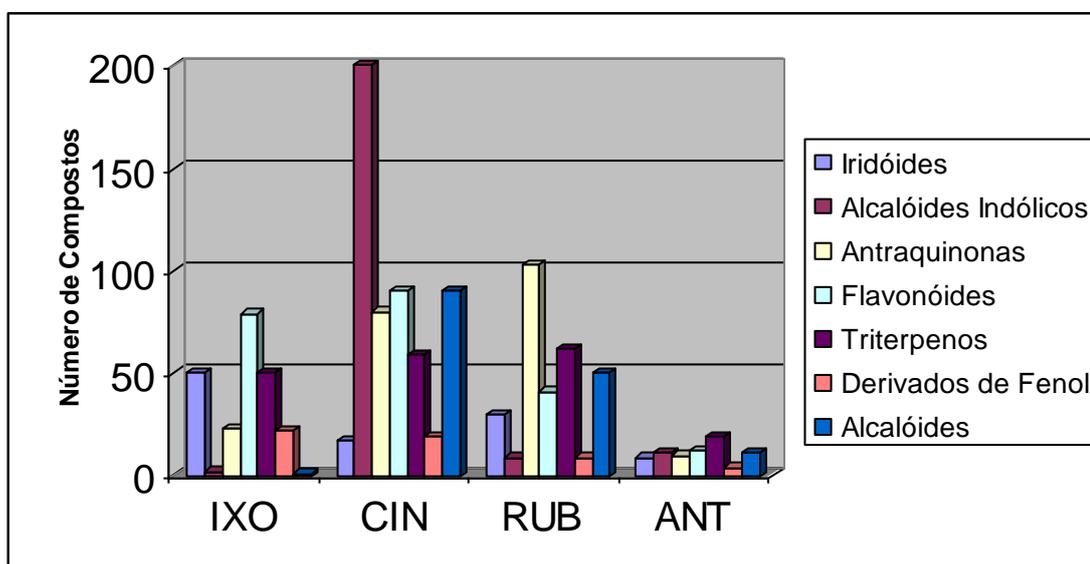


Figura 1 - Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae (BOLZANI *et al.*, 2001).

Sob o ponto de vista farmacológico e econômico a família Rubiaceae apresenta várias espécies de interesse como, por exemplo:

- A *Coffea arabica* L., planta de grande importância não só pelas suas comprovadas e conhecidas propriedades medicinais, mas também em virtude de

seu valor como bebida revigorante apreciada mundialmente. O “café”, como é conhecida popularmente, tem como principal componente a cafeína, uma metilxantina com potentes propriedades farmacológicas (estimulante do sistema nervoso central, vasoconstritora, broncodilatadora e diurética, dentre outros efeitos), sendo utilizada em formulações farmacêuticas como por exemplo, para o tratamento de enxaquecas (SIMÕES *et al.*, 2001).

- A *Cephaelis ipecacuanha* Rich., conhecida como “ipeca” e “ipecacuanha”, é planta clássica do Brasil de amplo uso na medicina. As raízes contêm emetina, alcalóide com efeitos emético, anti-helmíntico e expectorante (MORS *et al.*, 1995).

- A *Psychotria viridis* Ruiz et Pavón, mais conhecida como “chacrona”, é um arbusto há muito vem sendo utilizado em cerimônias e rituais religiosos em associação com o cipó *Banisteriopsis caapi* (Spruce) Morton (“caapi”), uma Malpighiaceae, no preparo de uma bebida com propriedades alucinógenas conhecida como “ayahuasca”, que significa “vinho das almas”. A mistura é utilizada em várias regiões da floresta Amazônica pelas comunidades do “Santo Daime” e “União do Vegetal” (CALLAWAY *et al.*, 1996; GROB *et al.*, 1996).

O efeito alucinógeno da bebida é devido à presença do alcalóide N,N-dimetiltriptamina (DMT), encontrado nas folhas da “chacrona” e que tem atividade agonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub> (serotonina) em associação com alcalóides indólicos β-carboxilados (a harmina, a harmalina e a tetraidroarmina) presentes nas cascas de “caapi”. O alcalóide harmalina é um potente inibidor da monoaminoxidase tipo A (MAO-A), enzima que promove a degradação do DMT no organismo. Como consequência desse mecanismo, observa-se um aumento da biodisponibilidade oral do DMT intensificando e prolongando seus efeitos alucinógenos (DEULOFEU, 1967; FREEDLAND & MANSBACH, 1999).

- A *Uncaria tomentosa* (Willd) DC., chamada popularmente de “unha-de-gato” devido à semelhança de seu espinho com a unha de gato tem sido amplamente empregada na medicina popular. No ano de 1977, mais de 50 produtos à base desta planta foram introduzidos no mercado farmacêutico nos Estados Unidos. Estes produtos possuem diversas indicações: para artrite, asma, câncer, úlcera gástrica, inflamações e hemorragias, dentre outras. Dentre as substâncias isoladas desta planta, foi citada uma ação imunoestimulante dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos, assim como uma inibição do crescimento de células leucêmicas. Também foram isolados alcalóides indólicos tetra e pentacíclicos. Outros grupos de substâncias estudadas são os glicosídeos do ácido quinóico, triterpenos oxigenados e procianidinas. Esses compostos conferem a atividade antiinflamatória desta planta através da inibição da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) (LEMAIRE *et al.*, 1999; PERAZZO, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2005).

- A *Chiococca alba* (L.) Hitchc., conhecida como “cainca”, tem sido usada popularmente por suas propaladas propriedades terapêuticas, tais como: diurética, purgativa, anti-asmática e anti-reumática (atividade pela qual a planta tem sido comercializada por uma indústria brasileira de fitoterápicos há décadas). Das raízes da planta foram identificados, dentre outros metabólitos, dois alcalóides quinolínicos biologicamente ativos (EL-ABBADI *et al.*, 1989), iridóides e um iridóide (CARBONEZI *et al.*, 1999), um nor-seco-pimarano (BORGES-ARGAÉZ *et al.*, 2001) além de ácidos fenólicos, antraquinonas, iridóides, iridóides, fenilpropanóides e ácido ursólico, analisados por CLAE (GAZDA *et al.*, 2005, 2006). Neste trabalho, os autores verificaram que a administração do extrato etanólico das raízes da “cainca”, em camundongos, apresentou baixa toxidez aguda e sub-crônica além de sinais de

hipoatividade sem que, entretanto, fossem observados efeitos mutagênicos e de indução enzimática hepática.

## **1.2 O gênero *Genipa***

Até o momento quatro espécies de *Genipa* são reconhecidas e pertencem a dois grupos distintos morfologicamente. No primeiro encontram-se englobadas as espécies *G. americana* e *G. infundibuliformis* Zappi & Semir que diferem marcadamente de *G. curviflora* Dwyer e *G. williamsii* Standl em várias características vegetais e florais indicando que estas duas últimas não devam ser do mesmo gênero. Estudos filogenéticos moleculares realizados por Persson (2000 e 2003) demonstraram que *Genipa williamsii* Standl pertence ao gênero *Agouticarpa*. Delprete *et al.* (2005) reconheceram *Genipa* como um gênero de duas espécies: *Genipa americana* (planta jovem com folhas inteiras; corola hipocrateriforme) natural e cultivada em toda a América Central e América do Sul e *Genipa infundibuliformis* (planta jovem com folhas lobadas; corola infundibuliforme), até o momento, encontrada somente no Brasil centro-meridional.

Os poucos trabalhos de pesquisa existentes sobre o gênero concentram-se na espécie *Genipa americana*.

## **1.3 A espécie *Genipa americana* Linnaeus**

### **1.3.1 Botânica e Sistemática (CORRÊA, 1969; LORENZI, 2000; MORS *et al.*, 2000; DELPRETE *et al.*, 2005).**

#### **1.3.1.1 Etimologia**

*Genipa*: deriva do *tupi-guarani* que significa “mancha escura” ou “fruto que serve para pintar”.

*americana*: procedente da América.

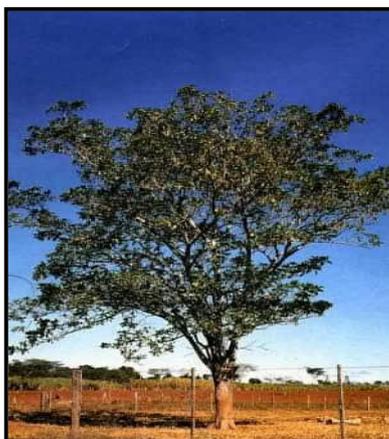


Figura 2 - *Genipa americana* L. (Disponível em <http://www.achetudoeregiao.com.br/.../jenipapo.jpg>. Acesso em: 15 de abril 2007).

### 1.3.1.2 Sinonímias

Sinonímias científicas: *Gardenia genipa* Swartz

Sinonímias populares no Brasil: “jenipapo”, “janapabeiro”, “janipaba”, “janipapo”, “jenipapeiro”, “jenipapinho”, “jenipá”, “jenipapeirol”, “genipapo”, “genipapeiro”

### 1.3.1.3 Dados fenológicos

Floresce desde outubro até dezembro; frutos maduros em fevereiro e março.

### 1.3.1.4 Ocorrência

Amplamente distribuída na América Central tropical e na América do Sul. A espécie está presente em todo o Brasil, naturalmente ou cultivada, desde a Amazônia até São Paulo e Mato Grosso, em várias formações florestais. De maneira geral, prefere o litoral e as margens dos rios, mas existe também no interior, até no alto Amazonas, em terras elevadas, desde que estas estejam sujeitas a inundações periódicas.

### 1.3.1.5 Descrição macroscópica

#### 1.3.1.5.1 Hábito

Árvore elegante e de grande altura, comumente de 8 a 10m, mas podendo chegar até 20 metros; copa grande e arredondada; ramos numerosos e fortes.

#### 1.3.1.5.2 *Caule*

O caule é reto e de formato cilíndrico com diâmetro de 40 a 60cm; casca lisa, espessa, cinza-esverdeada.

#### 1.3.1.5.3 *Folhas*

As folhas são opostas, glabras, estreitas na base, de 10 a 35cm de comprimento.

#### 1.3.1.5.4 *Inflorescências*

As flores são hermafroditas, campanuladas, brancas ou amareladas, suavemente aromáticas, de 20 a 45mm, dispostas em grandes corimbos axilares ou solitárias.



Figura 3 - Flor do jenipapeiro (Disponível em <http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/15b.jpg>. Acesso em: 15 de abril 2007).

#### 1.3.1.5.5 *Fruto*

Fruto comestível e muito apreciado; baga subglobosa, de 8 a 10cm de comprimento e 6 a 7cm de diâmetro, amarelada quando madura, de casca mole, rugosa, amarelo-pardacento contendo polpa aromática, também mole, envolvendo numerosas sementes.



Figura 4 - Jenipapo (Disponível em <http://www.www.geocities.com/.../Imagens/Jenipapo2.jpg>. Acesso em: 15 de abril 2007).

### 1.3.2 Importância econômica

A madeira é empregada na construção civil, marcenaria, na confecção de móveis, cabos de ferramentas e para carpintaria em geral. A casca é usada em curtumes para tratar couros por ser rica em taninos. Seus frutos, comestíveis, quando ainda verdes fornecem um corante de cor azulada que é utilizado para diversas finalidades. Esta propriedade já era bem conhecida pelos índios que os utilizavam para tingirem tecidos, enfeites, cerâmicas e para pintar o corpo nas cerimônias religiosas e durante as batalhas. Este poder corante é devido à presença de um iridóide denominado genipina, que se apresenta originalmente incolor mas que quando exposto ao ar ou em contato com as proteínas da pele torna-se azul escuro e finalmente preto. Para extrair o corante do fruto, este deve ser cortado imaturo, espremido e depois o suco coado. A genipina é incolor no início da frutificação e perde o efeito corante com o amadurecimento do fruto (CORRÊA, 1969; LORENZI, 2000; MORS *et al.*, 2000; DELPRETE *et al.*, 2005). Recentemente no Brasil (VIDALENC, 2005) foi patenteado um método para o emprego do suco de jenipapo em tatuagens corporais não-permanentes. O corante permanece ativo por apenas um período de aproximadamente oito dias. Outra patente, depositada no

Japão (SHOJI & JOGI, 1996), se refere a um produto obtido do suco do jenipapo para tingir cabelos.

Uma referência ao jenipapeiro feita por Hans Staden, um alemão que quase foi comido pelos índios Tupinambás do litoral de São Paulo, menciona o seguinte (DELPRETE *et al.*, 2005):

“Numa árvore que os selvagens chamam de jenipapo ivá, cresce uma fruta que tem certa semelhança com a maçã. Os selvagens mascam essa fruta e espremem o suco dentro de um vaso. Com ele é que se pintam. Quando esfregam o suco sobre a pele, no início parece água. Mas depois de algum tempo a pele fica tão preta como se fosse tinta. Isso perdura até o nono dia. Depois a cor desaparece, mas não antes desse prazo, mesmo quando eles se lavam muitas vezes”.

O fruto após a maturação fornece polpa comestível aproveitada *in natura* e na forma de doces; o suco fermentado transforma-se em vinho ou licor (LORENZI, 2000).

### 1.3.3 Importância ecológica

A árvore de *G. americana* é muito útil para plantios em áreas brejosas e degradadas de preservação permanente, pois se adapta muito bem em terrenos úmidos. Fornece abundante alimentação para a fauna em geral. Seus frutos são consumidos por vários animais silvestres como antas, porcos-do-mato, capivaras e paca-tatu, os quais contribuem com a dispersão natural da espécie (LORENZI, 2000; DELPRETE *et al.*, 2005).

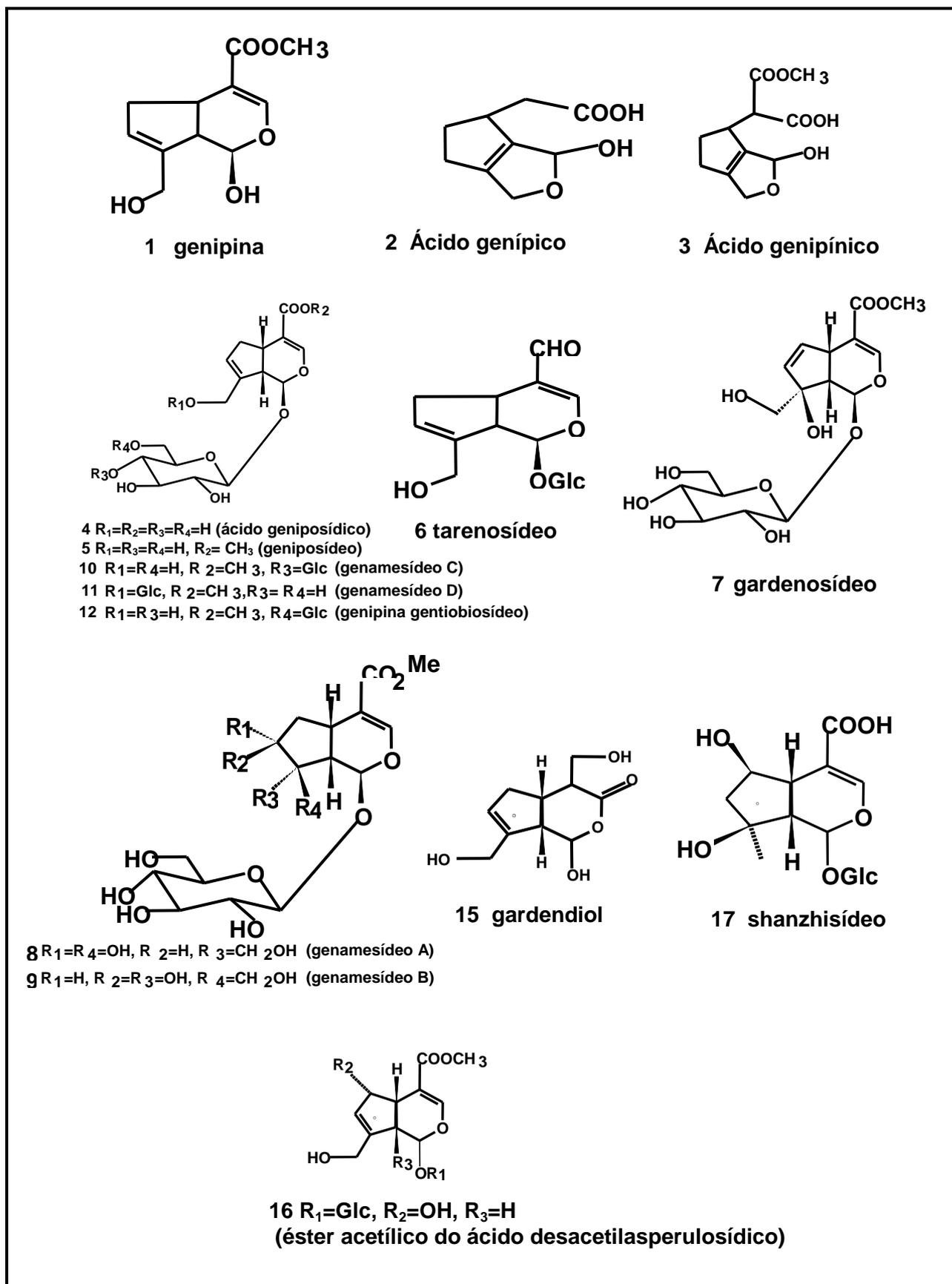
A *G. americana* também contribuiu para que uma espécie de tucano (*Ramphastos toco*) permanecesse em seu *habitat* devido à disponibilidade de frutos frescos para consumo nos períodos de seca (RAGUSA-NETTO, 2006).

#### 1.3.4 Estudos químicos e farmacológicos na espécie *Genipa americana*

*Genipa americana* é quimicamente caracterizada pela presença de iridóides. A genipina **(1)** foi o primeiro iridóide isolado de frutos da espécie no Brasil (DJERASSI, 1960) e sua estrutura química elucidada no ano seguinte (DJERASSI, 1961). Também presente em outro gênero (*Gardenia jasminoides* Ellis), a genipina tem sido estudada de forma intensiva nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas (antiangiogênica, antiinflamatória e antioxidante) e poder corante (ALMOG *et al.*, 2004; KOO *et al.*, 2004; BYUNG-CHUL *et al.*, 2005). Duas substâncias da mesma classe, os ácidos genípico **(2)** e genipínico **(3)**, foram encontrados em uma espécie de Porto Rico (TALLENT, 1964). Estas substâncias inibiram o crescimento *in vitro* de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, do fungo *Trichophyton mentagrophytes*, da alga *Chlorella vulgaris* e do protozoário *Tetrahymena gelleii*. Posteriormente Guarnaccia *et al.* (1972), a partir das folhas de *G. americana*, do Panamá, foi isolado um iridóide glicosilado, o ácido geniposídico **(4)**. Ueda e Iwahashi (1991), trabalhando com *G. americana* coletada na Indonésia em 1983, isolaram um iridóide glicosilado inédito até então, o geniposídeo **(5)**, juntamente com outros já conhecidos e através da formação de calos e culturas de células suspensas obtiveram o tarenosídeo **(6)**, o gardenosídeo **(7)** e o ácido geniposídico **(4)**. Todas as substâncias apresentaram atividade antitumoral em testes realizados *in vitro*. Recentemente, Ono *et al.* (2005) isolaram e elucidaram as estruturas de mais quatro novos iridóides glicosilados de “jenipapo” coletado no Peru, chamados genamesídeos A-D **(8-11)**, juntamente com quatro outros já conhecidos: ácido geniposídico, geniposídeo, gardenosídeo **(7)** e genipina-gentiobiosídeo **(12)**.

Em 2007, Ono *et al.*, dando continuidade a pesquisa dos constituintes químicos de frutos de *G. americana* coletadas no Peru isolaram três novos monoterpenóides chamados genipacetal (**13**) e genipaol (**14**) juntamente com quatro iridóides conhecidos: genipina, gardendiol (**15**), éster metílico do ácido desacetilasperulosídico (**16**) e shanzhisídeo (**17**), sendo que os três últimos iridóides foram isolados pela primeira vez do fruto de *G. americana*.

Na Figura 5, encontram-se representados os iridóides isolados de *G. americana*.

Figura 5 - Iridóides de *G. americana* L.

A Figura 6, a seguir, mostra os monoterpenos isolados até o momento, de *G. americana*.

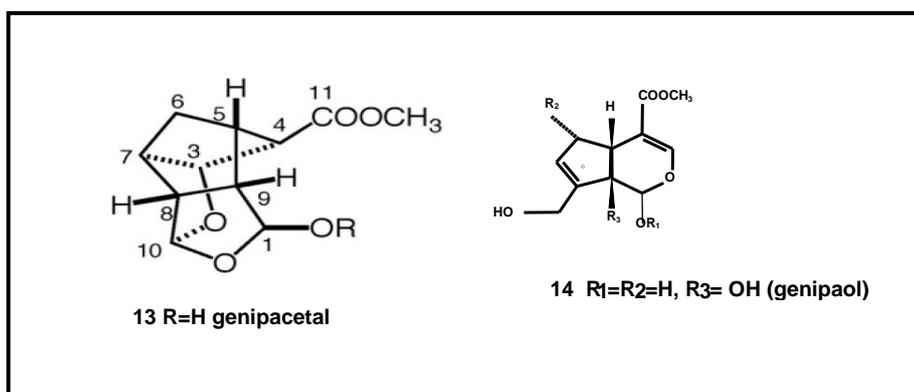


Figura 6 - Monoterpenóides de *G. americana* L.

A fração volátil dos frutos de jenipapo coletados no Brasil apresentou altas quantidades de ácidos carboxílicos (butírico, 2-metilbutírico e hexanóico) e 2- e 3-butanoato de metila, que parecem estar diretamente relacionados ao odor forte e primário do jenipapo (BORGES & REZENDE., 2000). Já nos frutos coletados em Cuba, Pino *et al.* (2005) identificaram na fração volátil, além de ácidos carboxílicos, linalol e limoneno. Mais recentemente, Pinto *et al.* (2006) descreveram 32 novos constituintes voláteis, além dos componentes já descritos anteriormente.

Como pode ser observado, poucos são os trabalhos sobre a composição química de metabólitos especiais do jenipapo e, dentro desse pequeno universo, verifica-se uma predominância na investigação de substâncias da classe dos iridóides. Cabe ressaltar a importância de um desses iridóides – a genipina – uma substância com poder tintorial que tem sido bastante estudada devido às suas propriedades farmacológicas e importância econômica, conforme já mencionado anteriormente. Entretanto, a maioria dos trabalhos sobre as propriedades farmacológicas da genipina tem sido realizada a partir da espécie *Gardenia jasminoides* Ellis, planta também rica em iridóides. Apesar do jenipapo conter a

mesma substância, não existe comprovação de possíveis atividades anticarcinogênicas, antiinflamatórias e antioxidantes, já divulgadas para este metabólito. A investigação, sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico proposta neste trabalho, permitirá um maior conhecimento sobre a natureza dos metabólitos secundários presentes no jenipapo, assim como de suas possíveis propriedades funcionais.

#### **1.4 Extração por ultrassom**

O extrato bruto obtido de plantas frescas ou secas, ou partes de plantas (flores, folhas, frutos, raízes e outros) por diferentes processos de extração é ponto de partida para a descoberta e o isolamento de substâncias bioativas. Técnicas convencionais de extração como percolação, maceração e extração por Soxhlet fundamentam-se na escolha correta do solvente extrator, na agitação, no uso de calor, aumentando assim, a solubilidade dos componentes e a taxa de transferência de massa. Entretanto, tais técnicas necessitam de períodos longos de extração e, em alguns casos, o uso de aquecimento, como na extração por Soxhlet, pode ocasionar degradação de substâncias naturais termicamente instáveis presentes no material vegetal (JIANYONG *et al.*, 2001; VINATORU, 2001; SCHINOR *et al.*, 2004; MELECCHI *et al.*, 2006).

Métodos não convencionais, como ultrassom, têm sido descritos em muitos trabalhos de extração e isolamento de componentes bioativos de materiais vegetais. Alguns dos principais benefícios incluem a redução do tempo de extração, a melhora na eficiência com aumento do rendimento, utilização de temperaturas baixas evitando danos térmicos ao extrato e perda de componentes voláteis, economia no volume de solvente. Outras vantagens da extração por ultrassom é que se trata de uma técnica simples, rápida, que apresenta elevada reprodutibilidade, baixo custo e

permite o uso de amostras de quantidades e tamanhos variados (SALISOVÁ *et al.*, 1997; VALACHOVIC *et al.*, 2001; PANIWNKYK *et al.*, 2001; MELECCHI *et al.*, 2006).

O sistema de ultrassom baseia-se na transformação de energia elétrica em energia mecânica, através de dispositivos chamados de transdutores ultrassônicos que provocam uma vibração mecânica em alta frequência (maior que 20 KHz) que se propaga principalmente através de materiais que sejam bons condutores de som, como aço inoxidável, vidro e outros. Esta energia mecânica é chamada de cavitação ultrassônica (KORN *et al.*, 2005).

As ondas ultrassônicas podem ser de alta ou baixa potência. As ondas ultrassônicas de alta potência levam a alterações químicas e físicas, no meio líquido onde as ondas são aplicadas. Existem dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas que são o banho (Figura 7) e a sonda ultrassônica (BARBOZA & SERRA, 1992).



Figura 7 - Aparelho de ultrassom.

Quando líquidos são submetidos às ondas ultrassônicas de alta potência, estas produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação no meio, no qual, a depender da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas durante uma fase de rarefação. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação as

dimensões da cavidade vão aumentando até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso (Figura 8) (KORN *et al.*, 2005).

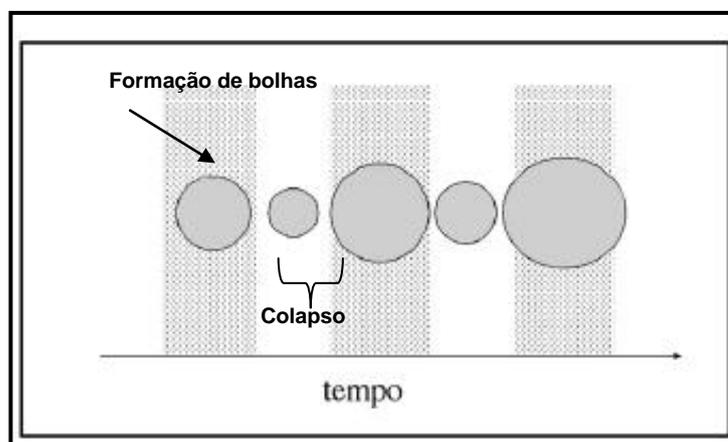


Figura 8 - Representação esquemática da cavitação acústica: ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante o tempo de sonicação (KORN *et al.*, 2005).

Os primeiros estudos sobre efeitos provocados por ondas ultrassônicas datam por volta de 1950 (SALISOVÁ *et al.*, 1997; VINATORU, 2001). Cavitação é considerada como o ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonicação. Com os colapsos das bolhas de cavitação ocorre a liberação de grande quantidade de energia para o meio proporcionando, na microrregião onde ocorreu o colapso, aumento da temperatura da ordem de alguns graus centígrados e da pressão para centenas de atmosferas. O colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes (KORN *et al.*, 2005).

Os tecidos vegetais são compostos por células envolvidas por membranas e paredes celulares. Mecanismos de extração envolvem dois tipos de fenômenos físicos: difusão através da parede celular e lavagem do conteúdo intracelular, uma vez que as paredes são rompidas (Figura 9). O provável mecanismo de extração de material vegetal por ultrassom parece envolver o rompimento da parede celular que envolve a célula vegetal por efeitos da cavitação e a intensificação da transferência

de massa devido à facilidade de acesso do solvente no interior da célula. O colapso da cavitação de bolhas próximo às paredes das células é esperado produzir rompimento celular juntamente com uma boa penetração do solvente para o interior das células através do jato ultrassônico e liberação dos componentes que estão dentro da célula, resultando no aumento da eficiência da extração e podendo levar também a redução do tempo de extração (JIANYONG *et al.*, 2001; MELECCHI *et al.*, 2006; JACQUES *et al.*, 2007). O ultrassom pode ainda ter sua eficiência aumentada pela redução das partículas do material vegetal, por moagem antes da extração, para aumentar o contato com o solvente extrator (VINATORU, 2001).

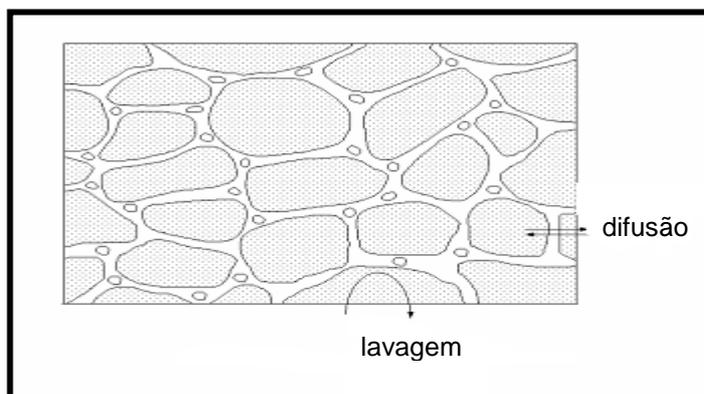


Figura 9 - Estrutura celular vegetal (VINATORU, 2001).

Atualmente, a extração assistida por ultrassom tem sido utilizada para extrair componentes com potenciais atividades biológicas, tais como flavonóides, polifenóis, hidrocarbonetos saturados, ésteres de ácidos graxos, esteróides, triterpenóides, saponinas (JIANYONG *et al.*, 2001; PANIWNYK *et al.*, 2001; ALBU *et al.*, 2004; SCHINOR *et al.*, 2004; MELECCHI *et al.*, 2006) e também isolamento de componentes voláteis de produtos naturais em temperatura ambiente com solventes orgânicos (ALISSANDRAKIS *et al.*, 2003).

Alguns iridóides glicosilados, como ácido geniposídico e o geniposídeo, presentes em *Genipa americana*, objeto deste trabalho, foram extraídos no trabalho de Hui *et al.* (2005) através do método do ultrassom na espécie *Eucommia ulmoides*

(Eucommiaceae). O geniposídeo também foi extraído por ultrassom em frutos de *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae) por Jian-bing *et al.* (2006).

Um dos aspectos importantes para se obter bons rendimentos com a utilização do ultrassom é o estabelecimento de valores apropriados, para parâmetros de extração, relacionados às propriedades biológicas do material a ser extraído (tempo de extração, volume de solvente, polaridade do solvente e outros). Muitos trabalhos de pesquisas vêm sendo conduzidos com o propósito de otimizar as condições de extração (SALISOVÁ *et al.*, 1997; VALACHOVIC *et al.*, 2001; HUI *et al.*, 2005; MELECCHI *et al.*, 2006; JACQUES *et al.*, 2007).

## 1.5 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

O metabolismo do oxigênio nas células vivas, além de levar a produção de energia necessária para as atividades das células, ocasiona também a formação de radicais (ROESLER *et al.*, 2007).

Radicais livres e outros oxidantes induzem danos oxidativos para biomoléculas e têm sido associados ao envelhecimento e desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, Alzheimer (ROESLER *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2007).

Espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e hidroperoxila ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas (ANDRADE *et al.*, 2007).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diferentes substâncias antioxidantes que podem ser endógenas, como a enzima superóxido dismutase ou podem ser provenientes da dieta alimentar, como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, carotenóides e polifenóis. Quando ocorre limitação na disponibilidade de

antioxidantes, podem ocasionar lesões oxidativas de caráter cumulativo (SOUSA *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser captados por outro antioxidante (ANDRADE *et al.*, 2007).

Dentre as diversas classes de antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido grande atenção, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides e outros. Por suas propriedades redutoras e estruturas químicas, estas substâncias têm capacidade de seqüestrar radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, sendo os intermediários formados relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático presente na suas estruturas. São encontrados em cereais, frutas e vegetais e têm sido demonstrado através de estudos clínicos e epidemiológicos que populações que fazem alto consumo de tais alimentos apresentam baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas (YAMAGUCHI, 1998).

Na indústria alimentícia, o processo de oxidação lipídica é inibido por substâncias sintéticas como butil-hidróxi-tolueno (BHT) e butil-hidróxi-anisol (BHA), que são seqüestradores de radicais livres. Contudo, estudos têm demonstrado que estas substâncias apresentam alguns efeitos tóxicos (YESILYURT *et al.*, 2008).

Pesquisas voltadas para a busca por antioxidantes de ocorrência natural têm aumentado muito nos últimos anos. Além da promoção de saúde eles têm um papel importante nas indústrias alimentícias para evitar o processo de oxidação lipídica em

alimentos responsável pelo aroma e a formação de compostos indesejáveis podendo substituir antioxidantes sintéticos (BRAND-WILLIANS *et al.*, 1995).

## 1.6 Óleos essenciais

Óleos essenciais representam pequena fração da composição de uma planta, mas conferem características pelas quais plantas aromáticas são utilizadas em indústrias farmacêuticas, de alimentos e de fragrâncias. Apresentam composição complexa, podendo conter diversos componentes, especialmente hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos, dentre outros). Ambos os componentes hidrocarbonetos e oxigenados são responsáveis pelos sabores e odores característicos (POURMORTAZAVI *et al.*, 2007).

Os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como em pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Podem também estar estocados em certos órgãos, tais como flores, folhas, ou ainda nas cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes (SIMÕES *et al.*, 2001).

Os métodos de extração de óleos essenciais variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Como métodos de extração se têm a enfloração, hidroddestilação, extração com solventes orgânicos, prensagem e extração por fluido supercrítico (SIMÕES *et al.*, 2001).

O aroma do óleo essencial está relacionado aos constituintes predominantes na essência, os quais podem variar qualitativa ou quantitativamente em função de diversos fatores: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante resultante da precipitação e fatores geográficos e climáticos

(NOGUEIRA *et al.*, 2007). Amostras de óleo essencial de folhas frescas de *Lippia alba* coletadas nas quatro estações do ano foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e avaliadas para a atividade antibacteriana no trabalho de Nogueira *et al.* (2007). Neste trabalho, a *L. alba* cultivada em Cascavel, região Oeste do Paraná, apresentou uma composição com predominância de *trans*-diidrocarvona e citral. De forma diferenciada, a espécie cultivada em Curitiba, região Norte do Paraná, mostrou-se rica em  $\gamma$ -terpineno, significando que plantas cultivadas em regiões diferentes podem apresentar variações na constituição química mesmo sendo plantas da mesma espécie.

Várias pesquisas têm demonstrado que óleos essenciais e seus componentes possuem atividades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas (HAMMER *et al.*, 2003; MONDELLO *et al.*, 2006; BOZIN *et al.*, 2007). Nos últimos anos um grande número de óleos essenciais e seus constituintes vêm sendo investigados devido suas propriedades antimicrobianas contra algumas bactérias e fungos (KALEMBA *et al.*, 2003). Dentre esses óleos essenciais, o óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel tem grande importância devido ao amplo espectro de atividades biológicas demonstradas (antibacteriana, antifúngica e antiviral) (HAMMER *et al.*, 2003; CARSON *et al.*, 2006).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de anti-sépticos tópicos. Métodos de investigação *in vitro* têm sido desenvolvidos para que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Entretanto, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos essenciais apresentam, quais sejam: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de susceptibilidade

microbiana, deve-se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura, o(s) microrganismo(s) e o óleo essencial testados (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

## 2 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Proceder à avaliação fitoquímica e farmacológica dos frutos de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) com vistas ao aprimoramento do conhecimento quimiosistemático da família e verificação de suas propriedades medicinais.

### Objetivos Específicos

- pesquisar, sob o ponto de vista etnofarmacológico com base em levantamento bibliográfico, o uso de partes da planta;
- estudar a fração volátil dos frutos do jenipapo visando avaliar uma possível atividade antimicrobiana e antioxidante;
- verificar atividade antioxidante e o conteúdo de fenóis do extrato metanólico dos frutos;
- determinar constituintes químicos presentes no extrato metanólico dos frutos de *G. americana*;
- obter informações sobre a composição em metabólitos secundários que possam contribuir para a quimiosistemática da família Rubiaceae.

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Materiais e métodos

#### 3.1.1 Equipamentos, reagentes e soluções

Para extração e fracionamento das amostras foram utilizados solventes grau para análise (P.A.). A evaporação foi conduzida sob vácuo, em evaporador rotatório com banho de aquecimento a 50<sup>0</sup>C.

As separações cromatográficas foram realizadas em coluna aberta empacotada com gel de sílica 60 (Merck), tamanho da partícula de 0,063-0,200mm (70-230 mesh ASTM) e em coluna aberta empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech). Para a cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas com gel de sílica 60 F<sub>254</sub> de procedência Merck (Darmstadt, Alemanha). As cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP) foram desenvolvidas em cromatoplasas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck).

As revelações das placas foram realizadas sob luz ultravioleta a 254 e 365nm com auxílio de lâmpada de luz ultravioleta Modelo CC-80 (Spectroline<sup>®</sup>) e reação com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento em placa aquecedora.

Preparo da solução de anisaldeído sulfúrico: 0,5ml de anisaldeído foi dissolvido em 10ml de ácido acético glacial. Em seguida, adicionou-se 85ml de metanol e 5ml de ácido sulfúrico concentrado (nesta ordem). A revelação deve ser feita sob aquecimento.

Reação de metilação com diazometano: a amostra foi solubilizada em solução etérea de diazometano (3ml), permanecendo em contato e sob refrigeração por duas horas. Transcorrido esse tempo, o excesso do reagente foi evaporado sob corrente de nitrogênio.

Para a extração por ultrassom foi utilizado banho ultrassônico, modelo Thornton T-14, com 90W de potência, 40KHz de frequência e dimensões internas da cuba de 140mm x 240mm x 90mm. Durante o processo de extração a temperatura do banho foi mantida entre 26-32°C, obtida quer por troca da água do banho ou pela utilização de gelo a cada ciclo.

Para a cromatografia líquida de alta eficiência em modo analítico (CLAE) foi utilizado cromatógrafo LaChrom<sup>®</sup> (Merck-Hitachi) L-7100, equipado com detector D.A.D. (L-7450A), sistema injetor com “loop” de 20µl e coluna Rexchrom C18 (com diâmetro interno de 25cm x 4,6mm, partículas de 5µm, Regis Technologies<sup>®</sup>). Os solventes utilizados foram em grau espectroscópico.

O padrão genipina fabricado por Wako Pure Chemical Industries utilizado para análise por CLAE dos extratos metanólicos foi fornecido por Demorellis Comércio Exterior Ltda.

Para obtenção da fração volátil dos frutos de *G. americana* empregou-se a técnica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas em espectrômetro de massas modelo Shimadzu GCMS-QP5000, por impacto de elétrons a 70eV e os resultados expressos em relação massa/carga ( $m/z$ ). Para separação dos componentes utilizou-se coluna capilar modelo Phenomenex Zebron ZB-5ms (30m, 25mm, com filme de 0,25µm de espessura; 5% fenilmetilsilicone), programação de temperatura de 60 a 240°C, com incremento de 3°C/min. Para o cálculo dos índices de retenção de Kovats, foram injetados padrões de hidrocarbonetos lineares de série homóloga de C<sub>8</sub> a C<sub>26</sub>. Os solventes utilizados foram em grau para análise.

A determinação de fenóis totais foi realizada de acordo com ANDRADE *et al.* (2007) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu 2N e ácido gálico (padrão), ambos obtidos da Sigma-Aldrich.

O radical DPPH e a rutina utilizados na avaliação da atividade antioxidante foram obtidos da Sigma-Aldrich. O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb-761) utilizado como padrão para atividade antioxidante, provém de produto comercial do Laboratório Altana Pharma Ltda (Tebonin 40mg/ml – solução oral).

As medições de absorvância das amostras testadas para determinação da atividade antioxidante e fenóis totais foram efetuadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-mini 1240.

Os resultados apresentados neste estudo para atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos correspondem à média de três leituras  $\pm$  desvio padrão da média. A comparação entre os valores de  $CE_{50}$  para os extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ), analisados utilizando teste de Student ( $p < 0,01$ ).

### **3.2 Abordagem etnofarmacológica da planta**

O levantamento bibliográfico do uso de partes da planta foi realizado através de pesquisa bibliográfica em base de dados Portal Periódicos CAPES e livros (CRAVO, 1995; CRUZ 1995; MORS *et al.*, 2000; DELPRETE *et al.*, 2005).

### **3.3 Obtenção e identificação do material botânico**

Os frutos do “jenipapo” foram coletados em fevereiro de 2006, 2007 e 2008, no município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro.

A identificação botânica do material foi realizada pelo Dr. Sebastião Neto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A exsicata foi depositada no Herbário do Jardim Botânico sob o número de registro RB 465789.

### **3.4 Extração dos frutos de *G. americana***

Os frutos maduros e sem sementes, fatiados, secos em estufa a 50°C e moídos, forneceram 3kg de material. Parte deste material foi utilizado para otimizar as condições de extração dos frutos por ultrassom, utilizando-se planejamento estatístico de experimentos (processos uni e multivariado). O metanol foi empregado como solvente de extração em todos os procedimentos.

#### **3.4.1 Planejamento univariado na otimização da extração dos frutos por ultrassom**

Os fatores investigados foram: tempo de extração, volume de solvente extrator e quantidade de ciclos, em cinco níveis diferentes. Cada ciclo correspondeu a um tempo de 25 minutos. A massa utilizada foi igual para todas as etapas neste processo, ou seja, 10g dos frutos moídos. Em todos os experimentos, as amostras foram misturadas com metanol em béqueres e submetidas a banho ultrassônico. Os extratos assim obtidos foram filtrados a vácuo e concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O material concentrado foi mantido em dessecador para posterior pesagem e verificação do rendimento. Para avaliar as melhores condições de extração, primeiramente, o volume do solvente foi fixado em 40ml variando o tempo de extração em 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. Posteriormente, o tempo de extração de vinte e cinco minutos foi mantido (por produzir o melhor rendimento) e variou-se o volume do solvente em 20, 40, 60, 80 e 100ml. Finalmente, fixou-se o volume em cem mililitros para cada ciclo (melhor volume de solvente encontrado na

etapa anterior) e variou-se o número de ciclos (com troca de solvente em cada ciclo). O rendimento (%) foi utilizado como parâmetro para comparação das extrações.

### **3.4.2 Planejamento multivariado (planejamento composto central) na otimização da extração dos frutos por ultrassom**

A otimização da extração dos frutos por ultrassom foi realizada usando um planejamento composto central para três fatores: massa, volume de solvente e tempo de extração. Os fatores foram analisados em três níveis (mínimo, ponto central e máximo) e foram codificados como -1, 0 e 1, respectivamente para o valor mínimo, central e máximo. O objetivo do uso de tal planejamento foi buscar a melhor resposta que, no caso das extrações por ultrassom, seria o maior rendimento (%). A matriz proposta resultou em 19 experimentos (Tabela 1). Os fatores avaliados foram:

$X_1$  (quantidade de amostra): o efeito foi avaliado usando 1, 3 e 5g;

$X_2$  (volume de solvente): 10, 30 e 50ml de metanol;

$X_3$  (tempo de extração): 25, 50 e 75 minutos.

Tabela 1 - Matriz do planejamento composto central com os respectivos níveis das variáveis.

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0

(-1): nível mais baixo; (0): central; (+1): nível mais alto

X<sub>1</sub>: massa da amostra em gramas; X<sub>2</sub>: volume de solvente em ml; X<sub>3</sub>: tempo de extração

A ordem de realização dos experimentos foi definida aleatoriamente. A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi analisada estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA).

### 3.4.3 Análise da superfície de resposta

Após a realização dos experimentos do planejamento composto central os fatores significativos foram selecionados e aplicada a metodologia de análise de superfície de respostas para se confirmar o máximo de rendimento do extrato. A avaliação estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa Statsoft Inc., Statistica for windows, Version 6.0, 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa, OK, 74104, USA, 1998.

## 3.5 Obtenção e fracionamento do extrato metanólico dos frutos

Cerca de 200g dos frutos maduros e moídos (item 3.4) foram submetidos à extração em ultrassom com metanol (4,8 litros) durante 2 horas e 30 minutos (25

min. x seis ciclos). A cada ciclo o material era filtrado a vácuo e 800ml de metanol adicionado.

O extrato foi concentrado sob pressão reduzida e os extratos metanólicos obtidos em cada etapa foram reunidos fornecendo 82,1g de material (41,05% de rendimento). Cerca de 20g do extrato metanólico obtido foram ressuspensos em uma mistura de metanol/água e particionados, sucessivamente, entre hexano, diclorometano e 1-butanol, fornecendo: fração em hexano (510mg), fração em diclorometano (815,1mg) e fração em 1-butanol (14,6g), conforme mostrado na Figura 10.

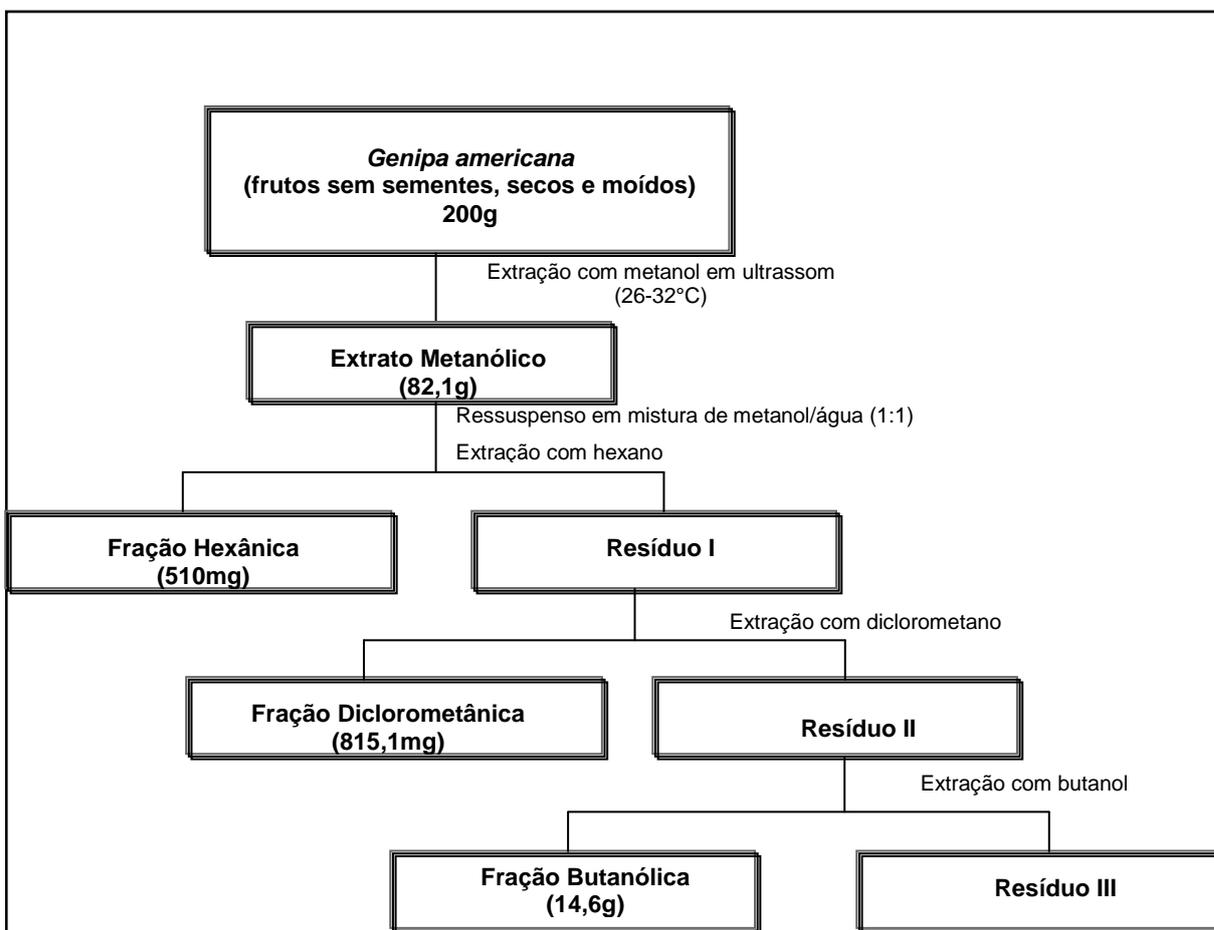


Figura 10 - Fluxograma da preparação do extrato metanólico e as respectivas partições em hexano, diclorometano e 1-butanol dos frutos maduros de *Genipa americana*.

### 3.5.1 Análise da fração hexânica

A fração em hexano (510mg), resultante da partição do extrato metanólico dos frutos de *G. americana*, foi submetida à cromatografia em coluna aberta empacotada com gel de sílica, com fase móvel de gradiente de polaridade crescente (hexano/acetato de etila/metanol). Esse procedimento cromatográfico em coluna resultou em 50 frações (Figura 11) que, após análise por cromatografia em camada delgada, inspeção sob luz ultravioleta e posterior revelação com anisaldeído sulfúrico, foram reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos (1, 2-5, 6-16, 17, 18-20, 21-22, 23, 24-36, 37-39, 40, 41-43, 44-50).

As frações de 2 a 5 (48,9mg), eluídas da coluna com hexano 100%, foram reunidas e codificadas como FHJ2-5 e, após revelação com anisaldeído sulfúrico, desenvolveu uma mancha avermelhada. Esta amostra foi submetida à metilação com diazometano e enviada para ser analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

As frações 18-20 (143,8mg) eluídas da coluna com hexano/acetato de etila 50% e codificadas como FHJ18-20, após revelação com anisaldeído sulfúrico desenvolveram duas manchas, uma avermelhada e uma amarelada. Aproximadamente 3mg desta amostra foram submetidos à análise por CG/EM.

As frações 21-22 (30,6mg) eluídas da coluna com hexano/acetato de etila 50% foram codificadas como FHJ21-22. Aproximadamente 3mg desta amostra foram submetidos à análise por CG/EM.

As frações 41-43 (45,5mg) eluídas da coluna com acetato de etila/metanol 30% e codificadas como FHJ41-43, após revelação com anisaldeído sulfúrico desenvolveram uma mancha avermelhada. Aproximadamente 3mg desta amostra foram submetidos à análise por CG/EM.

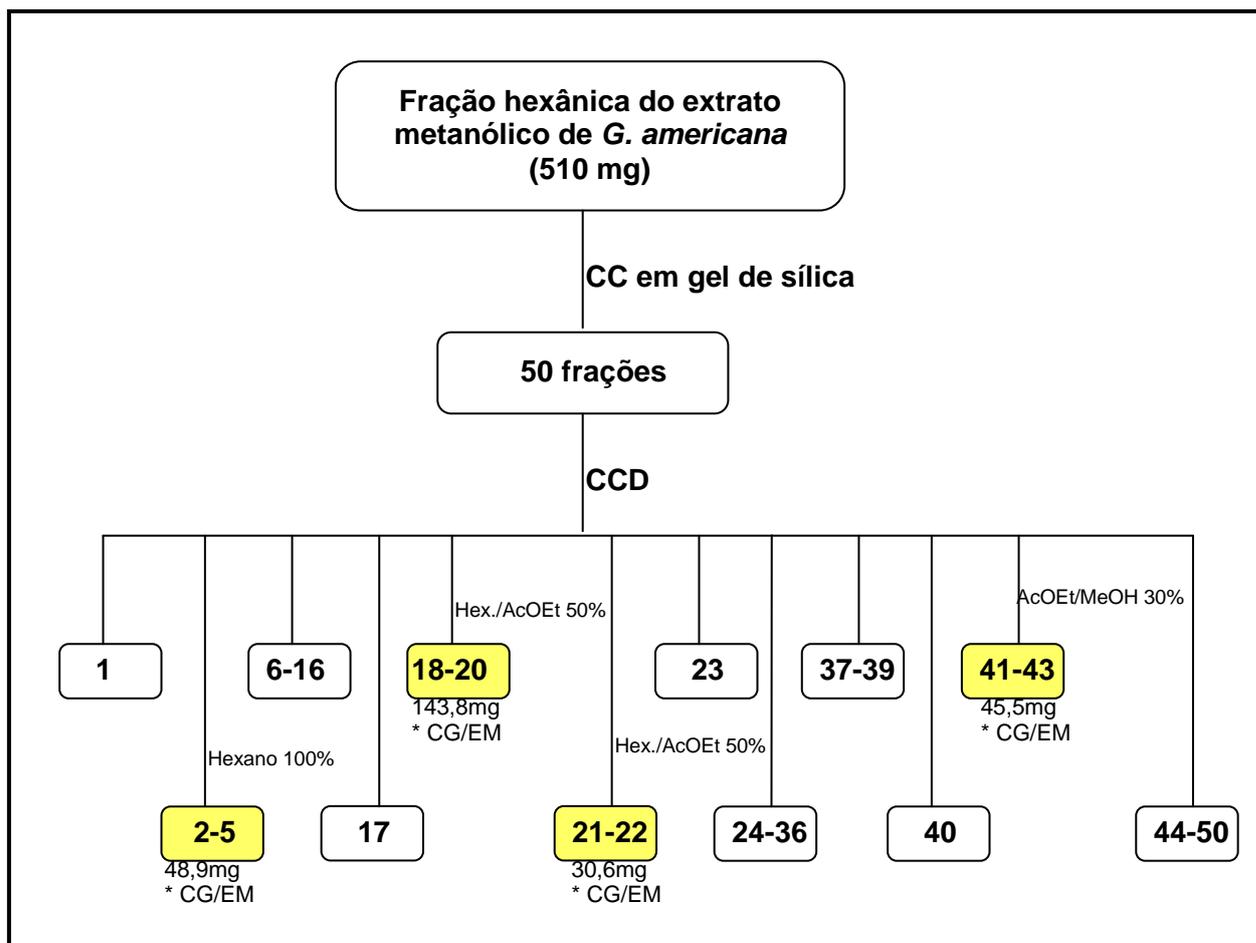


Figura 11 - Fracionamento da fração hexânica proveniente do extrato metanólico dos frutos maduros de *Genipa americana*.

### 3.5.2 Análise da fração em diclorometano

A fração em diclorometano (815,1mg) resultante da partição do extrato metanólico dos frutos de *G. americana* foi submetida à extração ácido-base. Cerca de 50mg da fração em diclorometano foram dissolvidos em clorofórmio (50ml) e extraídos com 5% de carbonato de sódio (20ml x 5). Em seguida, filtrou-se a fase aquosa que foi tratada com HCl concentrado, sendo feita a medição do pH. Foi realizada novamente uma extração com clorofórmio e a fração orgânica foi então concentrada. Aproximadamente 3mg desta fração foram metilados com diazometano e submetidos à análise por CG/EM.

### **3.6 Extração por maceração, Soxhlet e por ultrassom.**

#### **a) Extração por Maceração**

Cerca de 10g dos frutos secos e moídos foram macerados em 100ml de metanol. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por seis dias. A cada dois dias o macerado foi filtrado e mais 100ml de metanol adicionado aos frutos. No final utilizou-se um total de 300ml de solvente e os filtrados reunidos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Após seco, o extrato foi pesado até peso constante.

#### **b) Extração à quente em aparelho de Soxhlet**

Cerca de 10g dos frutos (secos e moídos), foram colocados em um cartucho acondicionado em um aparelho de Soxhlet e extraídos com 300ml de metanol (contidos em um balão de 500ml). A extração prosseguiu durante 4 horas. O extrato obtido foi concentrado nas mesmas condições anteriores. Após seco, o extrato foi pesado até peso constante.

#### **c) Extração por ultrassom**

Cerca de 10g dos frutos (secos e moídos) foram extraídos por ultrassom, conforme já descrito no item **3.4.1**, com 300ml de metanol durante 75 minutos (três ciclos de 25 minutos com troca de solvente a cada ciclo). Após evaporação do solvente o extrato foi pesado até peso constante.

#### **3.6.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos frutos de *Genipa americana* obtidos por técnicas de extração diferentes**

As atividades antioxidantes dos extratos metanólicos dos frutos de *G. americana*, obtidos por técnicas de extração descritas no item **3.6**, foram analisadas pelo método de seqüestro de radicais, conforme a metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001), com algumas modificações.

Foram feitas soluções estoque dos extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom (item 3.6) e do extrato de *Ginkgo biloba* em metanol a 1,0mg/ml para posteriores diluições.

As amostras foram diluídas a concentrações finais de 500; 250; 125; 50; 25; 10; 5; 2,5 e 0,5µg/ml em metanol, partindo-se da solução estoque a 1,0mg/ml. Foi adicionado 1,0ml de DPPH 0,1mM em metanol a 2,5ml de solução de amostra **(A)**. As reações transcorreram à temperatura ambiente e no escuro, por 60 minutos. A seguir foram feitas as leituras das absorvâncias, a 518nm. Metanol (1,0ml) mais 2,5ml de solução-amostra foi usado como branco **(B)**. A solução de DPPH (1,0ml; 0,1mM) mais metanol (2,5ml) foi usada como controle **(C)**. Os valores de absorvância foram convertidos em atividade antioxidante percentual (AA%) usando a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(ABS_A - ABS_B) \times 100]}{ABS_C} \right\}$$

Como padrão de atividade antioxidante foi usado extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761), utilizando os mesmos procedimentos de diluições seriadas executados com as amostras provenientes dos extratos. Todas as leituras foram feitas em triplicatas.

Para avaliação qualitativa da atividade antioxidante, os extratos metanólicos obtidos pelas três técnicas e o padrão rotina foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), em duplicata, utilizando como fase móvel clorofórmio/metanol (4:3). As cromatoplasmas foram visualizadas no UV e posteriormente borrifadas com solução de DPPH 0,3mM em metanol e anisaldeído sulfúrico. As placas reveladas com DPPH foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração violeta, indicativo de possível atividade antioxidante.

### 3.6.2 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

Os extratos metanólicos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom foram analisados pelo método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (ANDRADE *et al.*, 2007), com algumas modificações, para determinação do conteúdo de fenóis totais. O ácido gálico foi usado para elaboração da curva de concentração padrão. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com o ácido gálico e expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de extrato).

Foram preparadas, separadamente, soluções estoques de cada extrato metanólico, bem como de ácido gálico, em água destilada, na concentração de 1,0mg/ml para diluições posteriores. A partir da solução-estoque de ácido gálico, foram realizadas diluições obtendo-se soluções com concentrações finais de 12,5; 10; 7,5; 5 e 2,5µg/ml em água destilada.

A partir de solução estoque da amostra foram preparadas soluções de concentração final de 750; 500; 250 e 125µg/ml em água destilada. A 1,0ml de cada amostra foi adicionado 1,0ml do reagente de Folin-Ciocalteu 2N e 2,0ml de água e, após um período de 2 a 5 minutos, foi acrescentado 1,0ml de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 10%, sob agitação. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 760nm, usando água destilada como branco. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

Os extratos metanólicos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) usando rutina como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas em clorofórmio/metanol (4:3) e, após secagem, nebulizadas com solução de carbonato de sódio 10%. Novamente, após secagem, as placas foram nebulizadas

com solução de Folin-Ciocalteu 10% em água destilada, e observadas até o aparecimento de manchas azuis, indicativo da presença de compostos fenólicos.

### **3.6.3 Perfil cromatográfico por CCD e CLAE dos extratos metanólicos obtidos por técnicas de extração diferentes**

Os extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom (item 3.6) foram, previamente, avaliados qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD). A placa foi eluída em clorofórmio/metanol (4:3) e, após secagem, revelada com anisaldeído sulfúrico.

Posteriormente, os três extratos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel utilizada para os procedimentos analíticos foi constituída de uma mistura de acetonitrila e água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) pH 3,0 (15:85), fluxo de 1ml/min. e detecção por absorção no UV em 240nm. A concentração dos extratos injetados foi de 50mg/ml solubilizados em uma mistura de metanol/água (1:1).

A genipina, utilizada como padrão na concentração de 0,25mg/ml, foi solubilizada em mistura de metanol/água (1:1) e injetada no cromatógrafo nas mesmas condições anteriores. Este padrão absorve no UV por volta de 240nm (DJERASSI *et al.*, 1960).

Para a detecção de genipina em *G. americana*, foram utilizados frutos verdes triturados em liquidificador, com água. O suco assim obtido, foi liofilizado e mantido ao abrigo da luz e umidade até o momento do uso. Para análise cromatográfica foram utilizados 50mg do liofilizado ressuspensos em 1ml da mistura MeOH/água 1:1. Esta mistura foi mantida sob agitação por trinta minutos e posteriormente filtrada e analisada por CLAE.

### 3.7 Óleo essencial do fruto de *Genipa americana*

#### 3.7.1 Obtenção e análise química da fração volátil do jenipapo

Os frutos frescos (200g), maduros, sem sementes e picados de *G. americana*, coletados em fevereiro de 2006, 2007 e 2008 foram submetidos, separadamente, à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, por um período de duas horas.

Antes do primeiro refluxo foram coletados 20ml do líquido condensado e mantidos sob refrigeração até o final da extração, quando foram coletados mais 20ml. Após reunião das amostras e partição com diclorometano obteve-se a fração volátil. Os óleos obtidos, de coloração amarela e odor forte e característico (Figura 12), foram analisados por CG/EM.



Figura 12 - Óleo essencial de jenipapo.

A identificação das substâncias foi realizada com base nos perfis de fragmentação dos espectros de massas obtidos, com auxílio dos índices de Kovats e por comparação dos espectros de massas da biblioteca eletrônica (NIST107, NIST21 e NIST05), além de dados da literatura (ADAMS, 1995).

#### 3.7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo

A avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial do jenipapo foi realizada no Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG), Centro de

Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a supervisão do Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana 1,8kg de frutos frescos, maduros, sem sementes e picados de *G. americana* L. foram submetidos à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por duas horas (totalizando nove extrações utilizando 200g do fruto em cada uma delas) fornecendo 579,2mg (0,03% de rendimento).

### **3.7.2.1 Preparo da emulsão do óleo essencial de *Genipa americana***

Em um microtubo estéril adicionou-se 160µl do óleo de jenipapo, 160µl de Tween 80 e 1280µl de caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth, Merck) homogeneizando-se em seguida com um bastão estéril.

### **3.7.2.2 Microrganismos indicadores**

#### **a) Bactérias**

Foi avaliado um conjunto de cepas padrão de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, procedentes da ATCC (American Type Culture Collection), e cepas isoladas de pacientes hospitalizados.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

- *Staphylococcus aureus* MRSA 93

- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

- *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE) 782

- *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 betalactamase de espectro estendido

(ESBL<sup>+</sup>)

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

As cepas clínicas foram isoladas de pacientes hospitalizados e selecionadas devido às suas características de resistência múltipla a antimicrobianos.

b) Leveduras

Para o teste foi utilizada amostra padrão de *Candida albicans* ATCC 10231.

### **3.7.2.3 Método da difusão em ágar – técnica do disco**

a) Preparação do inóculo:

A partir de suspensões densas das amostras, estocadas a -20°C em caldo BHI adicionado de 20% de glicerol, foram preparadas culturas recentes (18-24h) de cada microrganismo, em placas contendo ágar-sangue (base de ágar caseína soja, procedência Merck, adicionada de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, usada como meio de cultura). Em seguida uma suspensão foi preparada em 3ml de caldo BHI até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland [ $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) para bactérias e  $1 \times 10^6$  UFC/ml para leveduras] (NCCLS, 2003).

b) Teste:

O inóculo padronizado foi semeado com auxílio de swab esterilizado em placa de Petri contendo ágar caseína soja. Discos de papel de filtro, secos, esterilizados por radiação gama, medindo seis milímetros de diâmetro (Cecon Ltda) foram adicionados com uma pinça estéril e imediatamente impregnados com 10µl da emulsão do óleo de jenipapo (item **3.7.2.1**).

Discos de cloranfenicol (30µg, Bio-Rad) e ceftriaxona (30µg, Bio-Rad) e foram usados como controles positivos para bactérias e fluconazol (25µg, Cecon) para levedura.

Para descartar a possível influência do Tween 80 sobre o crescimento dos microrganismos, discos impregnados com 10µl da mistura apenas do caldo BHI mais Tween 80 foram também testados.

As placas foram incubadas em estufa a 36°C, durante 24 horas. No final deste período o diâmetro dos halos de inibição do crescimento foi medido, em milímetros, utilizando-se régua milimetrada. Este ensaio foi feito em duplicata.

#### **3.7.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pelo método de microdiluição em caldo**

##### **a) Preparação do inóculo microbiano**

O inóculo padronizado foi preparado nas mesmas condições descritas para o teste de difusão (item 3.7.2.3) e a seguir diluído 1:100 em caldo BHI para se obter uma concentração de aproximadamente  $10^6$  UFC/ml, exceto para *Candida albicans*, cujo inóculo foi utilizado sem diluição.

##### **b) Procedimento experimental**

Utilizou-se microplacas esterilizadas que possuem 96 poços de fundo redondo (12 colunas e 8 fileiras). No primeiro orifício de cada fileira da placa colocou-se 100µl da emulsão do óleo. Do segundo orifício ao décimo segundo foram colocados 50µl do caldo BHI, exceto para décimo primeiro orifício onde foram colocados 100µl do meio diluente (controle de esterilidade do caldo BHI). A partir do primeiro orifício até o nono foram realizadas diluições seriadas, onde 50µl eram transferidos de um orifício para o outro, tendo como concentração final do óleo do primeiro orifício ao nono os seguintes valores em µg/ml: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2. Os 50µl retirados do nono orifício foram colocados no décimo orifício para controle da esterilidade da emulsão. No décimo segundo orifício foi realizado o controle do crescimento do inóculo (Figura 13). Em uma outra placa foi colocado

num orifício o caldo BHI, Tween 80 e o inóculo para controle da possível ação inibitória do Tween 80 sobre os microrganismos.

Após todas as diluições, 50µl do inóculo foram adicionados a todos os poços, exceto no décimo e no décimo primeiro. A concentração final dos microrganismos foi de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

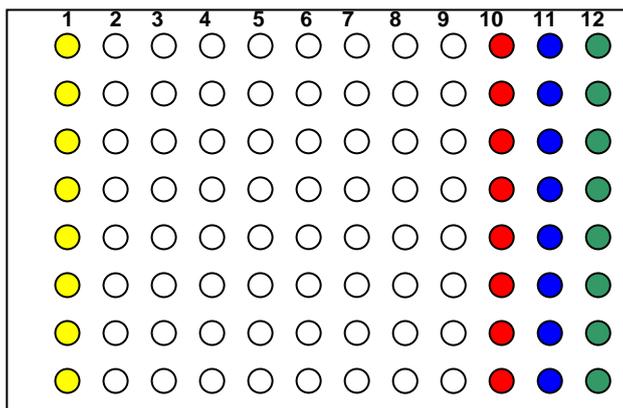


Figura 13 - Círculo amarelo (100µl de emulsão do óleo), círculo vermelho (controle da esterilidade da emulsão), círculo azul (controle da esterilidade do caldo BHI), círculo verde (controle do crescimento do inóculo em caldo BHI).

As microplacas foram incubadas a 36°C/24h em câmara úmida para evitar ressecamento e, a seguir, examinadas com luz transmitida. A menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento do microrganismo, sob análise visual, foi considerada como a CMI. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Os antimicrobianos de referência (cloranfenicol, ceftriaxona e fluconazol) foram preparados em caldo BHI mais Tween 80 e testados nas mesmas condições, como controles positivos.

### 3.7.2.5 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

Após a leitura da CMI, uma alíquota de 10µl foi retirada dos orifícios correspondentes a 1x subCMI, CMI, 1x CMI e 2x CMI. Essas alíquotas foram diluídas seriadamente e cada diluição inoculada na superfície do ágar caseína soja.

Após 24h de incubação a 36°C definiu-se a concentração mínima bactericida como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte de 99,9% das células microbianas em relação ao inóculo inicial. Este ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.7.3 Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de jenipapo

A atividade antioxidante do óleo essencial de jenipapo foi avaliada pelo método de seqüestro de radicais, utilizando o radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), conforme a metodologia descrita por Lopes-Lutz *et al.* (2008), com algumas modificações. Um mililitro de uma solução 0,3mM de DPPH<sup>•</sup> (Sigma-Aldrich) em metanol foi adicionado a 2,5ml da solução de óleo essencial em metanol (1,0mg/ml). Após incubação por 60 minutos no escuro em temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 517nm. Metanol (1,0ml) mais 2,5ml de solução do óleo foi usado como branco (**B**). A solução de DPPH<sup>•</sup> (1,0ml; 0,3mM) mais metanol (2,5ml) foi usada como controle (**C**). Os valores de absorvância foram convertidos em atividade antioxidante percentual (AA%) usando a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(ABS_A - ABS_B) \times 100]}{ABS_C} \right\}$$

A atividade antioxidante do óleo essencial de *G. americana* foi comparada com a atividade do padrão antioxidante comercial butil-hidróxi-tolueno (BHT, Sigma-Aldrich) em uma concentração de 1,0mg/ml. Metanol foi usado para calibrar o espectrofotômetro. O ensaio foi feito em triplicata e a média dos resultados e o desvio padrão foram calculados.

A mesma metodologia foi realizada com uma solução de 0,1mM de DPPH<sup>\*</sup> em metanol para comparação da atividade antioxidante do óleo essencial usando reagentes em concentrações diferentes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Abordagem etnofarmacológica da planta

Foi realizado um levantamento bibliográfico para verificar o uso popular de partes de *G. americana* e resultados encontram-se listados na Tabela 2, abaixo.

Tabela 2 - Uso popular de partes da planta *G. americana*.

Parte da Planta	Uso popular	Referências
Casca	antiulcerogênica, antidiarréica, catártica e tratamento de faringites	Mors <i>et al.</i> ,2000.
	quando cortada, exsuda uma goma branca e doce que após ser diluída em água é aplicada nos olhos para tratar a opacidade da córnea	Cravo <i>et al.</i> ,1995.
Raízes	purgativas e antigonorréicas	Cruz <i>et al.</i> ,1995; Mors <i>et al.</i> ,2000.
	usada em curativos para curar feridas de diferentes origens e faringite	Mors <i>et al.</i> ,2000.
Folhas (decocção)	antidiarréicas e anti-sifilíticas	Mors <i>et al.</i> ,2000.
Folhas (macerado)	tratamento de febres (tribos nativas)	Delprete <i>et al.</i> , 2005.
Fruto (polpa madura)	antiasmático, afrodisíaco, antianêmico, tônico, diurético, útil nas afecções do baço, fígado e icterícia, feridas externas e faringite (fruto fresco e macerado)	Delprete <i>et al.</i> , 2005; Mors <i>et al.</i> ,2000.
Fruto (polpa verde)	anti-sifilítica	Mors <i>et al.</i> ,2000.
	curar a ruptura do umbigo dos recém-nascidos	Mors <i>et al.</i> ,2000.

## **4.2 Planejamento e otimização para extração dos frutos de *G. americana***

O extrato metanólico foi obtido utilizando-se extração por ultrassom. Para tal experimento, em função do número de variáveis e visando a otimização dos parâmetros do processo foram realizados dois tipos de planejamento: univariado e multivariado, objetivando verificar as condições para se obter o máximo de rendimento dos extratos metanólicos. O método univariado, apesar de suas inconveniências, ou seja, não avaliar simultaneamente as interações de todas as variáveis, foi utilizado de forma a se comparar as duas metodologias, visto que esse ainda é um procedimento comum nos laboratórios de química. No método univariado, fixam-se todos os fatores (variáveis) que estão sendo avaliados em um certo nível (valor dos fatores que produzirão o melhor resultado), exceto um deles. O resultado desta análise indica qual o nível desse fator que produziu o melhor rendimento. Em uma próxima etapa este fator é fixado, e varia-se o nível de outro fator (que tinha sido fixado), e assim o processo se repete até que todos os fatores tenham sido investigados para fornecer a melhor resposta (BARROS NETO *et al.*, 2007). Conforme será descrito mais adiante, este procedimento não é adequado por gerar resultados falsos.

Os resultados obtidos para a otimização da extração dos frutos por ultrassom, empregando-se o método univariado encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz do planejamento do processo univariado no processo de otimização da extração dos frutos de *G. americana* por ultrassom.

EXPERIMENTOS	AMOSTRA (g)	TEMPO DE EXTRAÇÃO (min.)	VOLUME DE SOLVENTE (ml)	RENDIMENTO (%)
1	10	5 (1 ciclo)	40	15,10
2	10	10 (1 ciclo)	40	19,23
3	10	15 (1 ciclo)	40	24,08
4	10	20 (1 ciclo)	40	25,05
5	10	25 (1 ciclo)	40	26,80
6	10	25 (1 ciclo)	20	8,76
7	10	25 (1 ciclo)	40	22,86
8	10	25 (1 ciclo)	60	28,71
9	10	25 (1 ciclo)	80	32,60
10	10	25 (1 ciclo)	100	33,81
11	10	25 (1 ciclo)	100	32,65
12	10	50 (2 ciclos de 25 min.)	200 (2 x 100)	43,46
13	10	75 (3 ciclos de 25 min.)	300 (3 x 100)	50,85
14	10	100 (4 ciclos de 25 min.)	400 (4 x 100)	54,86
15	10	125 (5 ciclos de 25 min.)	500 (5 x 100)	54,45

Uma melhor compreensão destes resultados pode ser obtida através da análise dos resultados por meio de gráficos. Na Figura 14, que representa o primeiro fator analisado no processo de otimização (tempo de extração), o tempo de 25 minutos apresentou bom rendimento, sendo este o escolhido para a continuidade no processo de extração.

A influência do volume do solvente na extração dos frutos foi a segunda variável avaliada (Figura 15). Os resultados indicam que um aumento da eficiência da extração pode ser observado com o aumento do volume do solvente. Volumes grandes de solvente podem dissolver constituintes mais eficientemente levando a uma melhoria do rendimento da extração. Assim, o volume de solvente escolhido foi o de 100ml.

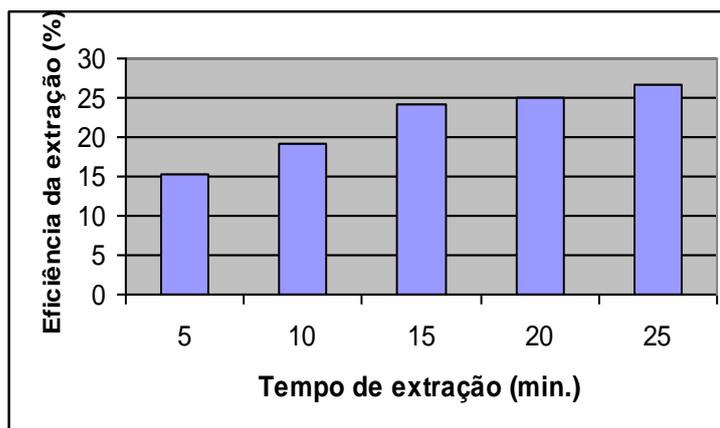


Figura 14 - Influência do tempo de extração na eficiência da extração dos frutos secos de *G. americana*. Amostra: 10g; volume de solvente: 40ml, com apenas um ciclo em cada tempo.

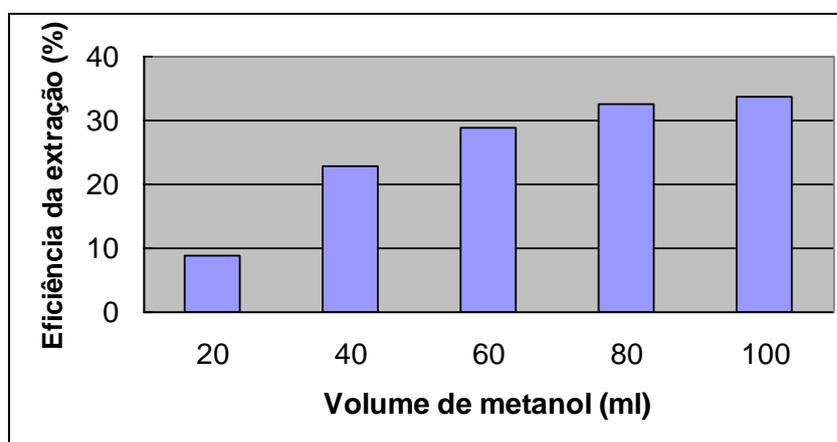


Figura 15 - Influência do volume de solvente na eficiência da extração dos frutos secos de *Genipa americana*. Amostra: 10g; tempo de extração: 25 minutos.

O último fator do processo a ser avaliado foi o número de ciclos. Conforme pode ser observado na Figura 16, o tempo de extração bom foi o de 100 minutos (4 ciclos de 25 min.).

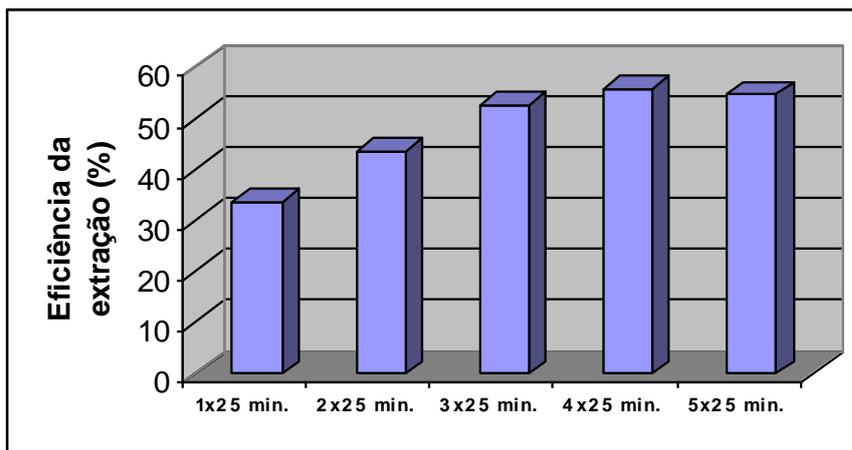


Figura 16 - Influência do número de ciclos na eficiência da extração dos frutos secos de *Genipa americana*. Amostra: 10g; volume de solvente: 100ml em cada ciclo de 25 minutos.

Um ponto a ser observado no gráfico (Figura 16) é com relação ao tempo de 125 minutos (5 ciclos de 25 min., 54,86%), que ao ser comparado com 100 minutos de extração (4 ciclos de 25 min., 54,45%), mostra uma pequena queda no rendimento, conforme pode ser observado na Tabela 3 (página 47). Seria interessante o prosseguimento dos experimentos utilizando-se volumes e tempos maiores com o intuito de se confirmar a queda no rendimento. Esta não linearidade foi também observada por Melecchi *et al.* (2006), ao otimizarem a extração das flores de *Hibiscus tiliaceus* L. por ultrassom. Os pesquisadores avaliaram o rendimento obtido com tempos de extração variando de 60-340 minutos. Os resultados para 300 minutos e 340 minutos foram 17,10% e 14,60%, respectivamente. Segundo os autores esta queda no rendimento poderia ser explicada pela formação de artefatos oriundos da degradação de componentes orgânicos em longos períodos de extração. Contudo, esta argumentação é questionável e merece maiores investigações.

O método univariado, utilizado a princípio, não se mostrou adequado para o processo de otimização na extração dos frutos do jenipapo. Como já mencionado

anteriormente, deve-se considerar que as variáveis podem influenciar-se mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. No método univariado as eventuais interações dos fatores não são consideradas e raras são as situações em que dois ou mais fatores atuam de forma realmente independente (BARROS NETO *et al.*, 2007).

Deste modo, ao se optar pelo método univariado para a escolha da melhor condição de extração, ocasionou-se a utilização de um volume grande de solvente, o que, talvez, poderia ter sido evitado através de um planejamento do processo por um método multivariado. A partir deste ponto, optou-se pelo método do planejamento composto central, que será discutido a seguir.

### **4.3 Planejamento composto central e análise da superfície de resposta**

Como o modelo linear não se mostrou adequado, pois inicialmente os rendimentos aumentam, mas depois começam a diminuir, um outro modelo foi proposto. Neste novo planejamento utilizou-se um modelo quadrático, mais especificamente um planejamento composto central, onde existem ensaios repetidos no ponto central, conforme pode ser observado na Tabela 4, a seguir, nos ensaios de 15 a 19. As repetições no ponto central têm duas finalidades: fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista. É um planejamento em que as variáveis de interesse, que apresentam influências significativas no resultado do experimento, são avaliadas ao mesmo tempo. Tem como vantagem a realização de poucos experimentos e assim, levando a um menor custo experimental. Neste tipo de planejamento é comum que se codifiquem os níveis das variáveis como -1, 0 e 1, respectivamente para o valor inferior, central e superior. São planejamentos simples de executar, que depois podem ser ampliados

para formar um planejamento mais sofisticado, se a intenção é conhecer melhor a relação entre a resposta e os fatores importantes (BARROS NETO *et al.*, 2007).

A Tabela 4 apresenta os resultados (valores dos rendimentos em %) encontrados para cada experimento e as unidades codificadas que podem ser transformadas com as informações no topo da tabela.

Tabela 4 - Resultados experimentais para rendimentos (%) para as combinações dos níveis dos fatores do planejamento composto central.

Fatores		-	+		
1. (Massa)		1,0g	5,0g		
2. (Volume)		10ml	50ml		
3. (Tempo)		25min.	75min.		
Experimentos	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Rendimento (%)	
1	-1	-1	-1	33.01	
2	1	-1	-1	29.39	
3	-1	1	-1	36.61	
4	1	1	-1	32.64	
5	-1	-1	1	33.20	
6	1	-1	1	29.95	
7	-1	1	1	38.35	
8	1	1	1	36.10	
9	-1	0	0	38.96	
10	1	0	0	34.87	
11	0	-1	0	32.41	
12	0	1	0	37.95	
13	0	0	-1	37.71	
14	0	0	1	38.27	
15	0	0	0	34.31	
16	0	0	0	34.18	
17	0	0	0	36.15	
18	0	0	0	36.26	
19	0	0	0	35.09	

Os dados e as análises feitas contaram com a colaboração do Prof. Dr. Roy Edwards Bruns do Instituto de Química da UNICAMP.

A Tabela 5 contém os resultados de ANOVA para os dados analisados. Não se verificou falta de ajuste significativo no nível de confiança de 95%.

A interpretação dos efeitos dos fatores sobre o rendimento foi feita considerando somente os termos estatisticamente significantes. Em primeiro lugar, não existem termos estatisticamente significativos envolvendo o fator  $X_3$ , (tempo) na equação do modelo. Como tal, os resultados da Tabela 5 podem ser interpretados independentes do nível do fator (tempo).

Tabela 5 - Resultados ANOVA para o modelo quadrático para o rendimento como uma função dos níveis dos fatores codificados da massa, volume e tempo.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de grau de liberdade	Média quadrática	Valor teste F
Regressão	117,8474	9	13,0942	5,8569
Resíduos	20,1211	9	2,2357	
Falta de ajuste	16,2504	5	3,2501	3,3587
Erro puro	3,8707	4	0,9677	
Total	137,9684	18		
% de variação explicada = 85,4%; % máxima de variação explicável = 97,2%				

A análise estatística dos resultados mostrou que aumentando a massa de um para 5g há redução do rendimento de cerca de 3,44%. Por outro lado, um aumento no volume de 10 para 50ml tende a aumentar o rendimento de 4,7%. Assim, o gráfico da superfície de resposta mostra uma efeito quadrático, apresentando uma curvatura negativa dependente das mudanças do volume.

A resultante dessas contribuições individuais devido às mudanças dos fatores sobre o rendimento pode ser visto no gráfico da superfície de resposta na Figura 17. A máxima no rendimento é visto como sendo previsível na região superior da superfície da resposta. A análise da superfície de resposta indicou que a região ótima para se obter o melhor rendimento encontra-se em torno dos pontos para os experimentos 7 e 9 da Tabela 4. Um experimento de confirmação foi feito nas

condições de 1g e 40ml de metanol (tempo de 25 minutos) e um rendimento de 35,71% foi obtido. Este resultado está dentro do intervalo de 95% de confiança desta previsão que é de 34,32% a 41,38%.

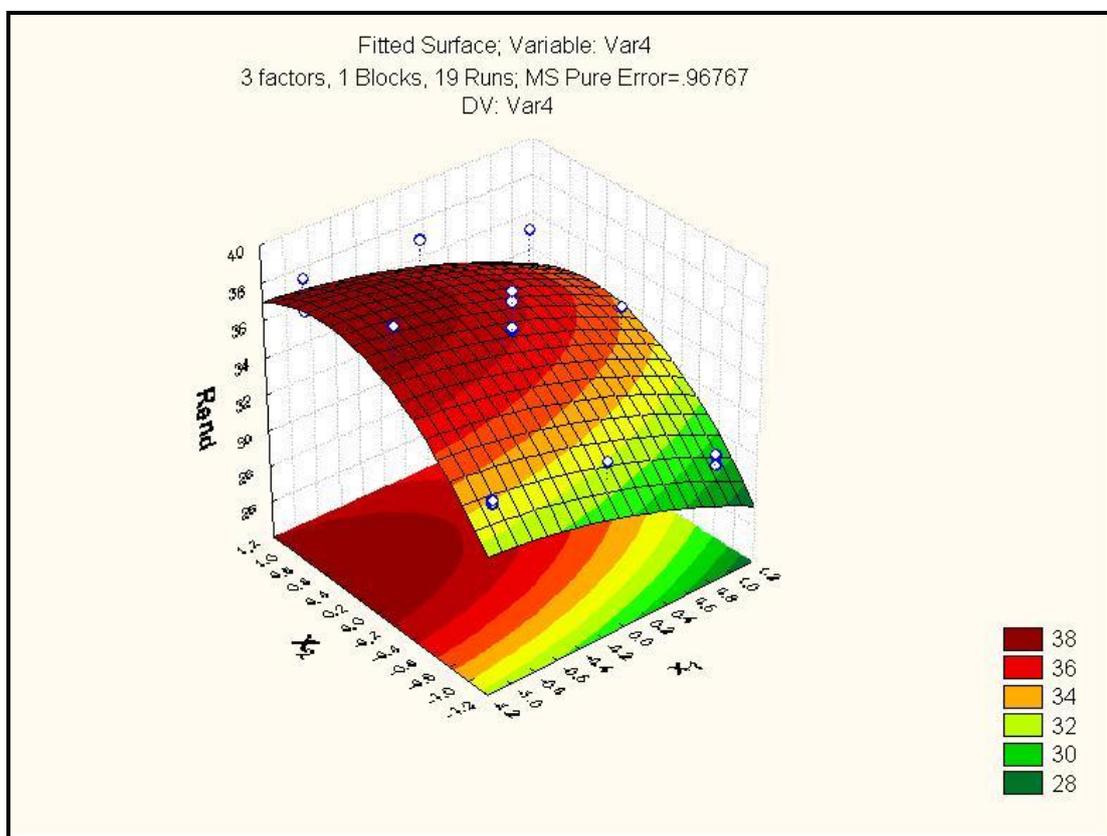


Figura 17 - Modelo gráfico de superfície de resposta para o modelo quadrático ( $X_1$ = massa e  $X_2$ = número de ciclos de extração).

Ao contrário do modelo univariado, onde é freqüente se obter um falso ótimo, no processamento multivariado, é possível, com um número menor de experimentos chegar às melhores condições para que se possa obter os melhores rendimentos, com maior segurança.

#### 4.4 Comparação da técnica de extração por ultrassom com técnicas convencionais

Considerando-se, que as condições obtidas inicialmente pelo método univariado seriam adequadas para a extração dos frutos maduros por ultrassom,

foram selecionados como parâmetros: 10g de amostra, 100ml de metanol e três ciclos de 25 minutos. Estes fatores foram utilizados para comparação desta técnica de extração com outras convencionais, como maceração e extração por Soxhlet.

Como pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 6), utilizando-se a mesma quantidade de amostra (10g) e volume de solvente (300ml), a técnica por Soxhlet apresentou melhor rendimento: 51,12%, ou seja, 10,36% a mais do que por ultrassom e 8,49% a mais do que por maceração. A extração por ultrassom apresentou rendimento menor, entretanto, o período de tempo e a temperatura foram menores (75 minutos e 26-32<sup>o</sup>C) evitando a possível decomposição de componentes presentes no extrato, quando comparado com a extração por Soxhlet que levou quatro horas e com temperatura próxima à do ponto de ebulição do metanol (64,5<sup>o</sup>C). Além disso, a diferença no rendimento entre as duas técnicas foi pequena (51,12% para Soxhlet e 46,32% para ultrassom). A extração por maceração, que apresentou um rendimento de 47,12%, ou seja, 1,73% a mais do que por ultrassom, apesar de ser realizada à temperatura ambiente, apresenta como desvantagem a utilização de longos períodos de extração e gastos elevados de solvente.

Tabela 6 - Condições e rendimentos (%) da extração dos frutos de *G. americana* em metanol, por maceração, Soxhlet e ultrassom.

Técnica de extração	Amostra (g)	Volume de solvente (ml)	Tempo	Rendimento	Média ± dp *
Maceração	10,0032	300	6 dias	49,41%	47,12 ± 1,99
Maceração	10,0104	300	6 dias	46,05%	
Maceração	10,0258	300	6 dias	45,89%	
Soxhlet	10,0110	300	4 horas	56,30%	51,12 ± 4,61
Soxhlet	10,0418	300	4 horas	49,56%	
Soxhlet	10,0110	300	4 horas	47,49%	
Ultrassom	10,2281	300	75 min.	54,95%	46,32 ± 7,53
Ultrassom	10,0938	300	75 min.	42,97%	
Ultrassom	10,2281	300	75 min.	41,05%	

\* Média e desvio padrão da média do rendimento (%) de três experimentos para cada técnica.

A figura a seguir, mostra uma representação gráfica dos dados anteriores (Figura 18).

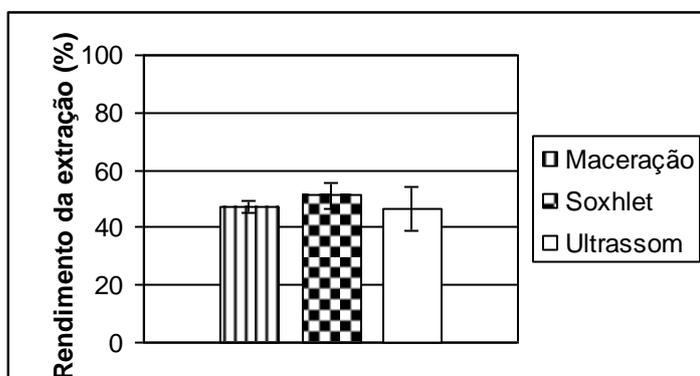


Figura 18 - Representação gráfica comparando os rendimentos nos três tipos de extração.

#### 4.4.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos frutos de *Genipa americana* obtidos por técnicas de extração diferentes

Os extratos metanólicos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom foram analisados quantitativamente pelo método do DPPH<sup>•</sup>, descrito na seção 3.6.1.

Este método mede a capacidade de uma substância potencialmente antioxidante de seqüestrar o radical livre DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) que, em solução, apresenta coloração violeta característica e absorve no visível – 518 nm. À solução do reagente é adicionada uma solução do extrato vegetal em metanol, em diversas concentrações. Quando o radical estável é seqüestrado pelo antioxidante ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>), a solução sofre descoloração. Substâncias antioxidantes presentes no extrato doam um hidrogênio radical à estrutura do DPPH<sup>•</sup> (Figura 19), reduzindo-a e formando difenil-picril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção. A atividade é avaliada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância, sendo esta proporcional à concentração de substâncias antioxidantes presentes na amostra (BRAND-

WILLIAMS *et al.*, 1995; BONDET *et al.*, 1997; YAMAGUCHI *et al.*, 1998; LIM *et al.*, 2007).

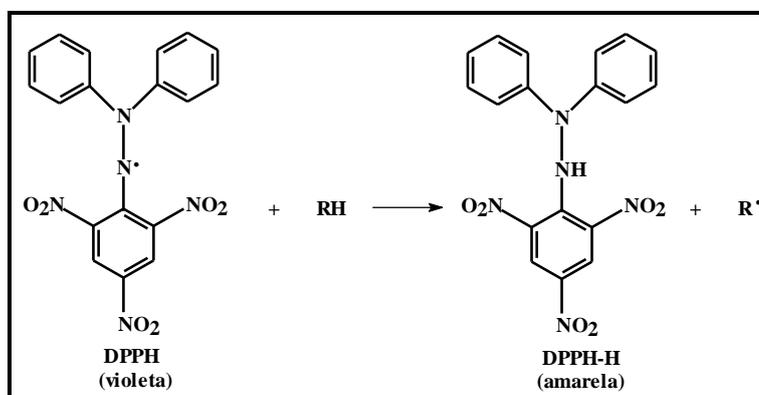


Figura 19 - Esquema do seqüestro do radical estável DPPH<sup>•</sup> por um antioxidante (RH) (YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

Foi utilizado como padrão solução metanólica de extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761).

Na Tabela 7 encontram-se os valores de atividade antioxidante (%) obtidos para cada concentração testada, dos diferentes extratos e padrão. A porcentagem de atividade antioxidante (%) corresponde à quantidade de DPPH<sup>•</sup> consumida pelo antioxidante, e os valores de CE<sub>50</sub> correspondem à concentração necessária para se obter metade do efeito máximo estimado em 100% para os extratos metanólicos e o padrão. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Tabela 7 - Valores de atividade antioxidante (AA%) e  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) para os extratos metanólicos e para o padrão *Ginkgo biloba* testados com DPPH $^{\bullet}$ .

Maceração		Soxhlet		Ultrassom		<i>Ginkgo biloba</i>	
Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	AA% (Média $\pm$ dp)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	AA% (Média $\pm$ dp)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	AA% (Média $\pm$ dp)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	AA% (Média $\pm$ dp)
0,5	4,86 $\pm$ 0,77	0,5	2,65 $\pm$ 0,45	0,5	5,75 $\pm$ 0,44	0,5	10,77 $\pm$ 1,35
2,5	7,37 $\pm$ 0,67	2,5	2,80 $\pm$ 0,26	2,5	6,49 $\pm$ 0,92	2,5	25,07 $\pm$ 1,12
5	7,96 $\pm$ 0,45	5	3,24 $\pm$ 0,68	5	9,29 $\pm$ 0,44	5	34,96 $\pm$ 1,17
10	8,41 $\pm$ 0,89	10	3,24 $\pm$ 1,11	10	12,39 $\pm$ 0,00	10	59,00 $\pm$ 1,68
25	13,57 $\pm$ 1,68	25	13,27 $\pm$ 0,77	25	17,85 $\pm$ 0,51	25	86,43 $\pm$ 0,25
50	20,06 $\pm$ 0,68	50	20,79 $\pm$ 0,77	50	24,34 $\pm$ 0,89	50	86,28 $\pm$ 0,44
125	36,87 $\pm$ 1,02	125	44,69 $\pm$ 0,44	125	43,21 $\pm$ 1,02	125	86,43 $\pm$ 0,25
250	57,96 $\pm$ 1,17	250	67,55 $\pm$ 1,68	250	58,41 $\pm$ 0,89	250	87,76 $\pm$ 1,28
500	88,67 $\pm$ 1,31	500	86,04 $\pm$ 0,75	500	89,00 $\pm$ 0,28	-	-
1000	91,62 $\pm$ 0,50	1000	91,30 $\pm$ 0,75	1000	94,42 $\pm$ 0,57	-	-
* $CE_{50}$	162,1 $\pm$ 3,81	* $CE_{50}$	140,5 $\pm$ 2,45	* $CE_{50}$	135,4 $\pm$ 1,36	* $CE_{50}$	6,25 $\pm$ 0,09

\* $CE_{50}$  = concentração suficiente para se obter metade do efeito máximo estimado em 100% (média $\pm$ erro padrão); AA%= média e desvio padrão da média para 3 leituras de atividade antioxidante.

A Figura 20 mostra a relação entre atividade antioxidante (AA%) e  $\ln$  da concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) para cada um dos extratos metanólicos e para o padrão *Ginkgo biloba*.

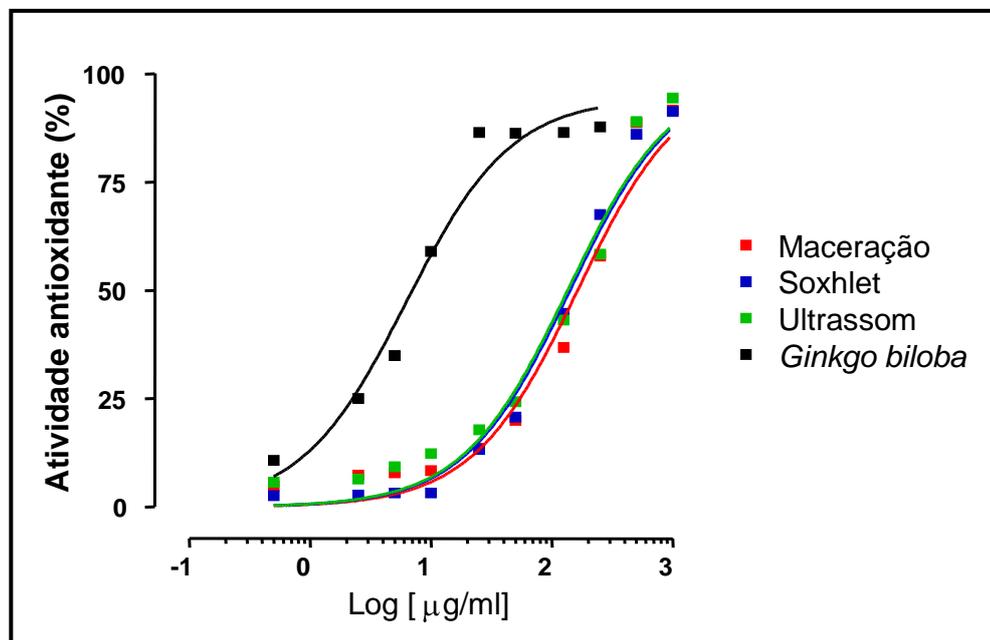


Figura 20 - Gráfico da relação entre atividade antioxidante (AA%) e  $\ln$  da concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) para cada um dos extratos metanólicos e para o padrão *Ginkgo biloba*.

Conforme pode ser observado na Tabela 7, os valores de  $CE_{50}$  encontrados para os extratos obtidos por maceração, Soxhlet, ultrassom e para o padrão *Ginkgo biloba* foram  $162,1 \pm 3,81$ ,  $140,5 \pm 2,45$ ,  $135,4 \pm 1,36$  e  $6,25 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Os extratos foram tão eficazes quanto o padrão *Ginkgo biloba*, ou seja, atingiram o mesmo percentual de atividade, porém menos potentes, pois foram necessárias concentrações maiores dos extratos de jenipapo para se atingir o efeito máximo, em relação ao *Ginkgo biloba*.

Quando comparados entre si, o extrato obtido por maceração mostrou ser menos potente do que aqueles obtidos por Soxhlet e por ultrassom, sendo que os últimos não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os valores de  $CE_{50}$  obtidos (Figura 21).

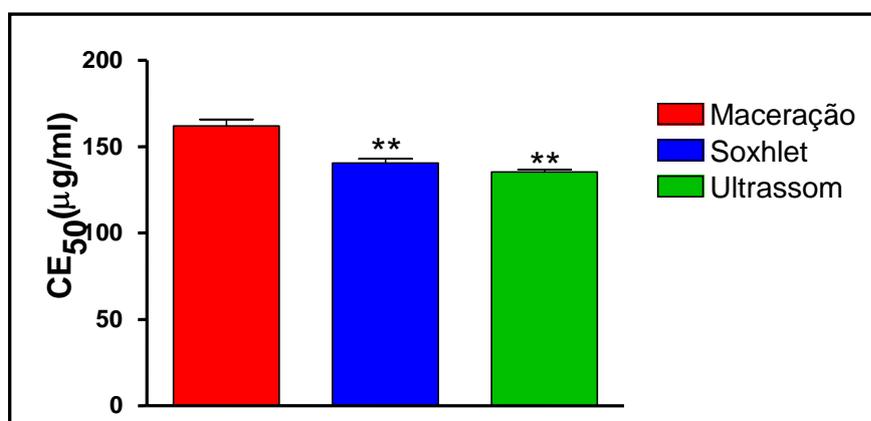


Figura 21 - Comparação entre os valores de  $CE_{50}$  para os extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. \*\*  $p < 0,01$  para Soxhlet e ultrassom quando comparados à maceração. Teste  $t$  de Student.

O teste de atividade antioxidante foi realizado também, em placas cromatográficas de gel de sílica e borrifadas com solução de DPPH $\cdot$  0,3mM (seção 3.6.1). A avaliação da cromatoplaça (Figura 22b) sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante, evidenciadas pela presença de manchas amarelas sobre fundo violeta, resultantes da redução do radical DPPH $\cdot$ .

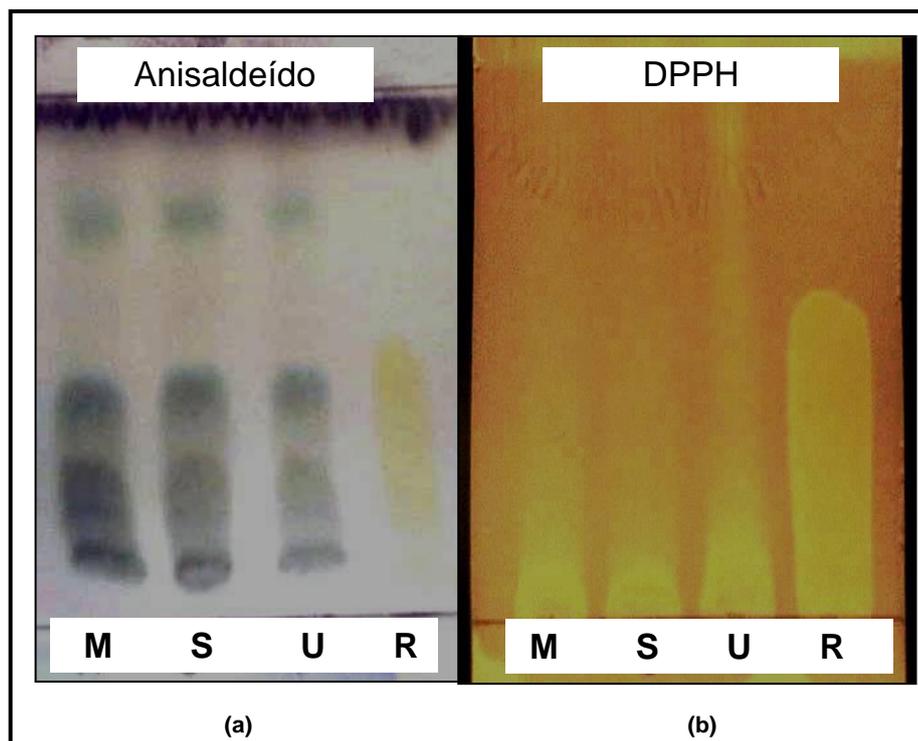


Figura 22 - Avaliação qualitativa da atividade antioxidante dos extratos metanólicos obtidos por maceração (M), Soxhlet (S) e ultrassom (U), usando rutina (R) como padrão. (a) Cromatoplate revelada com anisaldeído sulfúrico, (b) Cromatoplate revelada com DPPH 0,3mM.

#### 4.4.2 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos nos extratos metanólicos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotunguístico. Ao oxidar os compostos fenólicos, o reagente de Folin-Ciocalteu se reduz formando o complexo azul de molibdênio. As amostras aquosas são combinadas com o reagente e, após 3 a 5 minutos, o meio é alcalinizado com carbonato de sódio para o adequado desenvolvimento de cor, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ser de natureza fenólica (GENOVESE *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2007).

O teor de compostos fenólicos foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração do ácido gálico.

A curva padrão para o ácido gálico ( $y = 0,0367x - 0,0388$ , onde  $y$  representa a concentração do ácido gálico e  $x$  a absorvância a 760nm) apresentou o coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9938$  (Figura 23). Todas as leituras foram feitas em triplicata.

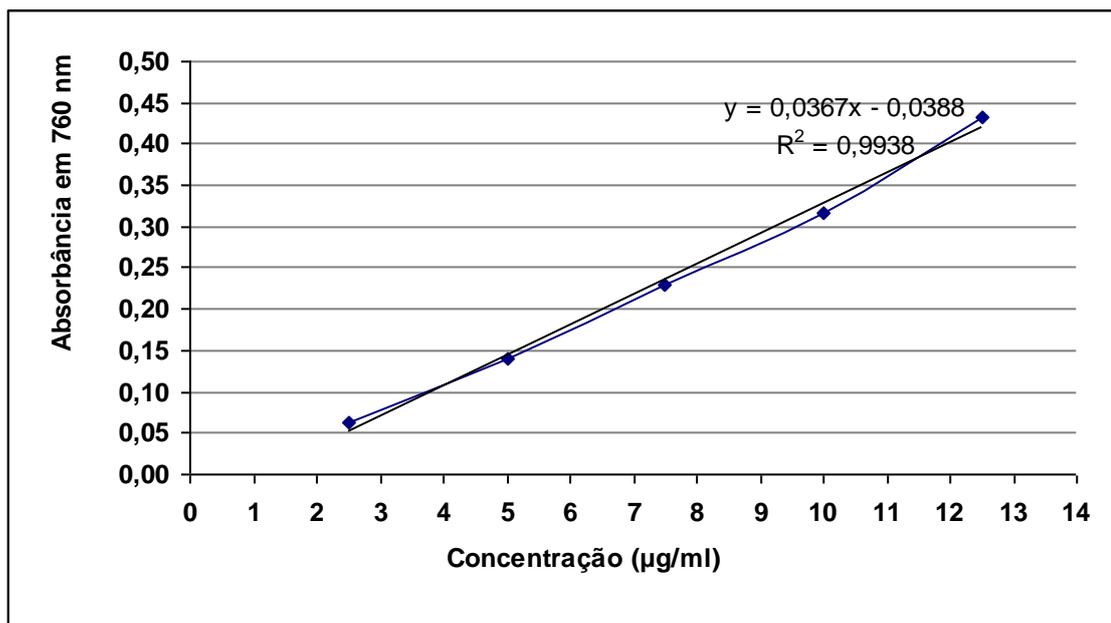


Figura 23 - Curva padrão do ácido gálico.

Os resultados obtidos na determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de extrato bruto) e são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Conteúdo de compostos fenólicos presentes nos extratos metanólicos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom.

Amostra	Conteúdo de fenóis totais (mg de ácido gálico/g de extrato)
Maceração	11,78±0,06
Soxhlet	12,41±0,09
Ultrassom	12,43±0,06

Valores expressos como média ± desvio padrão de três experimentos.

Conforme pode ser observado na Tabela 8, os valores encontrados para o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom foram 11,78; 12,41 e 12,43mg de ácido gálico/g de extrato, respectivamente.

Os compostos fenólicos encontrados nas plantas são conhecidos por possuírem atividade antioxidante devido principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química (SOUSA *et al.*, 2007; YESILYURT, 2008).

O baixo conteúdo destes compostos nos extratos poderia explicar uma atividade antioxidante baixa demonstrada pela atividade captadora de radical livre DPPH<sup>•</sup> que foi observada para os três extratos (item **4.4.1**).

Os extratos foram submetidos também a uma avaliação qualitativa por CCD usando rutina como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas em clorofórmio/metanol (4:3) e nebulizadas com solução de carbonato de sódio 10%. Após secagem, as placas foram nebulizadas com solução de Folin-Ciocalteu 10% em água destilada. A avaliação da cromatoplaça (Figura 24b) sugeriu a possível existência de componentes fenólicos nos extratos, evidenciados pela presença de manchas azuladas sobre fundo branco.

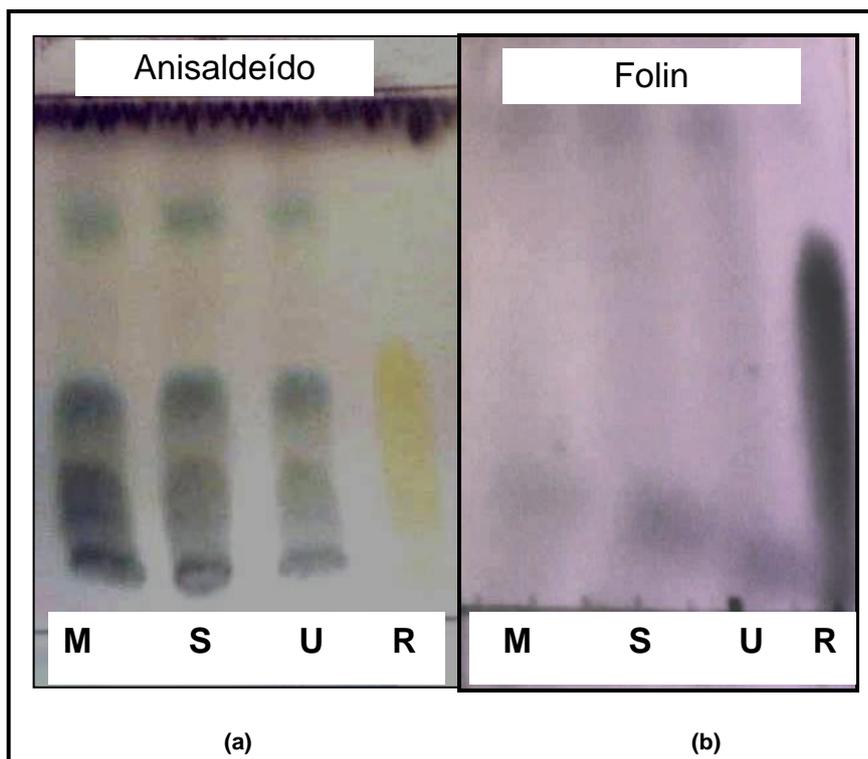


Figura 24 - Avaliação qualitativa da possível presença de componentes fenólicos nos extratos metanólicos obtidos por maceração (M), Soxhlet (S) e ultrassom (U), usando rutina (R) como padrão. (a) Cromatoplaça revelada com anisaldeído sulfúrico, (b) Cromatoplaça revelada com Folin-Ciocalteu 10%.

#### 4.4.3 Perfil cromatográfico por CCD e CLAE dos extratos metanólicos obtidos por técnicas de extração diferentes

Além da avaliação comparativa em termos do poder antioxidante e do conteúdo de fenóis totais para os extratos obtidos por maceração, Soxhlet e ultrassom, foi realizada também para as três amostras, uma análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector por UV com rede de diodos.

Os três extratos, quando analisados por CCD, apresentaram um padrão qualitativo semelhante, com o mesmo R<sub>f</sub> (fator de retenção) para as manchas desenvolvidas após revelação com anisaldeído sulfúrico, conforme pode ser observado na Figura 25, a seguir.

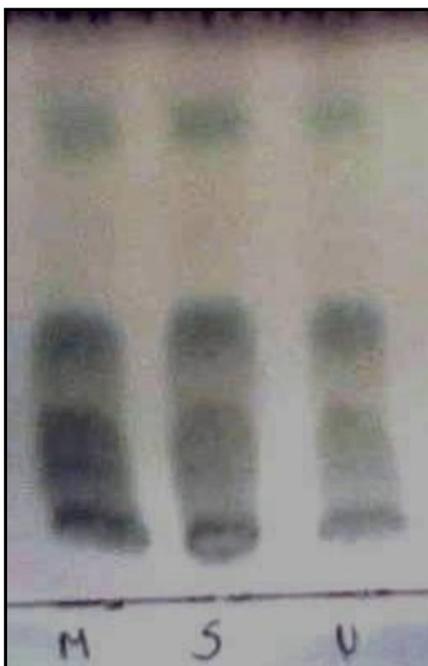


Figura 25 - Avaliação qualitativa por CCD revelada com anisaldeído sulfúrico dos extratos metanólicos obtidos por maceração (M), Soxhlet (S) e ultrassom (U).

Com o objetivo de se confirmar a possível semelhança química dos extratos obtidos pelas três técnicas, os mesmos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta por volta de 240nm. Este comprimento de onda foi escolhido porque a genipina e seu derivado glicosilado, denominado geniposídeo, estão presentes, respectivamente, nos frutos verdes e maduros do jenipapo, e apresentam seus máximos de absorção em 240nm. Também encontrados em outra espécie (*Gardenia jasminoides* Ellis), estes iridóides têm sido estudados de forma intensiva nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas, com resultados promissores para o tratamento de doenças de origem inflamatória e no tratamento do câncer. A atividade antioxidante e antiinflamatória foi comprovada por Okada *et al.* (2007) e Takeuchi *et al.* (2005). Em estudos para avaliar o efeito antioxidante da genipina, Koo *et al.* (2004) verificaram uma capacidade antilipoperoxidativa significativamente importante. No

mesmo trabalho, os pesquisadores verificam uma potente atividade antiangiogênica e sugerem o uso da genipina como adjuvante ou em combinação na quimioterapia para o tratamento do câncer. A genipina mostrou ainda outras atividades, como: indução da apoptose em células de hepatoma humano (YAMAMOTO *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2005; HONG & KIM, 2007), efeito antifibrinogênico (KITANO *et al.*, 2006) e antitrombótico (SUZUKI *et al.*, 2001).

A genipina, a principal responsável pelos efeitos farmacológicos observados, não está presente nos frutos maduros, apenas nos verdes. Entretanto, a genipina é gerada *in vivo*, a partir do geniposídeo obtido através da ingestão dos frutos maduros, pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase sintetizada por bactérias do trato gastrointestinal (AKAO *et al.*, 1994).

Considerando, que tanto a genipina quanto o geniposídeo, absorvem no mesmo comprimento de onda (240nm), e devido à disponibilidade da primeira, resolveu-se utilizá-la como padrão nas análises a seguir.

O cromatograma por CLAE obtido para o padrão genipina e seu espectro no UV, encontram-se representados na Figura 26 e na Figura 27.

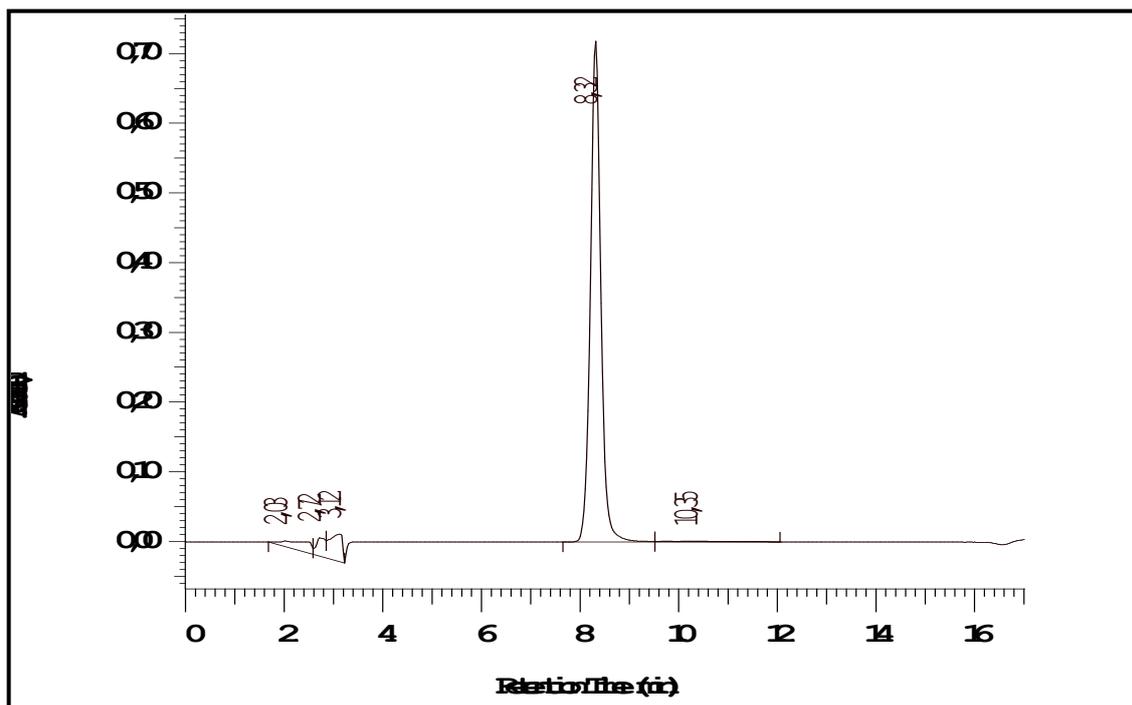


Figura 26 - Cromatograma do padrão genipina que foi submetido à CLAE. Condições: acetonitrila:água acidificada (TFA, pH3,0; 15:85) como fase móvel e detecção por absorção no UV (240nm) em coluna de fase inversa (C18).

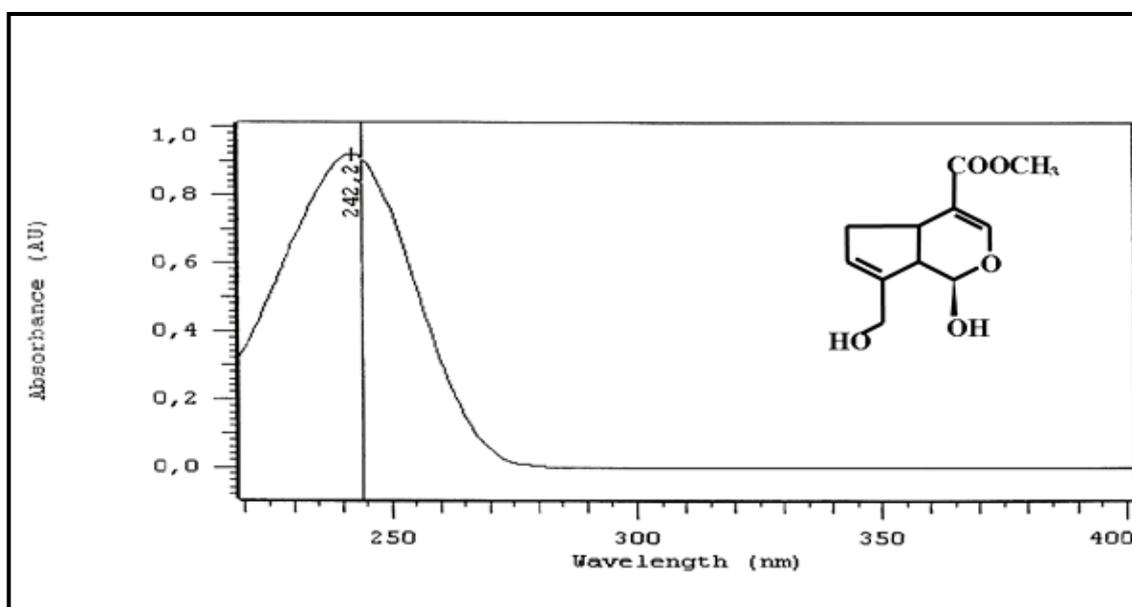


Figura 27 - Espectro no UV do padrão genipina ( $t_r = 8,32$  min., 240nm).

A Figura 28 mostra o espectro no UV, do geniposídeo e seu máximo de absorção a 240nm.

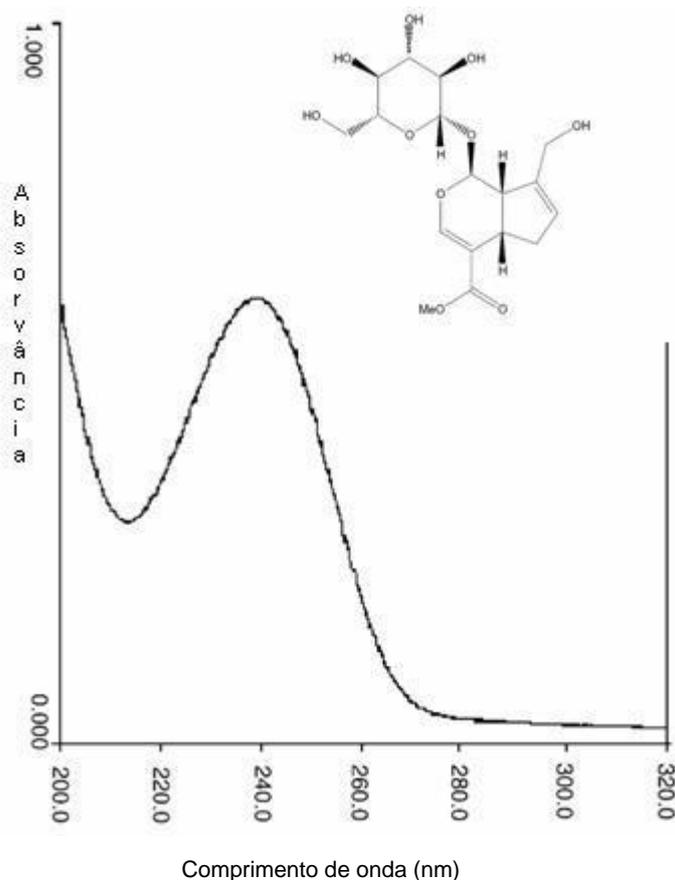


Figura 28 - Espectro no UV do geniposídeo (Wang *et al.*, 2004)

A Figura 29 mostra os cromatogramas dos extratos obtidos por maceração (a), Soxhlet (b) e ultrassom (c) que foram submetidos à CLAE. Conforme pode ser observado, os cromatogramas resultantes das três extrações apresentam perfil qualitativo semelhante, diferindo apenas em termos quantitativos. Considerando que os três extratos foram preparados nas mesmas concentrações (50mg/ml), é possível traçar uma comparação, considerando o rendimento relativo de cada sinal presente no cromatograma, nas condições analíticas empregadas.

No extrato obtido por Soxhlet (Figura 29, cromatograma b), as frações que eluíram nos tempos de 2,75 e 2,85 min. apresentaram concentrações de 8,03% e 6,29%, respectivamente. Nos demais extratos, no comprimento de onda utilizado nas análises, estas frações estão presentes em baixa concentração. Por outro lado, as frações com tempos de retenção de 3,20 min. (7,02%) e 4,16 (29,57%),

correspondentes às de tempos de retenção de 3,31(15,8%) e 3,28 (18,09%) min. e 4,27 (55,74%) e 4,11 (48,82) min. nos cromatogramas **a** e **c**, encontram-se em concentrações menores do que nos extratos obtidos por maceração e ultrassom.

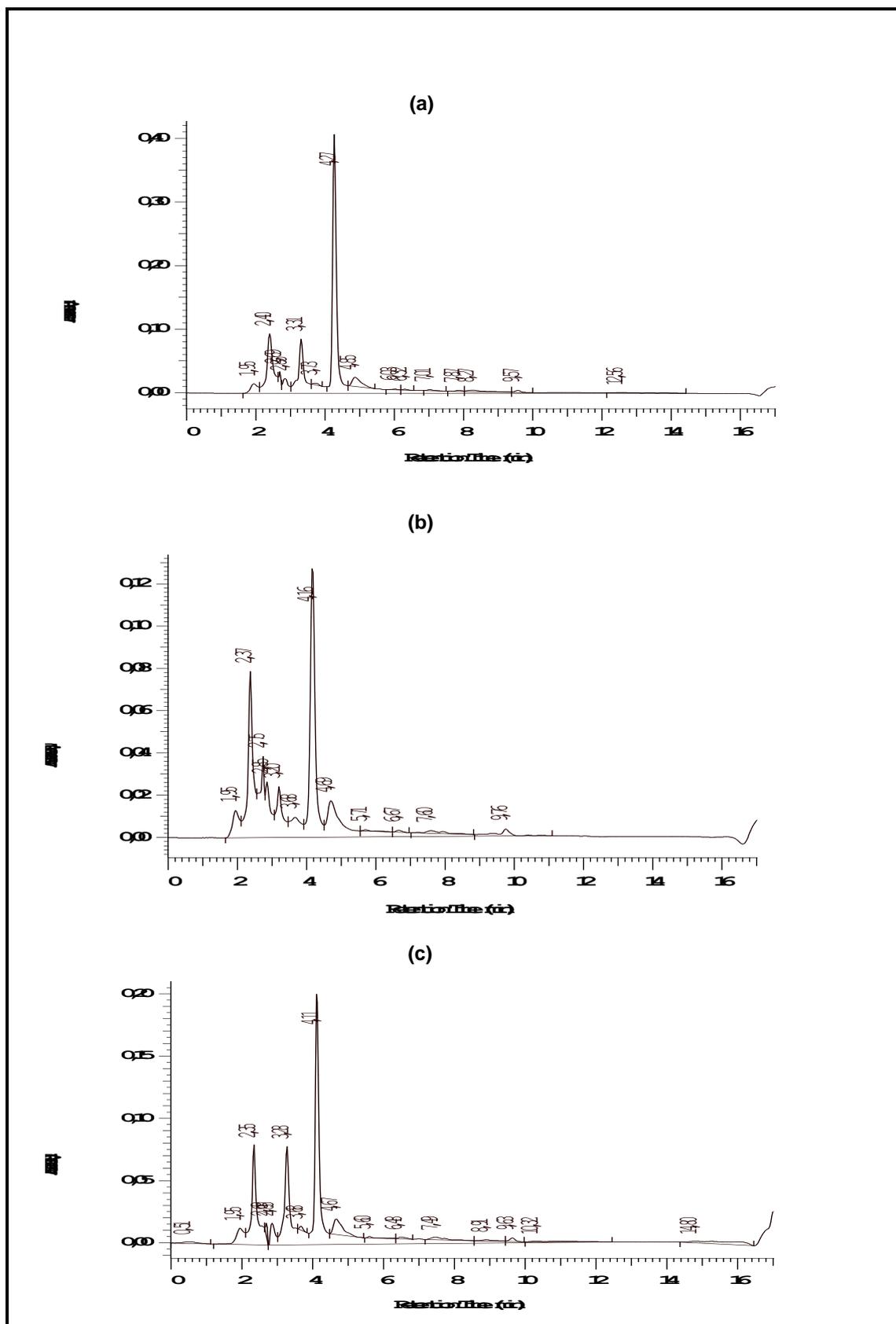


Figura 29 - Cromatogramas dos extratos obtidos por maceração (a), Soxhlet (b) e ultrassom (c) que foram submetidos à CLAE. Condições: acetonitrila:água acidificada (TFA, pH3,0; 15:85) como fase móvel e detecção por absorção no UV (240nm) em coluna de fase inversa (C18).

As frações com tempos de retenção 1,95, 2,40 e 4,27 min. (cromatograma **a**), apresentam espectros na região do ultravioleta (Figura 30) indicativos da presença de compostos fenólicos (HARBORNE, 1984). O mesmo perfil foi encontrado para as substâncias com tempos de retenção correspondentes nos cromatogramas **b** e **c**.

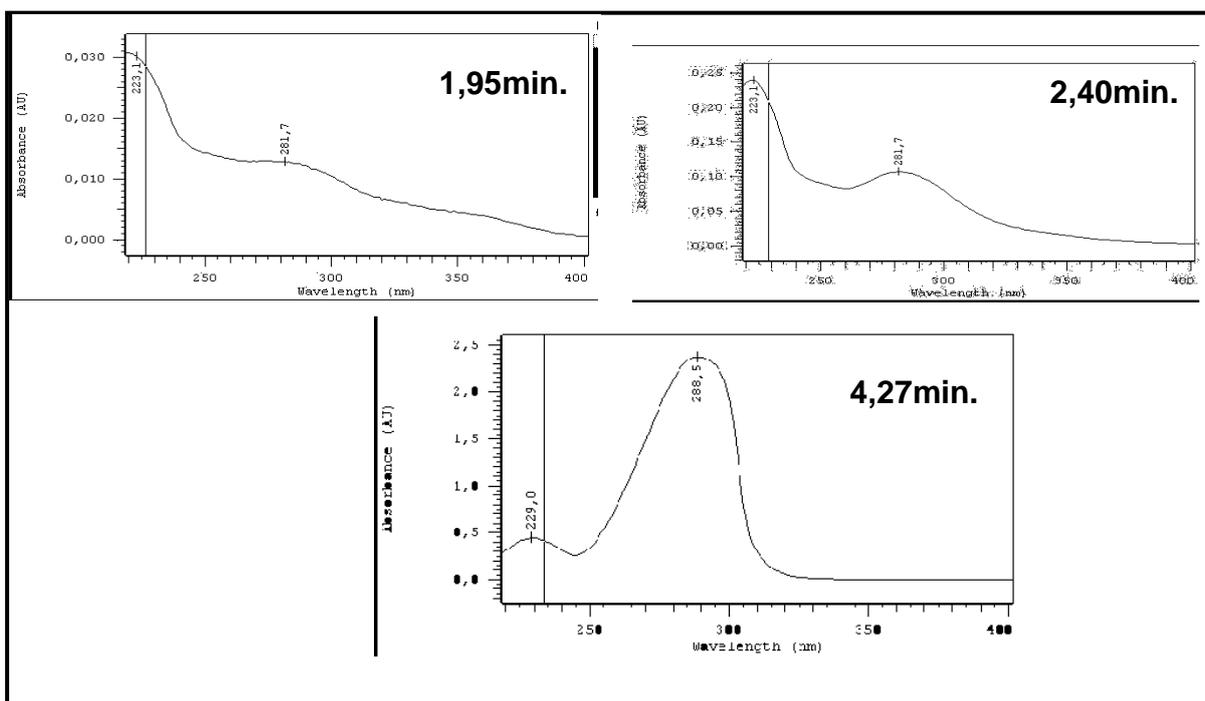


Figura 30 - Espectro no UV das substâncias eluídas em 1,95, 2,40 e 4,27 min. do extrato metanólico dos frutos de *G. americana*, obtido por maceração.

Os sinais em 4,85 (cromatograma **a**) e 4,69 (cromatograma **b**) apresentam um espectro no UV que mostra o máximo de absorção em 248nm (Figura 31), em possível concordância com aquele obtido para a genipina e o geniposídeo. No cromatograma **c**, o mesmo perfil foi encontrado para a substância que eluiu em 4,67 min. (cromatograma **c**) Considerando, que a genipina, elui da coluna em aproximadamente 8,32 min., é de se esperar que substâncias mais polares apresentem um tempo de retenção menor, já que a fase estacionária utilizada foi a RP-18. Dessa forma, é provável, que esta substância possa ser o geniposídeo, já

encontrado em outros trabalhos, no extrato metanólico de *G. americana* (ONO *et al.*, 2005; ONO *et al.*, 2007). Entretanto, é preciso que haja continuidade na pesquisa, com o intuito de se isolar esta substância, para que se possa afirmar a sua identidade. Quantitativamente, o extrato metanólico do jenipapo obtido por Soxhlet, apresentou maior rendimento com relação a esse iridóide, ou seja, 18,50% em comparação com os extratos obtidos por maceração (3,07%) e por ultrassom (3,82%). Estes resultados são contrários aos obtidos por Ji *et al.* (2006), utilizando a técnica por ultrassom, com um rendimento maior, cerca de 13%, quando comparado às técnicas convencionais como maceração e Soxhlet.

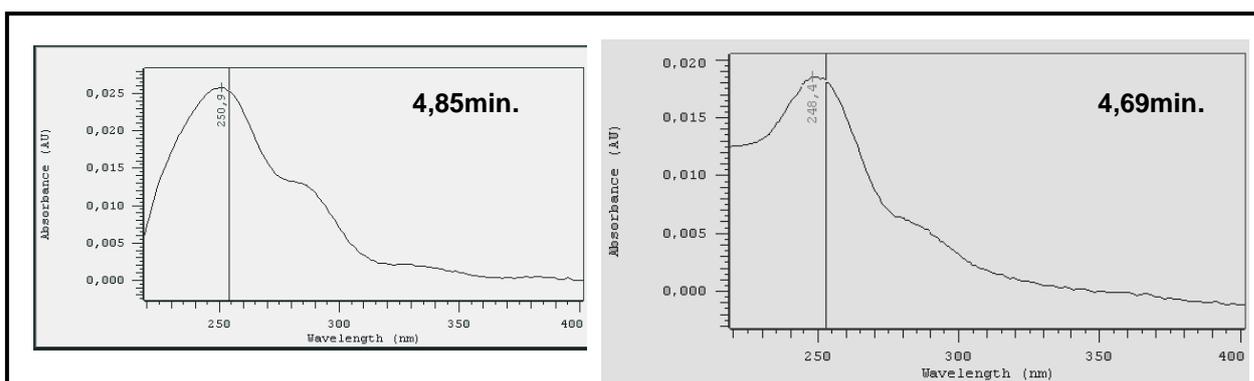


Figura 31- Espectro no UV das substâncias eluídas em 4,85 e 4,69min. dos extratos metanólicos dos frutos de *G. americana*, obtidos por maceração e Soxhlet.

A Figura 32, mostra o espectro no UV para a substância eluída com tempo de retenção de 3,31min. (cromatograma **a**). Os perfis obtidos no UV foram semelhantes para as substâncias com tempos de retenção correspondentes, mostradas nos cromatogramas **b** e **c** (UV não mostrados). Não foi possível sugerir nenhum tipo estrutural.

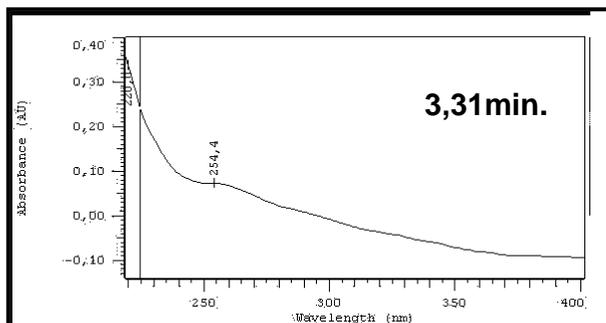


Figura 32 - Espectro no UV da substância eluída em 3,31min. do extrato metanólico dos frutos de *G. americana*, obtido por maceração.

Não foi detectada a presença de genipina em quaisquer das três amostras estudadas, conforme pode ser observado nos cromatogramas **a**, **b** e **c**, pela ausência de sinal em torno de 8,32 minutos (Figura 26). Entretanto, a análise dos frutos verdes, com e sem casca, mostrou uma predominância de iridóides (cromatogramas **a** e **b**, Figura 33).

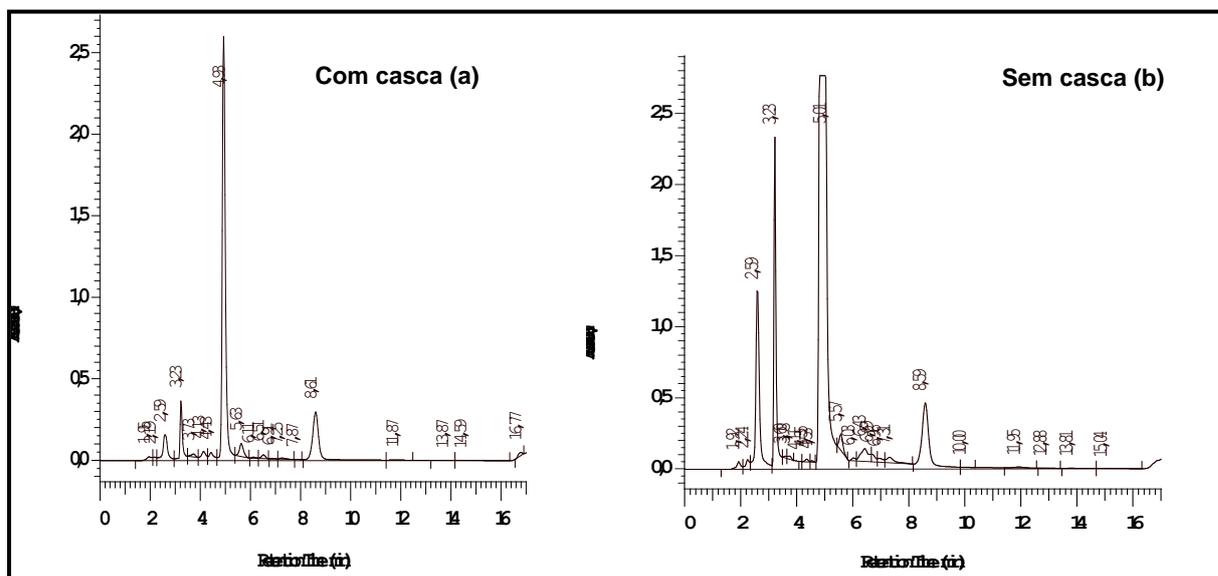


Figura 33 - Cromatogramas dos extratos aquosos obtidos dos frutos verdes com casca (a) e sem casca (b) submetidos à CLAE. Condições: acetonitrila:água acidificada (TFA, pH3,0; 15:85) como fase móvel e detecção por absorção no UV (240nm) em coluna de fase inversa (C18).

O sinal em 8,61 (14,83%) e 8,59 (9,72%) min. apresenta um espectro no UV que mostra o máximo de absorção em 242,2 e 241,5nm para os extratos metanólicos dos frutos com e sem casca, respectivamente (Figura 34) em concordância com a estrutura da genipina. Pode-se observar que nos frutos verdes sem casca, a genipina, identificada através de comparação com o tempo de retenção do padrão e perfil no UV, está em menor concentração em comparação com a porção com casca. Diferenças nas concentrações relativas dos frutos verdes com e sem casca, foi encontrada também para as substâncias que eluíram com tempo de retenção de 2,59 (5,41% e 10,25%), 3,23 (7,87% e 14,58%) e 4,93 e 5,01min. (61,62% e 59,23%), respectivamente. Comparando-se os espectros no UV (Figura 35) e os máximos de absorção destes sinais, constata-se que formam um grupo de substâncias com estrutura básica semelhante, porém com substituintes capazes de conferir características que influenciam no tempo de eluição da coluna. Ao se comparar com os espectros de UV da genipina e do genipósídeo, sugere-se, inicialmente, que se trata de um grupo de iridóides, marcadores quimiotaxonômicos da família Rubiaceae.

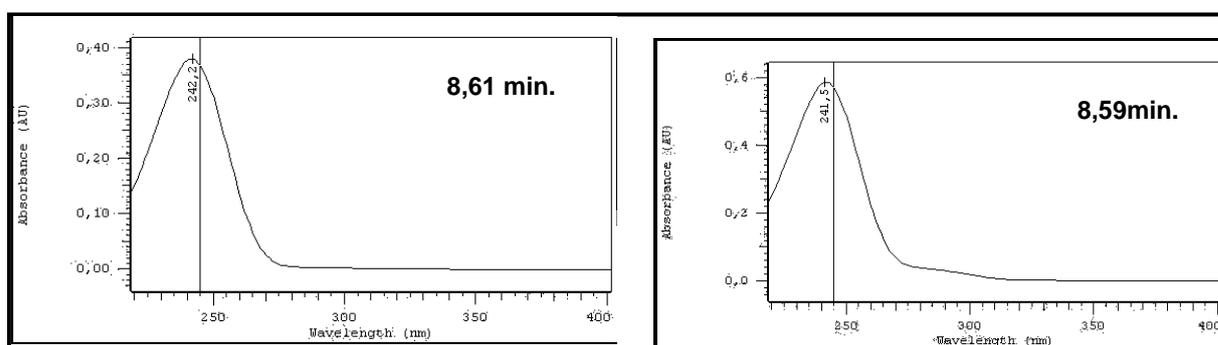


Figura 34 - Espectro no UV das substância eluídas em 8,61 e 8,59min. do extrato aquoso dos frutos verdes de *G. americana*.

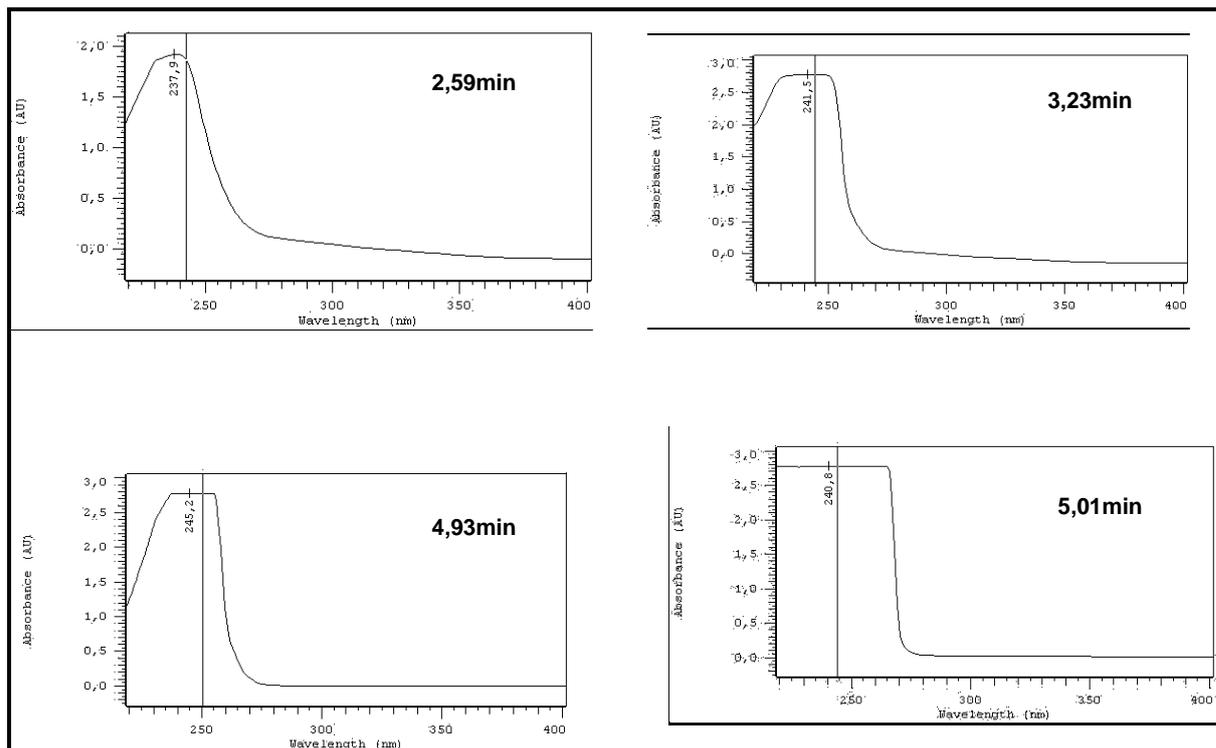


Figura 35 - Espectro no UV das substâncias eluídas em 2,59, 3,23, 4,93 e 5,01 do extrato aquoso dos frutos verdes de *G. americana*.

As condições de análise utilizadas, no presente trabalho, permitiram a separação dos iridóides e pode ser proposta como metodologia para trabalhos futuros.

#### 4.5 Obtenção do extrato metanólico e rendimento da extração a partir dos frutos de *Genipa americana*

A análise dos resultados (item 4.2) demonstrou que o rendimento da extração com três ciclos de 25 minutos foi próximo ao resultado obtido com 4 ciclos, e assim optamos por utilizar a extração com 3 ciclos para continuação dos trabalhos. Além disso, buscando-se sempre diminuir gastos, o volume de 80ml foi o escolhido por ter seu rendimento bem próximo do que foi encontrado para 100ml (32,60% para 80ml e 33,81% para 100ml), conforme foi mostrado anteriormente na Tabela 3 (página 47).

Para uma extração em maior escala, o volume (80ml) e a massa (10g) foram aumentados em 10 vezes para obtenção do extrato metanólico dos frutos.

Com a posterior concentração do extrato, o rendimento do material vegetal foi de 82,1g de extrato seco por 200g de frutos secos e moídos, que foi utilizado para a avaliação química e farmacológica.

## **4.6 Fracionamento do extrato metanólico dos frutos de *Genipa americana***

### **4.6.1 Identificação de substâncias na fração hexânica**

#### Análise da fração FHJ2-5

A fração FHJ2-5 eluída da coluna da fração hexânica com hexano 100% (Figura 10) foi analisada por CG/EM. O cromatograma obtido da fração FHJ2-5 encontra-se apresentado na Figura 36.

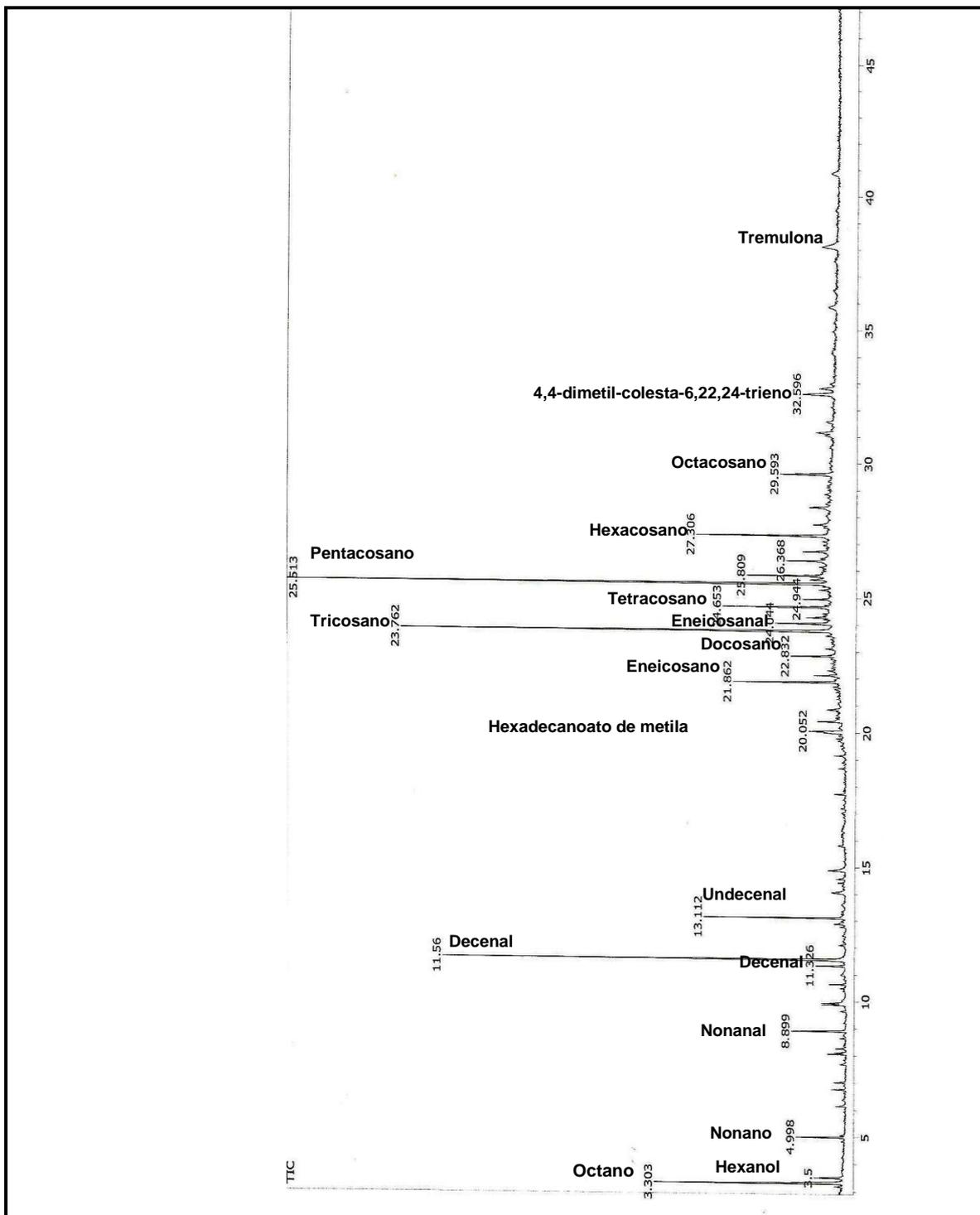


Figura 36 - Cromatograma da fração FHJ2-5.

A identificação das substâncias foi realizada com base nos seus perfis de fragmentação em comparação com dados da literatura e da biblioteca de espectros do equipamento (Tabela 9).

Tabela 9 - Substâncias identificadas na fração FHJ2-5 com seus tempos de retenção e concentração.

Substância	Tempo de retenção (min.)	Concentração (%)
Octano	3,30	7,84
Hexanol	3,50	1,07
Nonano	5,00	1,65
Nonanal	8,90	1,90
Decenal*	11,33	1,08
Decenal*	11,56	14,30
Undecenal	13,11	4,86
Hexadecanoato de metila	20,05	2,42
Eneicosano	21,86	3,87
Docosano	22,83	1,46
Tricosano	23,76	16,30
Eneicosanal	24,04	1,81
Tetracosano	24,65	3,37
Pentacosano	25,51	21,00
Não identificada	25,81	3,18
Hexacosano	27,31	6,06
Octacosano	29,59	3,26
4,4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno	32,60	2,31
Tremulona	38,02	NQ

\* isômeros identificados, porém não diferenciados (NQ – não quantificado)

Foi predominante a presença de hidrocarbonetos nesta fração. Dentre os esteróides, puderam ser identificados o 4,4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno (Figura 37) e a tremulona com tempo de retenção de 38,02min. (3,5-estigmastadien-7-ona, Figura 38).

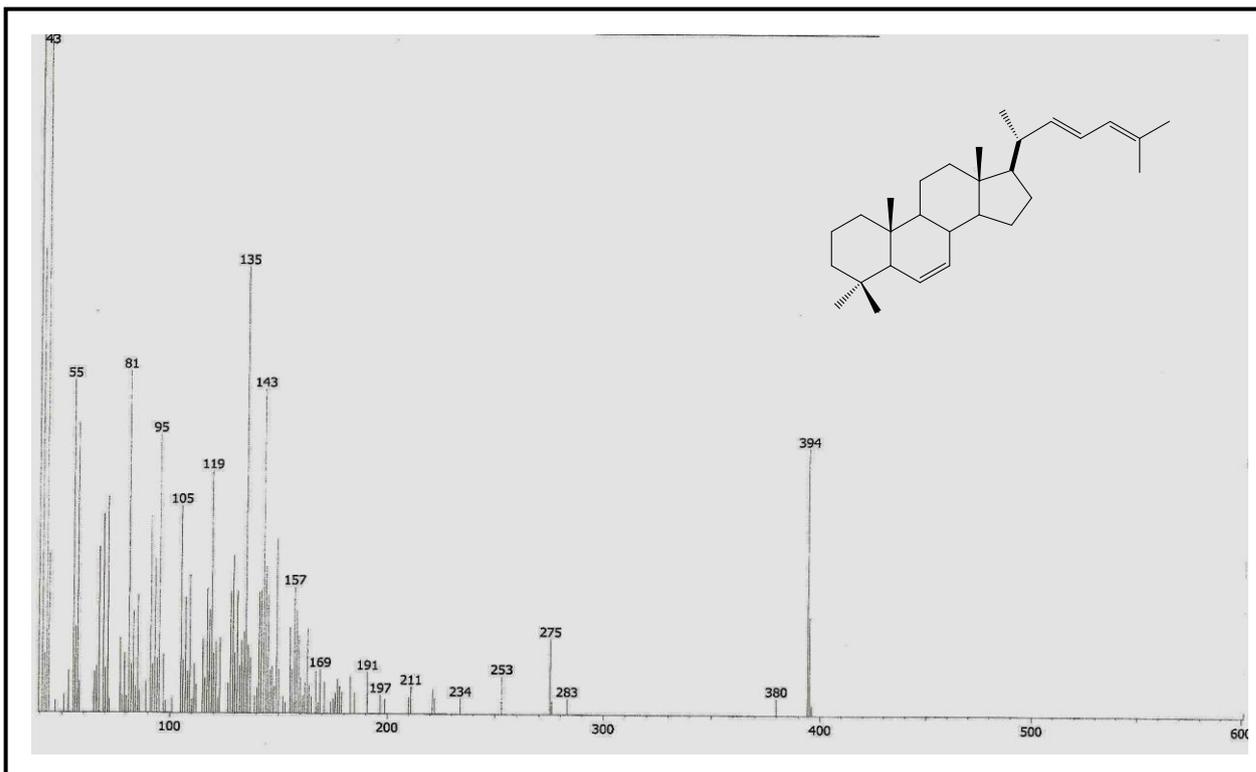


Figura 37 - Espectro de massas e estrutura química do 4,4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno.

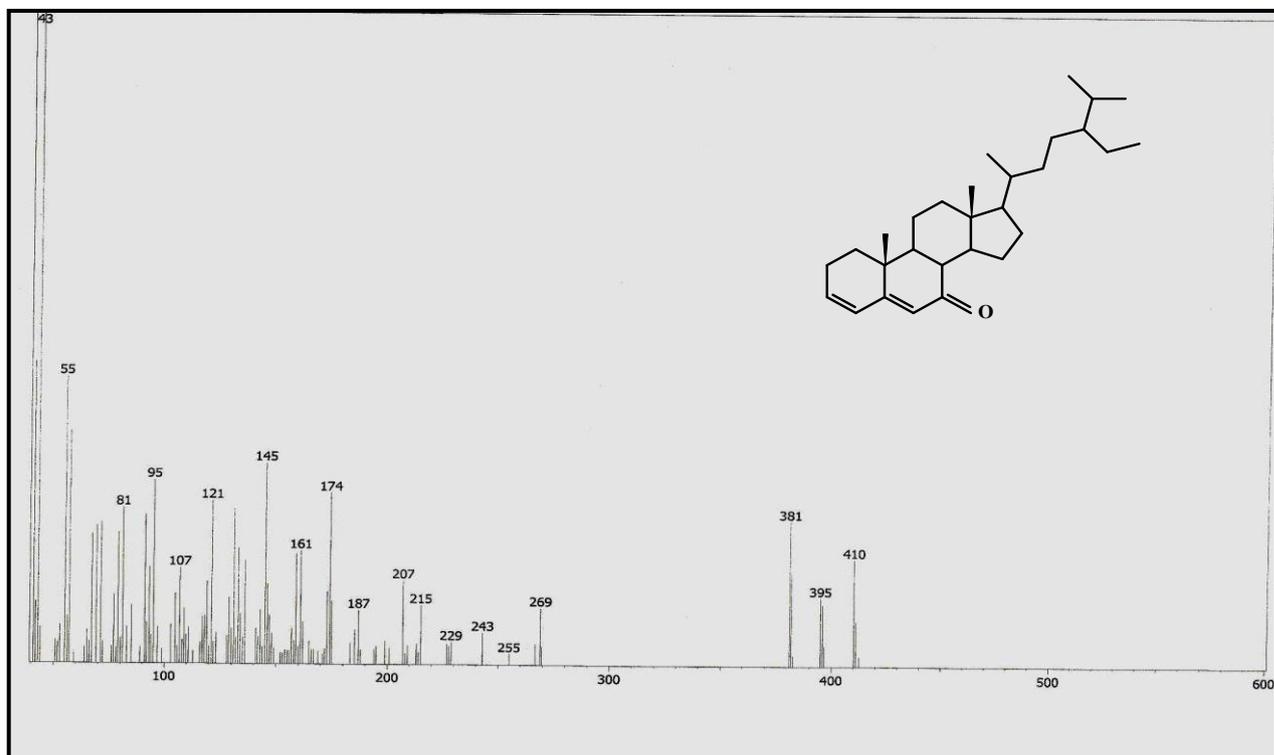


Figura 38 - Espectro de massas e estrutura química da tremulona.

### Análise da fração FHJ18-20

A fração FHJ18-20 eluída da coluna da fração hexânica com hexano/acetato de etila 50% (Figura 10) foi analisada por CG/EM. O cromatograma obtido da fração FHJ18-20 encontra-se apresentado na Figura 39.

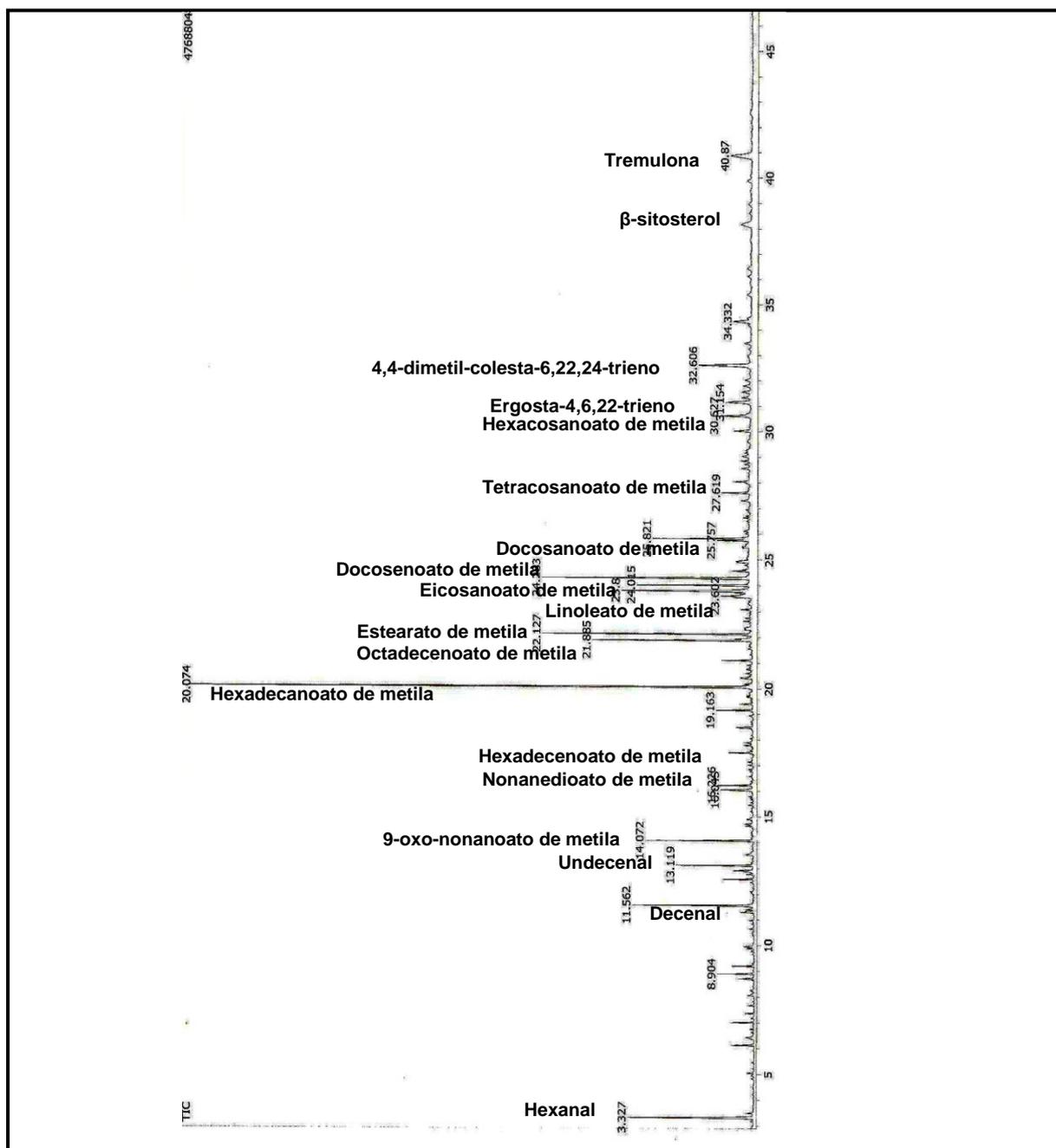


Figura 39 - Cromatograma da fração FHJ18-20.

A identificação das substâncias foi realizada com base nos seus perfis de fragmentação em comparação com dados da literatura e da biblioteca de espectros do equipamento (Tabela 10).

Tabela 10 - Substâncias identificadas na fração FHJ18-20 com seus tempos de retenção e concentração.

Substância	Tempo de retenção (min.)	Concentração (%)
Hexanal	3,33	6,36
Decenal	11,56	4,58
Undecenal	13,12	2,45
9-oxo-nonanoato de metila	14,07	3,47
Nonanedioato de metila	16,04	1,42
Hexadecenoato de metila	16,23	1,24
Hexadecanoato de metila	20,07	22,82
Octadecenoato de metila	21,89	5,81
Estearato de metila	22,13	7,50
Linoleato de metila	23,80	7,03
Eicosanoato de metila	24,01	3,99
Docosenoato de metila	24,28	9,64
Docosanoato de metila	25,76	1,22
Tetracosanoato de metila	27,62	1,20
Hexacosanoato de metila	30,02	NQ
Não identificada	30,63	1,79
Ergosta-4,6,22-trieno	31,15	1,86
4-4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno	32,61	4,48
$\beta$ -sitosterol	38,07	NQ
Tremulona	40,87	2,83

NQ – não quantificado

Foi predominante a presença de ésteres de ácidos graxos nesta fração. Dentre os esteróides, puderam ser identificados o 4-4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno (4,48%), com tempo de retenção de 32,6min. (Figura 37) e a tremulona (2,83%) com tempo de retenção de 40,9min. (Figura 38).

#### Análise da fração FHJ21-22

A fração FHJ21-22 eluída da coluna da fração hexânica com hexano/acetato de etila 50% (Figura 10) foi analisada por CG/EM. O cromatograma obtido da fração FHJ21-22 encontra-se apresentado na Figura 40.

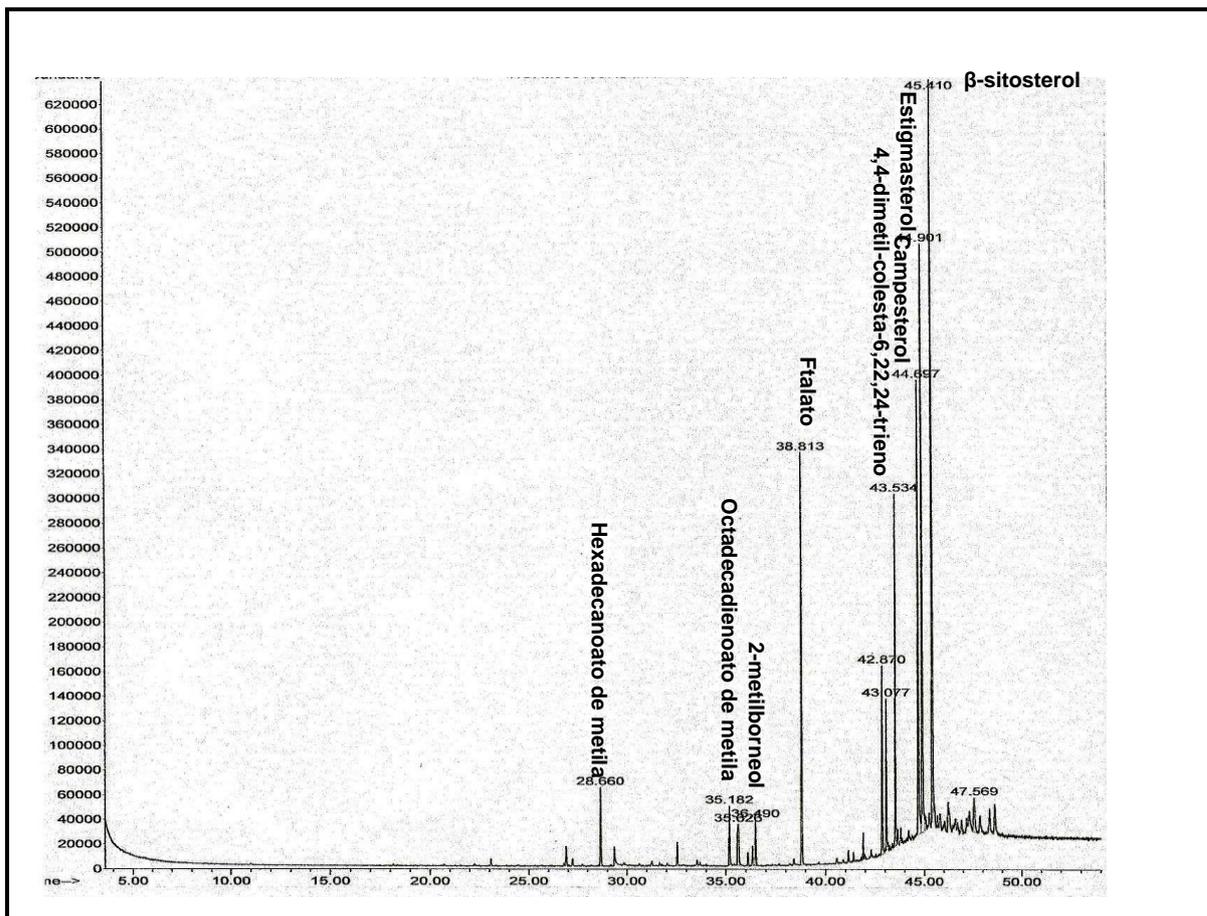


Figura 40 - Cromatograma da fração FHJ21-22.

A identificação das substâncias foi realizada com base nos seus perfis de fragmentação em comparação com dados da literatura e da biblioteca de espectros do equipamento (Tabela 11).

Tabela 11 - Substâncias identificadas na fração FHJ21-22 com seus tempos de retenção e concentração.

Substância	Tempo de retenção (min.)	Concentração (%)
Hexadecanoato de metila	28,66	2,62
Não identificada	35,18	2,03
Octadecadienoato de metila	35,63	2,60
2-Metilborneol	36,49	1,38
Ftalato	38,81	10,92
Não identificada	42,87	5,81
Não identificada	43,08	3,69
4-4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno	43,54	8,90
Campesterol	44,70	15,99
Estigmasterol	44,90	19,70
$\beta$ -sitosterol	45,41	24,01
Não identificada	47,57	2,34

As substâncias referentes aos sinais em 44,7, 44,9 e 45,4min. (Figura 40), segundo seus espectros de massas, foram identificadas como campesterol (Figura 41), estigmasterol (Figura 42) e  $\beta$ -sitosterol (Figura 43).

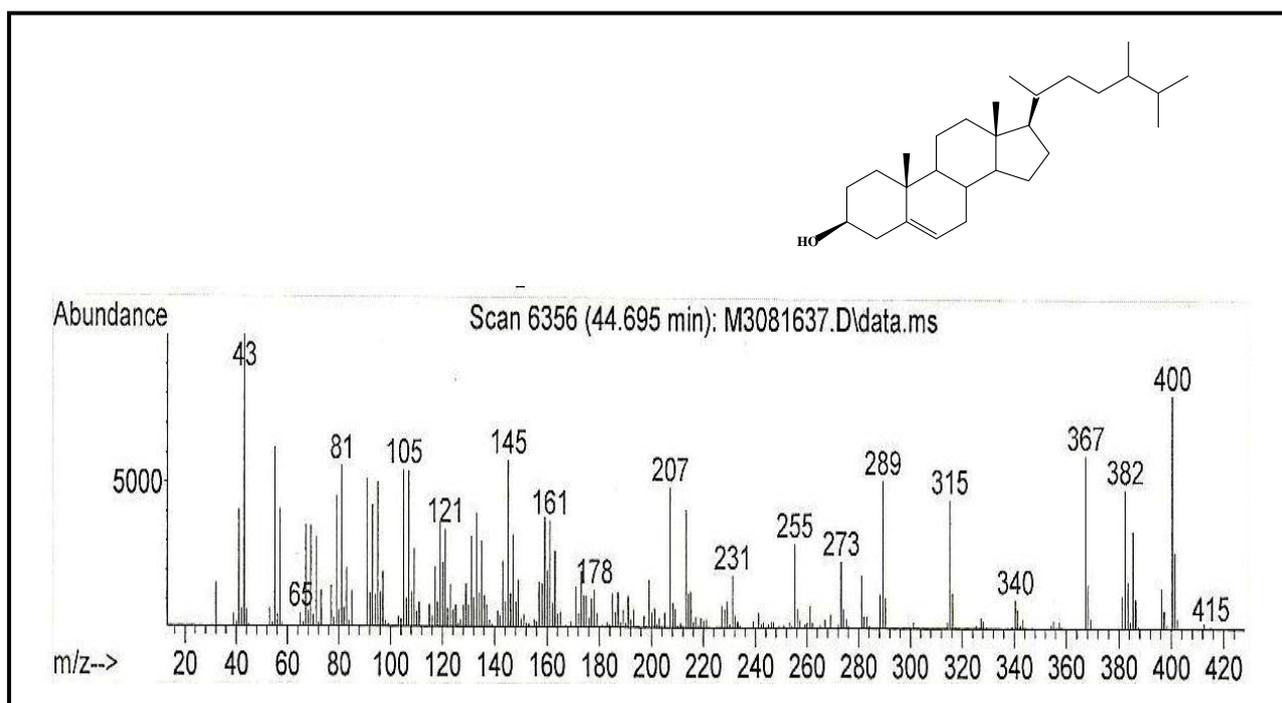


Figura 41 - Espectro de massas e estrutura química do campesterol.

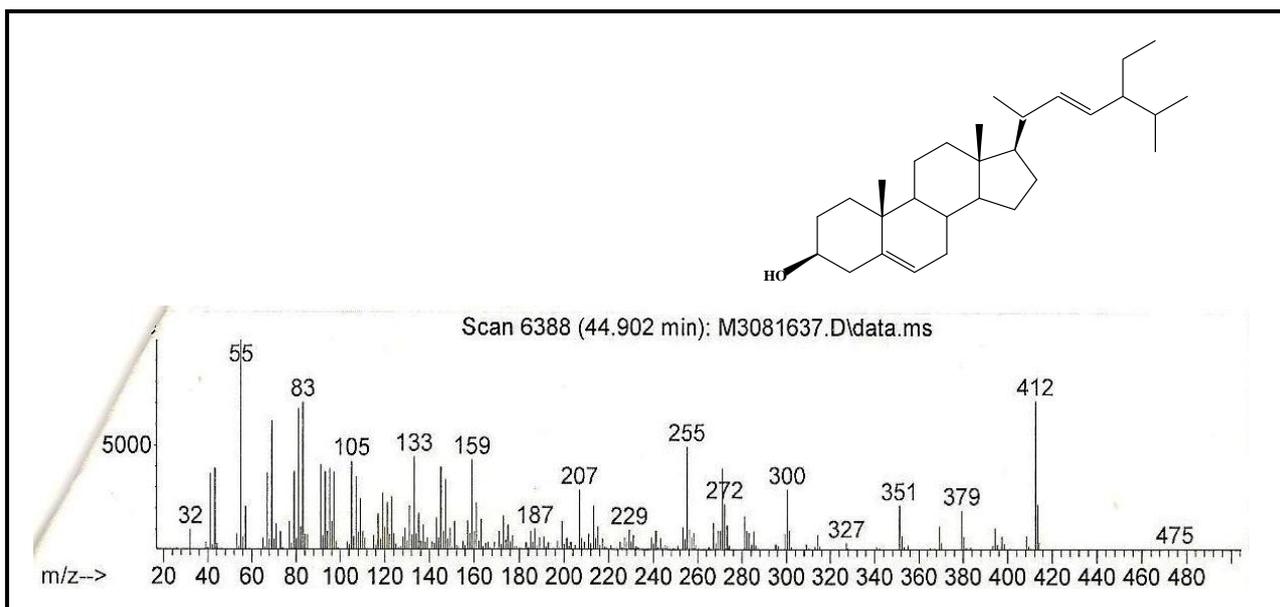


Figura 42 - Espectro de massas e estrutura química do estigmasterol.

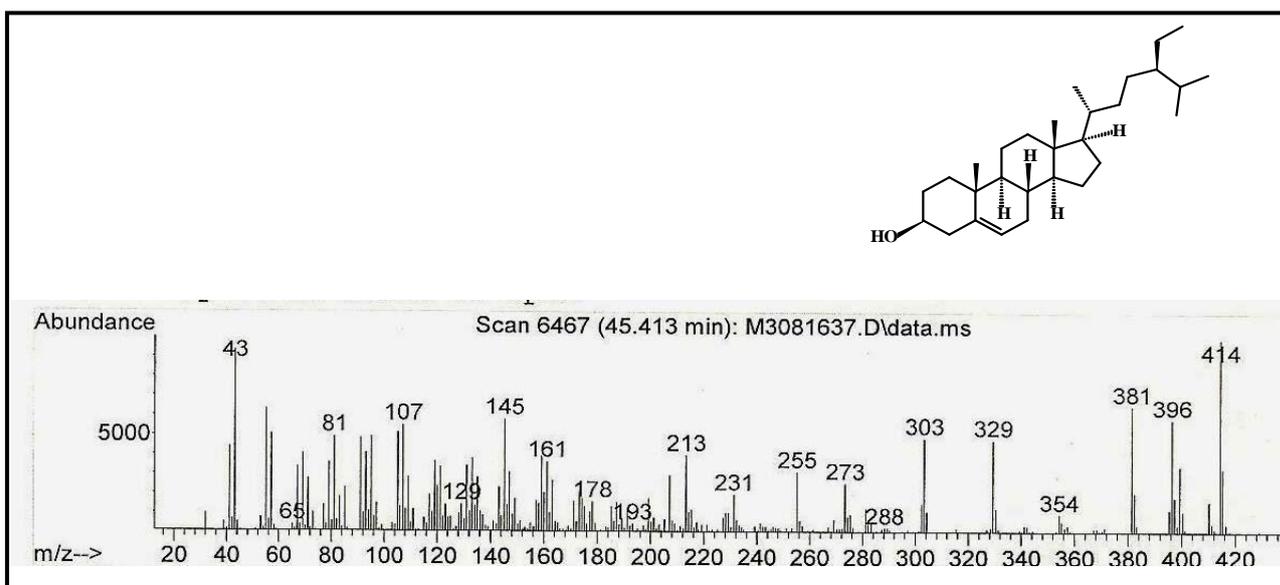


Figura 43 - Espectro de massas e estrutura química do  $\beta$ -sitosterol.

### Análise da fração FHJ41-43

A fração FHJ41-43 eluída da coluna da fração hexânica com acetato de etila/metanol 30% (Figura 10) foi analisada por CG/EM. O cromatograma obtido da fração FHJ41-43 encontra-se apresentado na Figura 44.

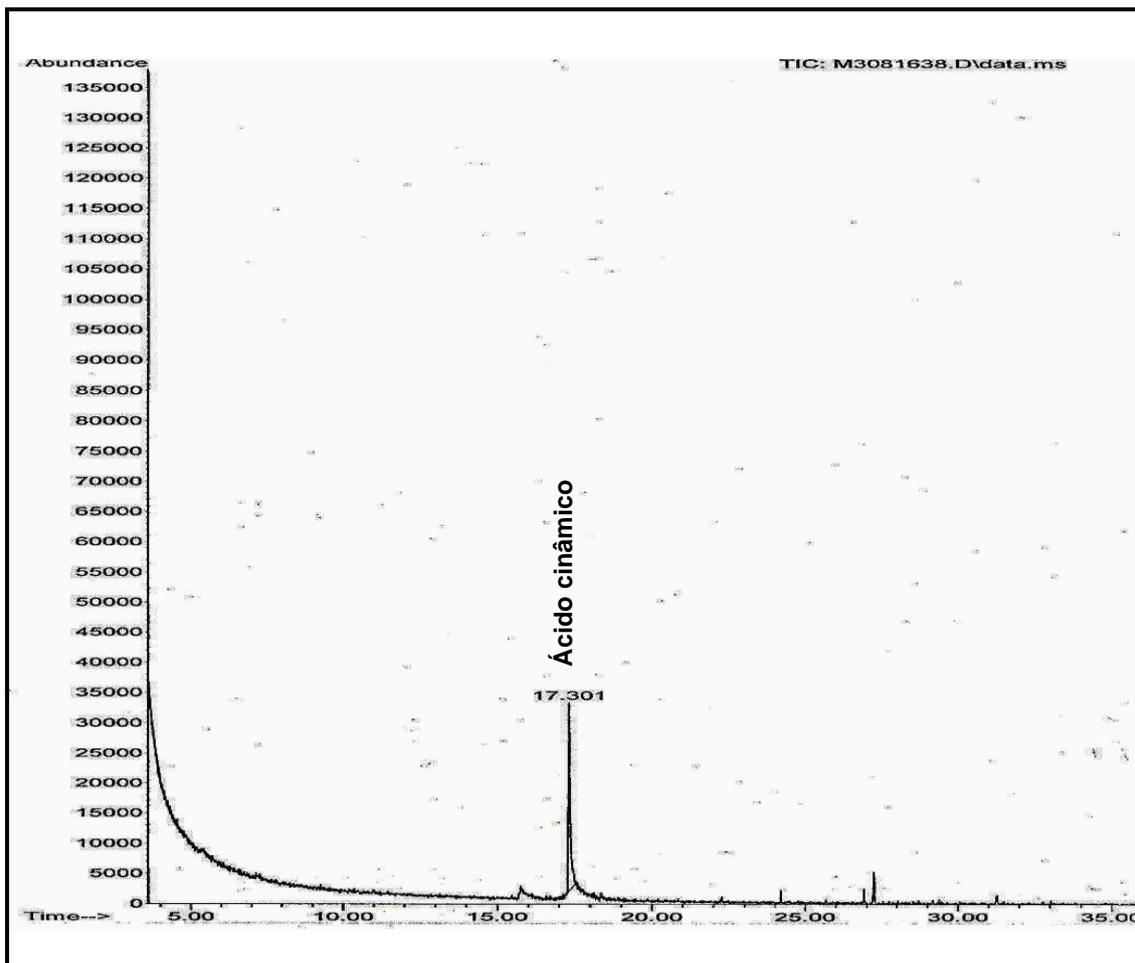


Figura 44 - Cromatograma da fração FHJ41-43.

A substância referente ao sinal em 17,3min. (Figura 44), segundo seu espectro de massas, foi identificada como ácido cinâmico (Figura 45).

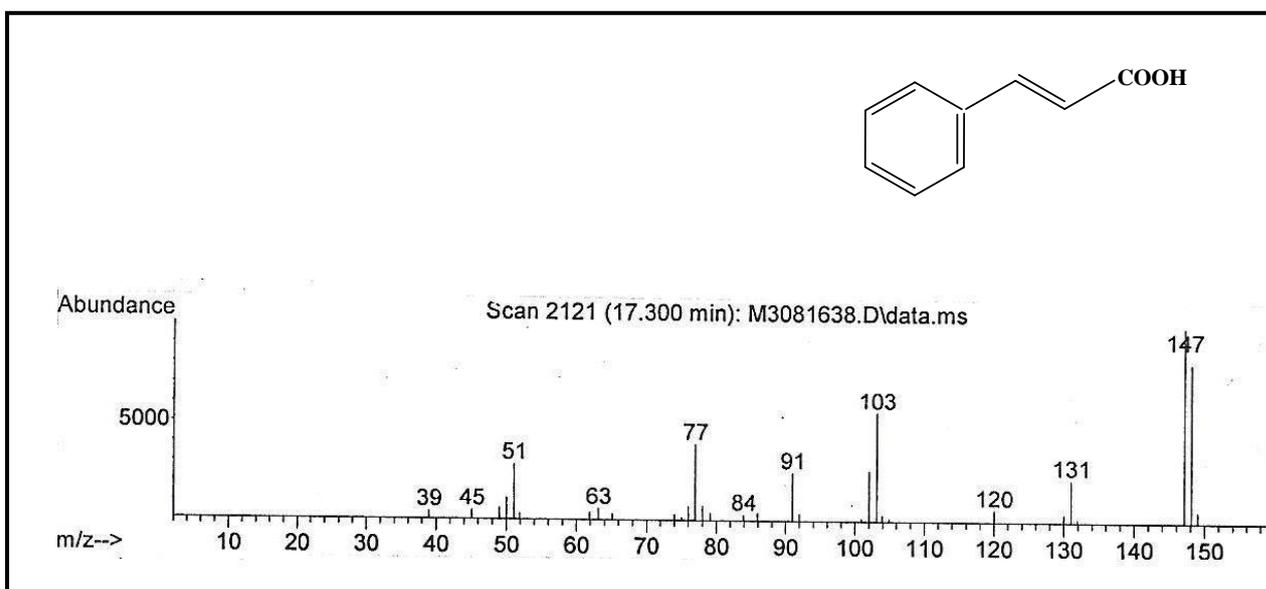


Figura 45 - Espectro de massas e estrutura química do ácido cinâmico.

#### 4.6.2 Identificação de substâncias na fração diclorometano

A fração em diclorometano (FDJ - 815,1mg) resultante da partição do extrato metanólico dos frutos de *G. americana*, submetida à extração ácido-base, foi analisada por CG/EM e o cromatograma obtido encontra-se na Figura 46, a seguir.

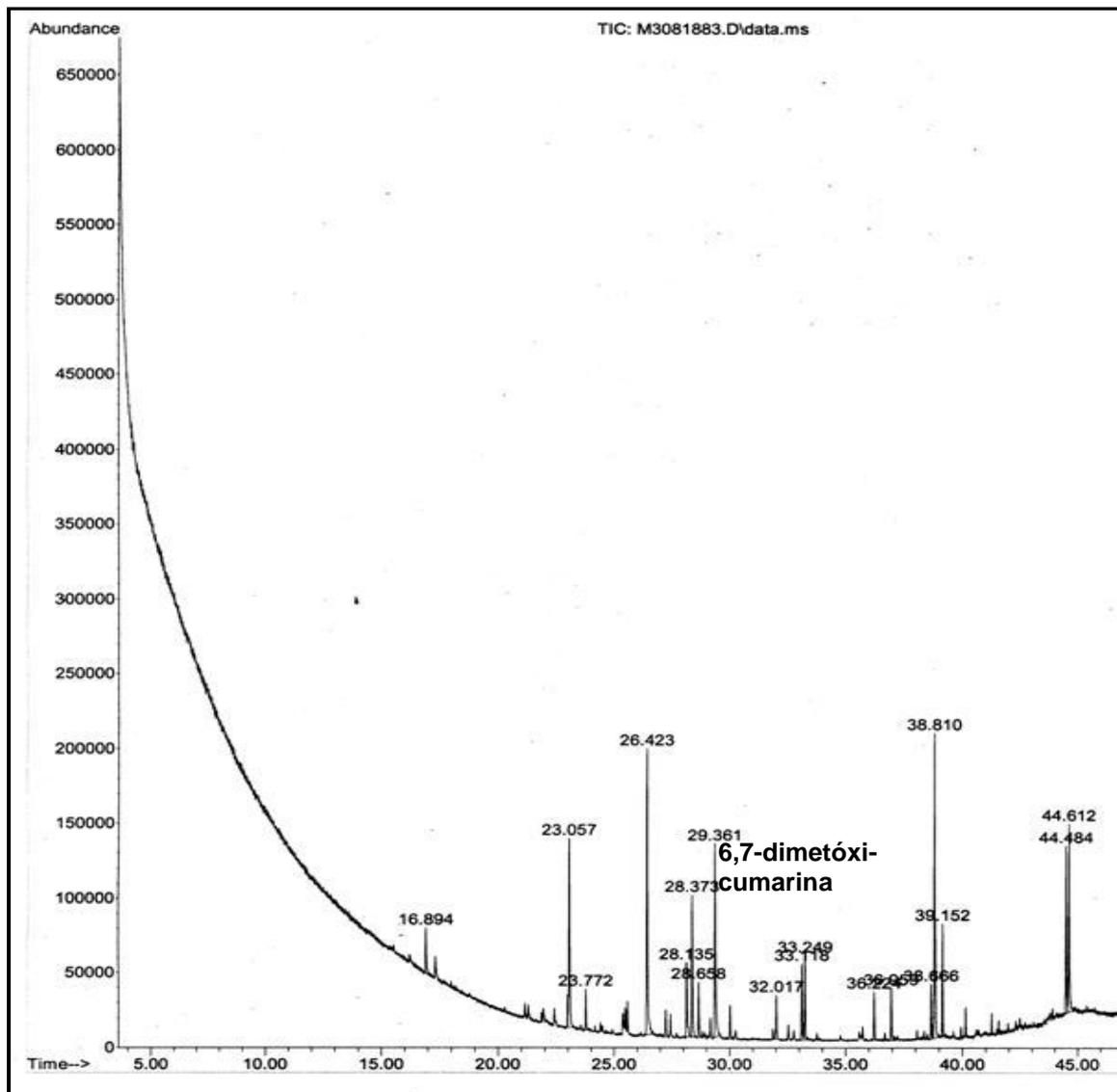


Figura 46 - Cromatograma da fração FDJ.

Na fração diclorometano foram identificados os seguintes ésteres metílicos dos ácidos: carboxílico 2-fenil-ciclopropano (16,89min.), hexadecanóico (28,66min.), octadecenóico (32,02min.), octadecadienóico (33,12min.) e octadecatrienóico (33,25min.).

A substância eluída a 29,3min., apresentou íon molecular com  $m/z$  206 que, por impacto de elétrons a 70eV, gerou uma série de fragmentos condizentes com a estrutura da 6,7-dimetóxi-cumarina (Figura 47). Esta substância foi identificada por comparação com dados da literatura (CANINI *et al.*, 2007) e da biblioteca eletrônica do equipamento (SPECLIBS\wiley7n.1).

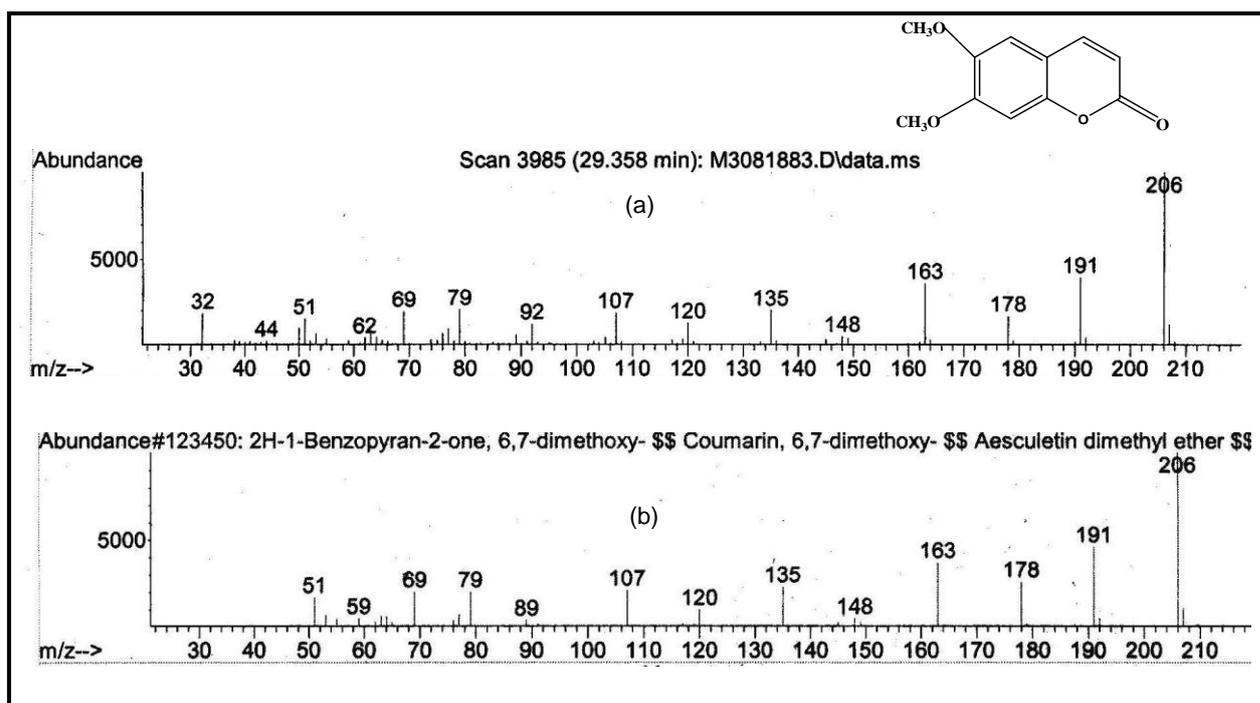


Figura 47 - Espectro de massas e estrutura química da 6,7-dimetóxi-cumarina. (a) Espectro de massas da amostra injetada e (b) Espectro de massas da 6,7-dimetóxi-cumarina fornecido pela biblioteca de espectros.

A 6,7-dimetóxi-cumarina é uma fitoalexina (metabólito secundário, antimicrobiano, produzido pela planta em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos). No trabalho de Ortuño *et al.* (1997) foi verificado um aumento na biossíntese deste metabólito, presente nos frutos maduros de algumas espécies do gênero *Citrus* contaminados pelo fungo *Phytophthora parasitica*. Esta substância também está presente em algumas espécies de plantas, como *Artemisia capillaris*, que faz parte de formulações de medicamentos tradicionais chineses usados com

propriedades antioxidantes, hepatoterapêuticas e hepatoprotetoras (XIAO-PING *et al.*, 2008; LV *et al.*, 2008).

Este metabólito (6,7-dimetóxi-cumarina) já foi isolado de raízes de *Rubia wallichiana*, da planta inteira de *Hedyotis biflora* e das raízes de *Canthium multiflorum*, todas espécies pertencentes à família Rubiaceae (TIAN-SHUNG *et al.*, 2003; YUNG-HUSAN *et al.*, 2006; TRAORÉ *et al.*, 2008). Para *G. americana*, ainda não havia sido descrita até o presente momento, a ocorrência da 6,7-dimetóxi-cumarina.

## **4.7 Óleo essencial do fruto de *Genipa americana***

### **4.7.1 Avaliação química das frações voláteis**

Frutos, em geral, sofrem grandes transformações físicas e químicas durante o processo de amadurecimento, ou devido às condições de armazenamento.

Os frutos de *G. americana*, coletados em 2006, foram armazenados sob refrigeração durante um ano e, transcorrido esse tempo, não se observou alterações visíveis com relação à textura e integridade dos mesmos. Para se avaliar possíveis alterações químicas que possam ter ocorrido no aroma dos frutos durante o armazenamento sob refrigeração, foi realizada extração da fração volátil, por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, de forma a se traçar um perfil comparativo desta fração com as obtidas de frutos frescos e recentemente coletados. Os óleos obtidos (2006, 2007 e 2008) apresentaram coloração amarela, odor forte e característico e rendimento de aproximadamente 0,01%. As frações voláteis foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para o cálculo dos índices de retenção de Kovats foram injetados padrões de hidrocarbonetos lineares da série C<sub>8</sub> a C<sub>26</sub>. As concentrações

relativas (%) das substâncias detectadas na fração volátil foram calculadas a partir da integração das áreas dos sinais de cada componente.

Conforme pode ser observado na Figura 49 e na Figura 50, os perfis cromatográficos das frações voláteis dos frutos coletados no ano de 2006 e 2007 são muito semelhantes. A fração obtida em 2008, apesar de apresentar um número maior de substâncias, de uma forma geral também apresenta uma certa analogia com as anteriores. Alguns componentes presentes em maior concentração na amostra de 2008 podem ser visualizados em quantidades-traço nas demais frações. O perfil de fragmentação aponta para uma predominância de ácidos graxos em todas as frações, sendo que alguns evidenciados através de seus ésteres metílicos. Os cromatogramas obtidos para as três amostras, mostram uma baixa complexidade em relação ao número de substâncias encontradas. Na tentativa de se obter uma fração constituída por um número maior de componentes, de forma a se verificar variações nas composições do óleo volátil de *G. americana*, procedeu-se à extração por hidrodestilação utilizando-se dois tipos de extratores do tipo Clevenger (Figura 48). O aparelho apresentado na Figura 48b apresenta um desenho mais compactado onde todas as peças estão unidas de forma única e o condensador encontra-se permanentemente acoplado ao restante do equipamento. No aparelho mostrado na figura 48a, o condensador é acoplado separadamente, podendo ser removido, o que poderia gerar perda de possíveis componentes mais voláteis através de prováveis passagens. Entretanto, após análise dos óleos obtidos não foram encontradas diferenças significativas com os diferentes aparelhos utilizados.

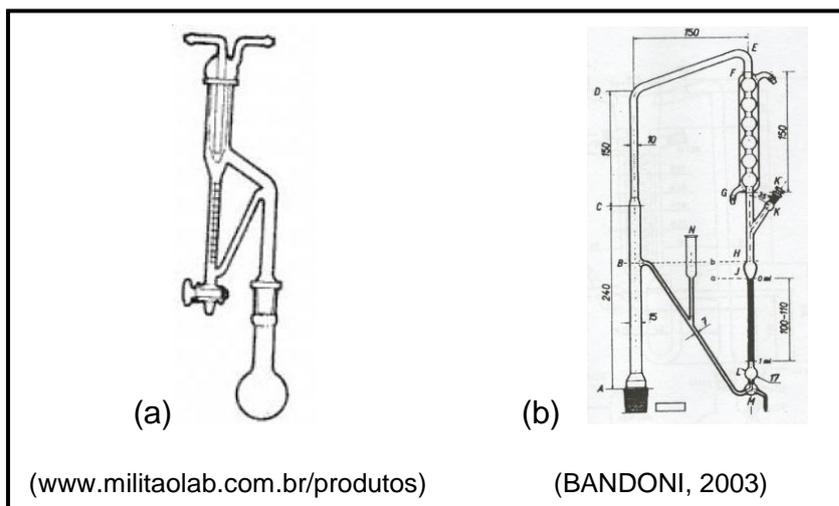


Figura 48 - Aparelhos do tipo Clevenger modificados

O constituinte majoritário identificado nas frações voláteis dos frutos coletados em 2006, 2007 e 2008 (Figuras 49, 50 e 51, respectivamente), foi o ácido octanóico (69,74%, 82,83% e 76,54%). A segunda substância em maior abundância foi o octanoato de metila (9,32%) na fração obtida em 2006, o ácido hexanóico (5,08%) nos frutos coletados em 2007 e o cinamato de metila (3,60%), encontrado em maior proporção nos frutos coletados em 2008. O heptadienal foi encontrado também em alta concentração nas amostras de 2006 e 2007, em percentuais de 8,33% e 4,88%, respectivamente. Na amostra de 2008, porém, esta substância encontra-se em baixa concentração (0,04%).

As substâncias encontradas nas frações voláteis analisadas (2006, 2007 e 2008) estão de acordo com as informações de trabalhos anteriores, em que citam a presença de ácidos carboxílicos (majoritários), ésteres e álcoois como componentes do óleo volátil de jenipapo (BORGES & REZENDE, 2000; PINO *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2006). Entretanto, observa-se uma alternância com relação ao percentual das substâncias nas diversas frações voláteis analisadas. Alves (2004), em trabalho realizado com duas safras de jenipapo (2001 e 2002), coletados em Fortaleza, verificou que o octanoato de metila, 2-heptanona e os ácidos octanóico, 2-metilbutírico e hexanóico eram os componentes majoritários nas duas amostras

estudadas. Pino *et al.* (2005), detectaram como principais componentes nos frutos coletados em Cuba, os ácidos hexadecanóico, octadecanóico e tetradecanóico. Em trabalho realizado por Pinto e colaboradores em 2006 com frutos coletados no Rio de Janeiro foram encontrados como principais componentes: álcoois (24,39 e 28,21%), ésteres (21,9 e 12,82%), ácidos (17,07 e 20,51%) e derivados aromáticos (9,70 e 23,08%). Foi identificada uma grande proporção de ácidos como 2-metilbutanóico (210-340ppb), hexanóico (307-497ppb), heptanóico (122-350ppb) e octanóico (500-788ppb).

A Figura 49 mostra o cromatograma obtido da análise do óleo essencial de jenipapo coletado em 2006.

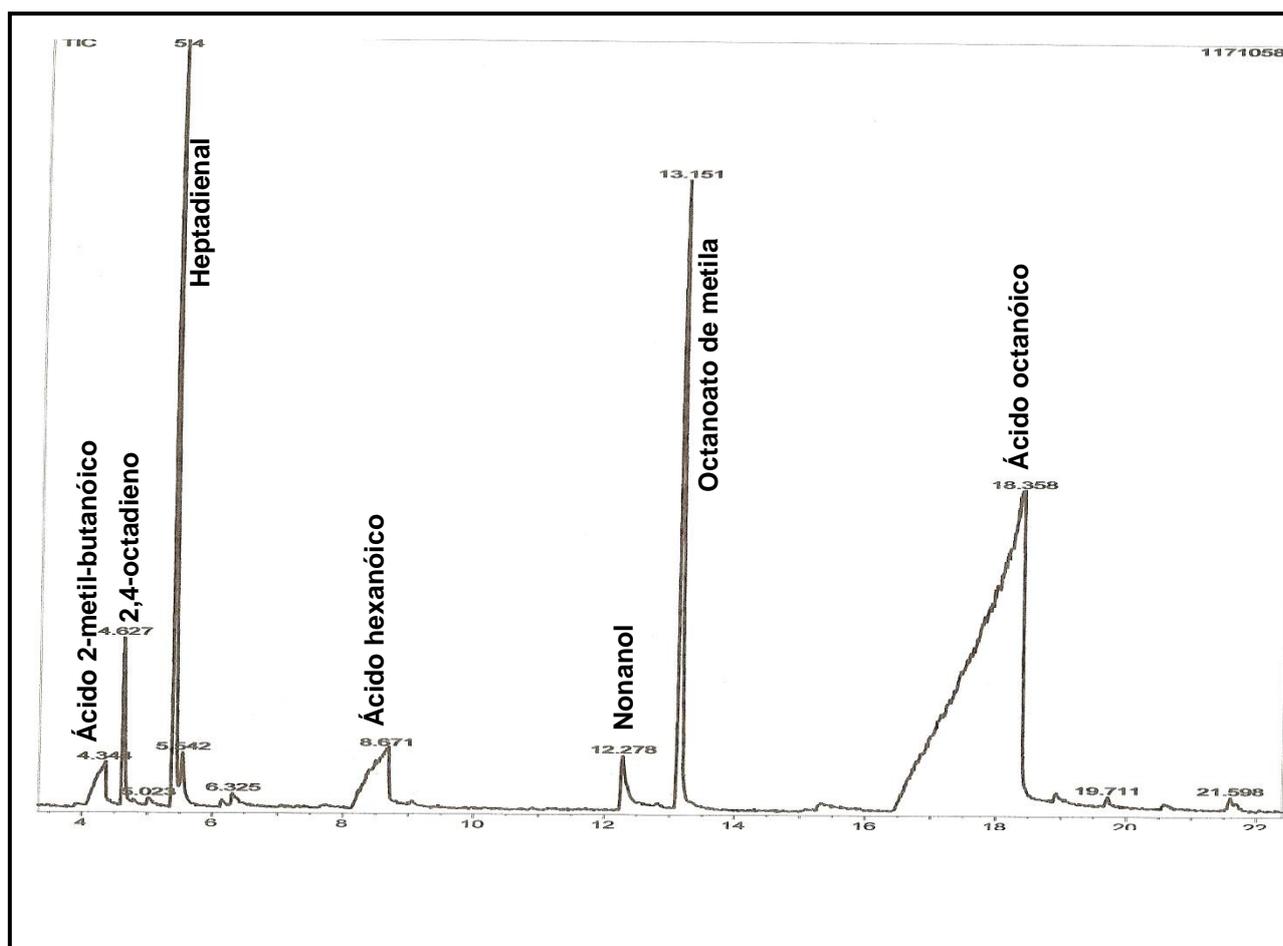


Figura 49 - Cromatograma obtido por CG/EM da fração volátil dos frutos de jenipapo coletado em fevereiro de 2006 e conservado sob refrigeração.

As substâncias identificadas na fração volátil dos frutos de jenipapo de 2006 encontram-se listadas na Tabela 12, a seguir.

Tabela 12 - Composição da fração volátil do jenipapo coletado em fevereiro de 2006.

Substância	TR (min.)	IR <sub>calc</sub>	IR <sub>lit</sub>	Conc. (%)
Ácido 2-metil-butanóico	4,34	880	-	2,10
2,4-octadieno	4,62	893	-	1,95
Heptadienal	5,40	924	-	8,33
2,3-dimetil-2-ciclopenteno-1-ona	6,32	958	-	0,29
Ácido hexanóico	8,67	1022	-	5,12
Nonanol	12,28	1103	1098	1,30
Octanoato de metila	13,15	1125	1127	9,32
Metilbenzaldeído	15,30	1176	1068	traços
Ácido octanóico	18,36	1244	-	69,74
Total quantificado				98,15

TR (min.) – tempo de retenção em minutos.

IR<sub>calc</sub> – índice de retenção calculado a partir dos tempo de retenção das substâncias eluídas por CG/EM e de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C<sub>8</sub> a C<sub>26</sub>).

IR<sub>lit</sub> - índice de retenção da literatura (Adams, 1995).

Conc. (%) - Concentrações calculadas em % de área da análise por CG/EM.

(-) – índice de retenção não descrito na literatura de referência (Adams, 1995).

A Figura 50 mostra o cromatograma obtido da análise do óleo essencial de jenipapo coletado em 2007.

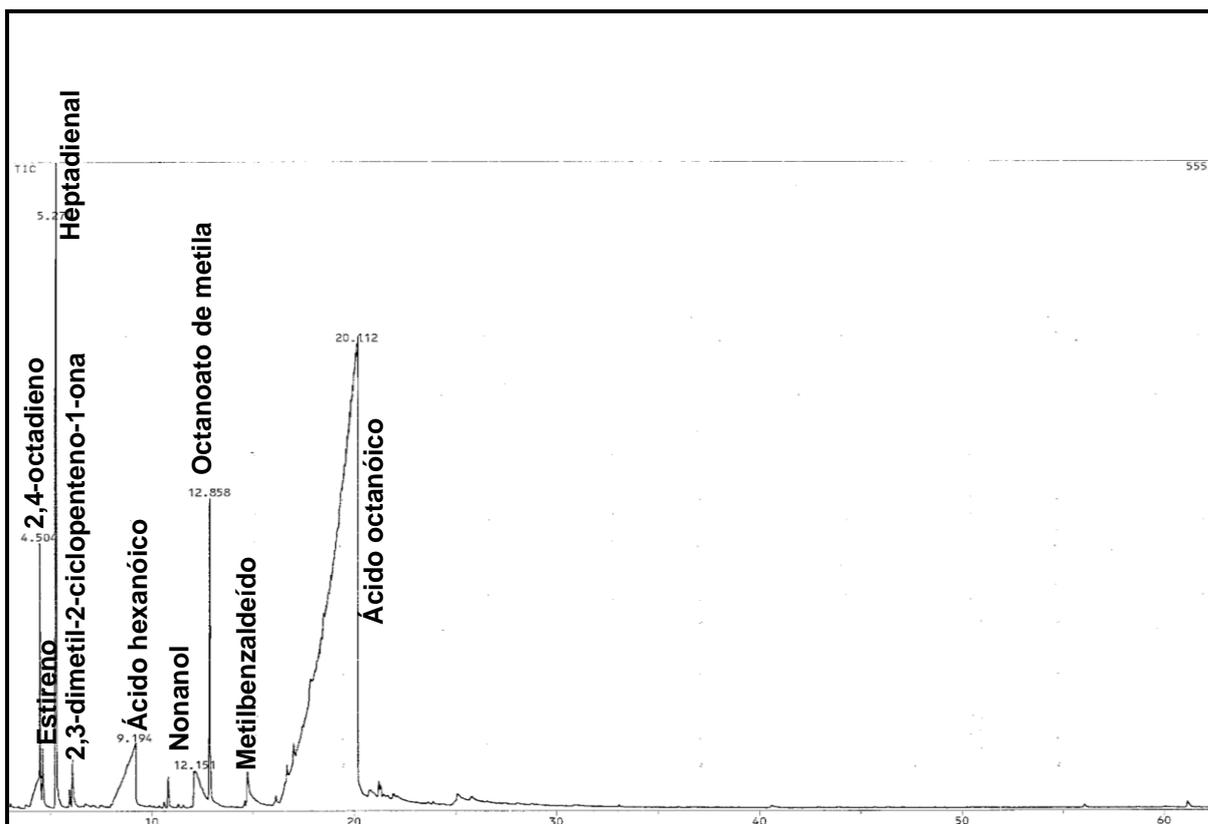


Figura 50 - Cromatograma obtido por CG/EM da fração volátil dos frutos de jenipapo coletado em fevereiro de 2007.

As substâncias identificadas na fração volátil dos frutos de jenipapo de 2007 encontram-se listadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Composição da fração volátil do jenipapo coletado em fevereiro de 2007.

Substância	TR (min.)	IR <sub>calc</sub>	IR <sub>lit</sub>	Conc. (%)
2,4-octadieno	4,50	894	-	2,78
Estireno	4,64	900	-	NQ
Heptadienal	5,27	926	-	4,88
2,3-dimetil-2-ciclopenteno-1-ona	6,09	955	-	NQ
Ácido hexanóico	9,19	1040	-	5,08
Não identificada	10,82	1075	-	NQ
Nonanol	12,15	1100	1098	1,97
Octanoato de metila	12,86	1120	1127	2,47
Metilbenzaldeído	14,73	1169	1068	NQ
Ácido octanóico	20,11	1289	-	82,83
Total quantificado				100,00%

TR (min.) – tempo de retenção em minutos.

IR<sub>calc</sub> – índice de retenção calculado a partir dos tempo de retenção das substâncias eluídas por CG/EM e de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C<sub>8</sub> a C<sub>26</sub>).

IR<sub>lit</sub> - índice de retenção da literatura (Adams, 1995).

Conc. (%) - Concentrações calculadas em % de área da análise por CG/EM.

(-) – índice de retenção não descrito na literatura de referência (Adams, 1995).

NQ – Não quantificado

A Figura 51 mostra o cromatograma obtido da análise do óleo essencial de jenipapo coletado em 2008.

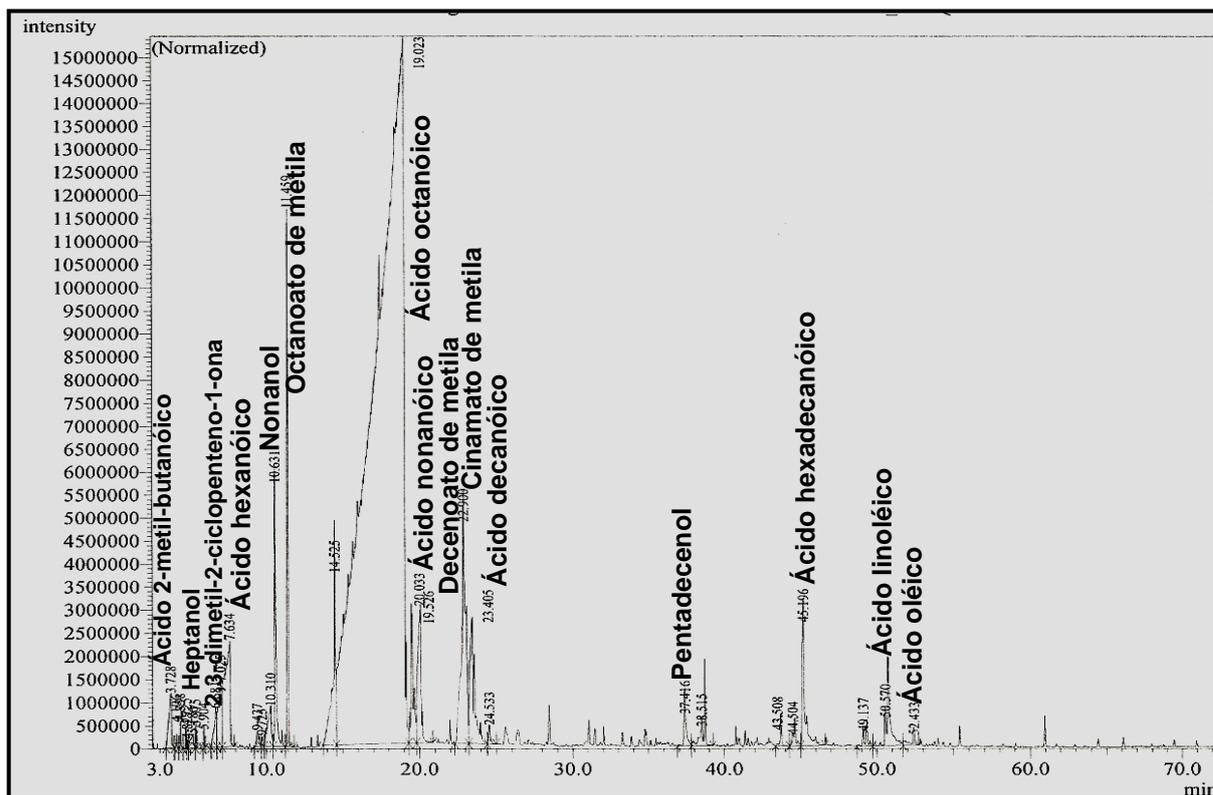


Figura 51 - Cromatograma obtido por CG/EM da fração volátil dos frutos de jenipapo coletado em fevereiro de 2008.

As substâncias identificadas na fração volátil dos frutos de jenipapo de 2008 encontram-se listadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Composição da fração volátil do jenipapo coletado em fevereiro de 2008.

Substância	TR (min.)	IR <sub>calc</sub>	IR <sub>lit</sub>	Conc. (%)
Ácido 2-metil-butanóico	3,73	864	-	0,55
2,4-octadieno	4,11	885	-	0,03
Heptanol	4,36	898	-	0,06
Heptadienal	4,73	916	-	0,04
2,3-dimetil-2-ciclopenteno-1-ona	5,38	943	-	0,05
Não Identificada	5,90	963	-	0,05
Ácido hexanóico	7,63	1020	-	2,14
Nonanol	10,63	1100	1098	1,47
Octanoato de metila	11,46	1122	1127	2,10
Ácido octanóico	19,02	1294	-	76,54
Decenoato de metila	19,53	1305	1306	1,24
Ácido nonanóico	20,03	1318	1280	1,58
Cinamato de metila	22,90	1383	1379	3,60
Ácido decanóico	23,40	1393	-	2,02
Pentadecenol	37,42	1742	-	0,41
Ácido hexadecanóico	45,20	1962	-	1,36
Ácido linoléico	50,57	2135	-	1,04
Ácido oléico	52,433	2196	-	0,18
Total quantificado				94,46%

TR (min.) – tempo de retenção em minutos.

IR<sub>calc</sub> – índice de retenção calculado a partir dos tempo de retenção das substâncias eluídas por CG/EM e de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C<sub>8</sub> a C<sub>26</sub>).

IR<sub>lit</sub> - índice de retenção da literatura (Adams, 1995).

Conc. (%) - Concentrações calculadas em % de área da análise por CG/EM.

(-) – índice de retenção não descrito na literatura de referência (Adams, 1995).

NQ – Não quantificado

Extratos voláteis de frutos apresentam uma variedade enorme de substâncias aromáticas em sua composição, embora algumas não tenham representatividade no aroma global percebido (LOPES *et al.*, 1999). Trabalho anterior sobre a investigação dos constituintes do aroma do jenipapo, utilizando cromatografia em fase gasosa-

olfatometria (CG-O), associada à análise por diluição de aroma AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis), apontou ácidos carboxílicos, como o ácido hexanóico e os ácidos 2- e 3-metil-butanóicos sendo os responsáveis pelas notas ácidas e seus respectivos ésteres, como os responsáveis pelas notas “frutal” e adocicada do jenipapo (PINTO *et al.*, 2006).

Segundo Franco *et al.* (2005), as diferenças qualitativas e quantitativas na composição volátil, observadas neste trabalho e em trabalhos anteriores (PINO *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2006) poderiam estar associadas às diferentes metodologias empregadas e/ou origens dos frutos.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, ácidos orgânicos, até compostos com enxofre. Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides (formados a partir da via do ácido chiquímico) ou de terpenóides (formados a partir do ácido mevalônico). Os compostos terpênicos freqüentemente encontrados nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos (SIMÕES *et al.*, 2001). Nas análises realizadas no presente trabalho com o óleo do jenipapo, verificou-se que derivados terpenoídicos não estavam presentes.

Óleos essenciais como, por exemplo, o de *Melaleuca alternifolia* (malaleuca) e o de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), possuem uma boa atividade antimicrobiana (HAMMER *et al.*, 2003; BOZIN *et al.*, 2007). O óleo de *Melaleuca alternifolia* possui em sua composição monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois, sendo que três componentes principais deste óleo são o terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpineno e

$\alpha$ -terpineno. No óleo essencial de alecrim predominam os monoterpenos em sua composição.

O óleo essencial de frutos de jenipapo difere da grande maioria dos óleos por apresentar em sua composição química uma grande quantidade de ácidos carboxílicos e seus ésteres e apenas traços de substâncias terpenoídicas, sendo o ácido octanóico o constituinte majoritário. Trabalhos como o de Borges e Rezende (2000) e Pino *et al.* (2005) descreveram a ocorrência de terpenos na composição da fração volátil dos frutos do jenipapo onde citam a presença do linalol, dentre outros terpenos, como eugenol e safrol, porém em baixas concentrações.

Vários trabalhos que avaliam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais citam, na grande maioria, os derivados terpenoídicos como os responsáveis por esses efeitos (PANIZZI *et al.*, 1993; ALIGIANNIS *et al.*, 2001; HAMMER *et al.*, 2003). Ácidos graxos e seus derivados, apesar de poucos trabalhos publicados, também podem apresentar atividade antimicrobiana. Esta propriedade estaria relacionada com a capacidade que os ácidos graxos têm de facilitar o transporte de prótons através da membrana bacteriana provocando diminuição do gradiente de próton, resultando em uma depleção da energia celular seguida de desnaturação de proteínas sensíveis a ácidos nucléicos e demais ácidos (MAROUNEK *et al.*, 2003).

Marounek *et al.* (2003) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de ácidos graxos C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> usando culturas de duas cepas de *Escherichia coli* crescidas em glicose. Dentre estes ácidos, o ácido caprílico (C<sub>8</sub>) e o ácido cáprico (C<sub>10</sub>) inibiram a utilização de glicose como substrato pela bactéria impedindo o crescimento bacteriano, sendo que os demais ácidos não tiveram nenhuma influência neste ensaio.

Um tipo de inflamação da glândula mamária da vaca, conhecida por mastite, pode ser causada por muitos fatores, sendo que as mastites classificadas em contagiosas são causadas principalmente pelas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Este tipo de doença infecciosa tem o maior impacto negativo na pecuária leiteira. O tratamento mais comum para a mastite bovina é o uso de antibióticos por infusão intramamária. Porém, as taxas de cura obtidas com este tipo de terapia são muito baixas e resíduos destes medicamentos podem estar presentes no leite podendo ser uma possível explicação para o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos que estão no mercado (NAIR *et al.*, 2005).

Como alternativa para tratamento deste tipo de inflamação mamária, ácidos graxos livres e seus monoglicerídeos foram empregados na terapêutica, em pesquisa realizada por Nair *et al.* (2005), aplicando ácido caprílico e monocaprilina para inativar patógenos responsáveis pela mastite bacteriana no gado. Os resultados indicaram que tanto o ácido caprílico como o seu monoglicerídeo foram eficazes contra os cinco tipos de patógenos usados no teste (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). Estas substâncias foram menos eficazes em relação à bactéria *E.coli* (Gram-negativa), o que poderia ser explicado pela diferença na constituição da parede celular da mesma, em relação às outras que são Gram-positivas.

A não alteração tanto física quanto organoléptica do fruto armazenado por cerca de um ano sob refrigeração, coletado em 2006, e a presença do ácido octanóico como componente majoritário no óleo essencial do jenipapo, direcionou o estudo para avaliação de uma possível atividade antimicrobiana e antioxidante. Este direcionamento foi corroborado após verificação da presença do ácido octanóico como componente majoritário no óleo essencial dos frutos do jenipapo. Conforme já

mencionado anteriormente, o ácido octanóico apresentou atividade antimicrobiana em pesquisas realizadas por Marounek *et al.* (2003).

#### 4.7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo

A partir de 1,8kg de fruto de *G. americana* obteve-se 579,2mg de óleo volátil (0,03% de rendimento). Este material foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana.

##### 4.7.2.1 Método da difusão em ágar – técnica do disco

A Tabela 15 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo e dos controles positivos pelo método da difusão em ágar.

Tabela 15 - Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo pelo método da difusão em ágar.

Microrganismos	Diâmetro do halo de inibição (mm) <sup>*</sup>			
	Óleo essencial de jenipapo (1µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Ceftriaxona (30 µg)	Fluconazol (25 µg)
<b>Gram-positivo</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA ATCC 25923	12,0 ± 0,00	22,0 ± 0,00	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 93	12,0 ± 1,41	24,0 ± 0,00	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	12,5 ± 0,71	22,0 ± 0,00	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	9,5 ± 0,71	24,0 ± 0,00	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE) 782	11,0 ± 0,00	28,0 ± 0,00	-	-
<b>Gram-negativo</b>				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,0 ± 0,00	25,0 ± 0,00	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 ESBL <sup>+</sup>	8,5 ± 0,71	13,0 ± 0,00	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9,5 ± 0,71	-	23,0 ± 0,00	-
<b>Fungo</b>				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20,0 ± 0,00	-	-	24,0 ± 0,00

<sup>\*</sup>Valores expressos como média ± desvio padrão da média de dois experimentos.

A formação dos halos de inibição pode ser observada através da Figura 52 para *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* MSSA.

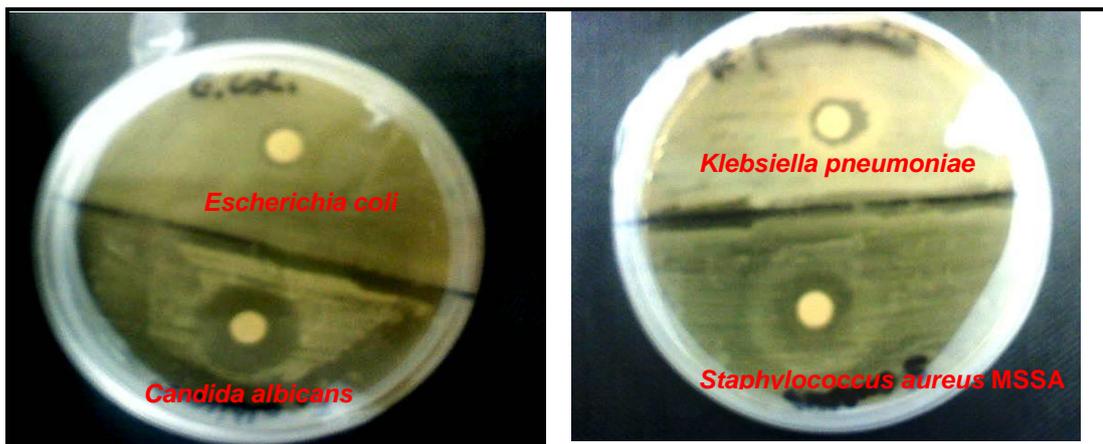


Figura 52 - Placas mostrando halo de inibição formado para *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* MSSA.

Pode-se observar que mesmo em uma concentração extremamente baixa adicionada ao disco (um micrograma), o óleo de jenipapo foi capaz de exercer uma atividade antimicrobiana, inclusive sobre amostras bacterianas reconhecidamente resistentes mesmo a antibióticos sintéticos, como é o caso do *S. aureus* MRSA, *E. faecium* VRE, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Em adição, esta atividade foi demonstrada também para *C. albicans* que apresentou um diâmetro do halo de inibição de 20mm.

Em muitos estudos, os diâmetros dos halos de inibição formados para o material testado são comparados com aqueles obtidos para antibióticos sintéticos. Segundo Janssen *et al.* (1986) o uso de antibióticos sintéticos neste tipo de teste é útil para controlar a sensibilidade do organismo testado, mas uma comparação da atividade antimicrobiana de óleo essencial e antibióticos não pode ser feita desta forma.

#### 4.7.2.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB)

As atividades antimicrobianas do óleo essencial de jenipapo, obtida através de microdiluição em caldo, expressa como CMI e CMB, estão dispostas na Tabela 16.

Tabela 16 - Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo pelo método de microdiluição em caldo, expressa como concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).

Microrganismos	Óleo essencial de jenipapo		Cloranfenicol	Ceftriaxona	Fluconazol
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>*</sup>	CMB ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>*</sup>	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>*</sup>	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>*</sup>	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>*</sup>
<b>Gram-positivo</b>					
<i>S. aureus</i> MSSA ATCC 25923	3,12 $\pm$ 0,00	6,25 $\pm$ 0,00	4,0 $\pm$ 0,00	-	-
<i>S. MRSA</i> 93	2,11 $\pm$ 0,88	6,25 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4,16 $\pm$ 1,81	6,25 $\pm$ 0,00	4,0 $\pm$ 0,00	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5,21 $\pm$ 1,81	9,38 $\pm$ 4,42	8,0 $\pm$ 0,00	-	-
<i>E. faecium</i> (VRE) 782	5,21 $\pm$ 1,81	6,25 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	-	-
<b>Gram-negativo</b>					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6,25 $\pm$ 0,00	9,38 $\pm$ 4,42	2,0 $\pm$ 0,00	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 ESBL <sup>+</sup>	8,33 $\pm$ 3,61	6,25 $\pm$ 0,00	4,0 $\pm$ 0,00	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8,33 $\pm$ 3,61	9,38 $\pm$ 4,42	-	16,0 $\pm$ 0,00	-
<b>Fungo</b>					
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2,61 $\pm$ 0,88	4,69 $\pm$ 2,21	-	-	1,0 $\pm$ 0,00

\* Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de três experimentos.

Os microrganismos empregados neste teste foram selecionados como representantes das classes dos Gram-positivos (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *E. faecalis*, *E. faecium*), Gram-negativos (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) e fungo (*C. albicans*).

O óleo exibiu uma atividade extremamente forte contra todos os microrganismos testados possuindo um espectro de ação amplo. O óleo foi mais ativo contra bactérias Gram-positivas (valores de CMI = 2,11-5,25 $\mu\text{g/ml}$ ) e fungo (valor de CMI = 2,61 $\mu\text{g/ml}$ ), como evidenciado pelos valores de CMI baixos. Além disso, alguns valores de CMI e CMB são muito próximos mostrando uma significativa ação bactericida do óleo essencial de jenipapo.

De acordo com Aligiannis *et al.* (2001), materiais de plantas mostrando valores de CMI até 0,5mg/ml são considerados inibidores fortes, 0,6-1,5mg/ml inibidores moderados e acima de 1,6mg/ml inibidores fracos. Assim, nossos

resultados mostraram que valores de CMI e CMB do óleo essencial de jenipapo foram significativamente menores do que os valores encontrados para outros óleos que foram considerados terem uma boa atividade inibitória em outros estudos, como os óleos de *Origanum scabrum* e *Origanum microphyllum* (ALIGIANNIS *et al.*, 2001) e o óleo essencial de *Coriandrum sativum* (MATASYOH *et al.*, 2009).

É interessante notar que *S. aureus* MRSA, *E. faecium* VRE, *K. pneumoniae* ESBL<sup>+</sup> e *P. aeruginosa*, amostras bacterianas reconhecidamente resistentes mesmo a antibióticos sintéticos, foram encontradas serem muito suscetíveis ao óleo essencial de jenipapo (PANIZZI *et al.*, 1993; ALIGIANNIS *et al.*, 2001; MATASYOH *et al.*, 2009).

#### 4.7.2.3 Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de jenipapo

A atividade antioxidante do óleo essencial de jenipapo foi avaliada pelo método de seqüestro de radicais utilizando o radical livre DPPH<sup>•</sup> em duas concentrações diferentes (0,1mM e 0,3mM). A atividade antioxidante do óleo essencial de *G. americana* foi comparada com a atividade do padrão antioxidante comercial BHT na mesma concentração da amostra. Os resultados encontrados para este ensaio são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Atividade antioxidante (%) do óleo essencial de *G. americana* e do padrão BHT<sup>a</sup>.

Amostra (1mg/ml)	Atividade Antioxidante (%)	
	DPPH 0,1mM	DPPH 0,3mM
Óleo de Jenipapo	66,83 ± 3,74	7,69 ± 2,08
BHT	91,86 ± 0,99	91,71 ± 0,62

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão da média de três experimentos.

Os resultados acima mostrados indicam que a atividade antioxidante do óleo de jenipapo aumentou com a diminuição da concentração do DPPH. Na concentração de 0,1mM de DPPH, o óleo teve uma atividade de 66,83% e de 7,69%

na concentração de 0,3mM de DPPH. O padrão BHT mostrou uma atividade antioxidante significativamente superior à do óleo. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 53.

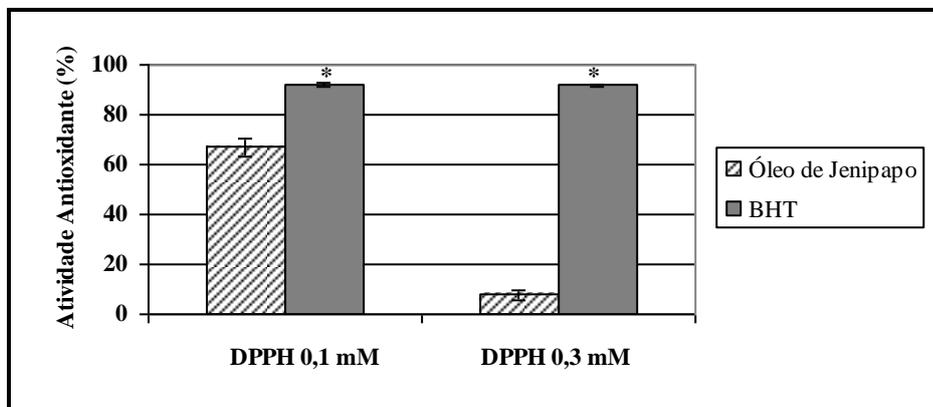


Figura 53 - Porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial de *G. americana* e do padrão BHT na concentração de 1mg/ml usando duas concentrações diferentes para o radical DPPH (0,1mM e 0,3mM). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=3). \* $p < 0,05$ . Teste *t* de Student.

O método do DPPH<sup>\*</sup> é muito usado por ser simples e rápido. A capacidade de substâncias antioxidantes presentes em um extrato ou óleo essencial em seqüestrar o radical livre DPPH<sup>\*</sup> após certo tempo corresponde inversamente ao DPPH<sup>\*</sup> remanescente em solução (WEI & SHIBAMOTO, 2007). Desta forma, quando se utilizou uma concentração mais baixa de DPPH (0,1mM), todas as moléculas de DPPH reagiram com substâncias antioxidantes presentes no óleo e assim apresentaram uma porcentagem de atividade antioxidante maior do que a encontrada para a concentração de 0,3mM de DPPH.

## 5 CONCLUSÕES

A avaliação fitoquímica e farmacológica dos frutos de *Genipa americana* realizada neste trabalho permitiu um maior conhecimento sobre a natureza dos metabólitos secundários presentes no jenipapo, assim como de suas possíveis propriedades funcionais.

✓ No estudo de obtenção do extrato metanólico dos frutos de *G. americana* por três técnicas diferentes (maceração, Soxhlet e ultrassom), foi observado que os rendimentos obtidos com cada uma foram muito próximos sendo que a extração por Soxhlet teve um rendimento um pouco maior do que as outras duas. Contudo, na extração por ultrassom utilizou-se um tempo menor e temperaturas baixas, evitando assim que pudesse haver degradação de substâncias de interesse no extrato.

✓ Na comparação da atividade antioxidante dos extratos obtidos pelas três técnicas, pelo método do DPPH, os extratos foram tão eficazes quanto o padrão *Ginkgo biloba*, porém menos potentes no efeito antioxidante. Quando comparados entre si, o extrato obtido por maceração mostrou ser menos potente do que aqueles obtidos por Soxhlet e por ultrassom, sendo que os últimos não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os valores de  $CE_{50}$  obtidos.

✓ Com relação ao conteúdo de compostos fenólicos, presentes nos extratos obtidos pelas três técnicas, foi observado um baixo conteúdo o que poderia, em parte, explicar a baixa atividade antioxidante encontrada para os três extratos,

✓ Na avaliação do perfil cromatográfico por CCD e CLAE dos extratos metanólicos obtidos pelas três técnicas, foi possível verificar que, nas condições de análise, não

houve diferenças na composição química dos mesmos, porém diferenças quantitativas foram observadas.

✓ Na fração hexânica obtida a partir do extrato metanólico, foram identificados principalmente ácidos graxos e esteróides como a tremulona, campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, além do ácido cinâmico, descritos pela primeira vez neste trabalho.

✓ Na análise da fração em diclorometano foi identificada a 6,7-dimetóxicumarina, substância biologicamente ativa, encontrada em outras Rubiaceae e descrita aqui para *G. americana* pela primeira vez.

✓ Na comparação das frações voláteis dos frutos de *G. americana* coletados em três épocas diferentes foi observado que não houve alteração da composição química do fruto decorrente do armazenamento sob refrigeração e nem devido a diferentes épocas de colheita.

✓ De acordo com o que foi observado através do perfil cromatográfico por CG/EM, o óleo essencial de jenipapo apresentou como constituintes majoritários nas três frações voláteis (2006, 2007 e 2008) os ácidos octanóico, hexanóico e heptadienal, nonanol e o octanoato de metila.

✓ Na avaliação da atividade antimicrobiana, o óleo essencial de jenipapo exibiu uma atividade extremamente forte contra todos os microrganismos testados possuindo um espectro de ação amplo, inclusive sobre amostras bacterianas reconhecidamente resistentes mesmo a antibióticos sintéticos, como é o caso do *S. aureus* MRSA, *E. faecium* VRE, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Além disso, os valores de concentrações encontrados para o óleo de jenipapo foram menores do

que de outros óleos encontrados na literatura e possuidores de atividade antimicrobiana.

✓ A atividade antimicrobiana do óleo essencial de jenipapo poderia estar possivelmente relacionada com a presença de ácidos em sua composição, principalmente do ácido octanóico que foi o constituinte majoritário e que já foi visto na literatura possuir atividade antimicrobiana.

✓ Com relação à atividade antioxidante do óleo essencial de jenipapo pelo método do DPPH foi observado que dependendo da concentração utilizada do radical livre o óleo apresenta uma alta ou baixa atividade antioxidante. Isto é de grande importância já que não há uma padronização da metodologia o que pode acarretar em uma conclusão errônea com relação à capacidade que uma planta tem de possuir ou não ação antioxidante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 1995, 469 p.

AKAO, T., KOBASHI, K., ABURASA, M. Enzymatic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 17, p. 1573–1576, 1994.

ALBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, J.P.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 261-265, 2004.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P.C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**, v. 82, p. 575-582, 2003.

ALMOG, J.; COHEN, Y.; AZOURY, M.; HAHN, T. Genipin - a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity. **Journal of Forensic Sciences**, v. 49, n. 2, p. 255-257, 2004.

ALVES, G.L. **Compostos voláteis importantes para o aroma de jenipapo (*Genipa americana*) e murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich)**. 2004. 136 f. Dissertação (Doutorado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

BANDONI, A. **Los Recursos Vegetables Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores**. Buenos Aires: CYTED, 2003, 417p.

BARBOZA, J.C.S; SERRA, A.A. Ultrassom (I): Influência do ultrassom na química. **Química Nova**, v. 15, n. 4, p. 302-316, 1992.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 3. ed. São Paulo: UNICAMP, 480 p., 2007

BOLZANI, V.S.; YONG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S. & LOPES, M.N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Development in Phytochemistry**, v. 5, p. 19-31, 2001.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. **Technol.**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BORGES, ERIC S.; REZENDE, CLAUDIA M. Main aroma constituents of genipap (*Genipa americana* L.) and bacuri (*Platonia insignis* M.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 1, p. 71-74, 2000.

BORGES-ARGÁEZ, R.; BAIZABAL-MEDINA, L.; MAY-PAT, F.; PENÃ-RODRIGUEZ, L.M. Merilactone, an unusual C<sub>19</sub> metabolite from the root extract of *Chiococca alba*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 228-231, 2001.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and Antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7879-7885, 2007.

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

BYUNG-CHUL, K.; HONG-GYUM, K.; SIN-AE, L.; SEUNGHWAN, L.; EUN-HEE, P.; SEONG-JIN, K.; CHANG-JIN, L. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 9, p. 1398-1407, 2005.

CALLAWAY, J.C.; RAYMON, L.P.; HEARN, L.P.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, C.S.; MASH, G.S. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmana alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, p. 492-497, 1996.

CANINI, A.; ALESANI, D.; D'ARCANGELO, G.; TAGLIATESTA, P. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 584-590, 2007.

CARBONEZI, C.A.; MARTINS, D.; YOUNG, M.C.M.; LOPES, M.N.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 51, p. 781-785, 1999.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CHIQUIERI, A; DI MAIO, F.R.; PEIXOTO, A.L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na *Flora Brasiliensis* de Martius. **Rodriguesia**, v. 55, n. 84, p. 47-57, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, vol.4, p.515-519. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, completado por Leonandia Azeredo, 1969.

CRAVO, A.B. **Frutas e Ervas que Curam – Usos, Receitas e Dosagens**. 5. ed. São Paulo: Hemus, p. 130 e 168, 1995.

CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. 5. ed. São Paulo: Editora Bewrtrand Ltda, p. 402, 1995.

DELPRETE, P.G.; SMITH, L.B.; KLEIN, R.M. **Rubiáceas: Flora Ilustrada Catarinense**. Santa Catarina: Ademir Reis, p. 353-360, 2005. 2. v.

DEULOFEU, V. Chemical compounds isolated from *Banisteriopsis* and relative species. **Ethnopharmacologic Search**, v. 18, p. 393-402, 1967.

DJERASSI, C.; GRAY, J.D.; KINCL, F. Isolation and Characterization of Genipin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 25, p. 2174 –2177, 1960.

DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M. Mass-spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. **Journal of American Chemistry Society**, v. 85, p. 3688-3699, 1961.

EL-ABBADI, N.; WENIGER, B.; QUIRON, J.C.; ANTON, N. New alkaloids of *Chiococca alba*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 603-604, 1989.

FRANCO, M.R.B.; JANZANTTI, N.S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 4, p. 358-371, 2005.

FREEDLAND, C.S.; MANSBACH, R.S. Behavioural profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 54, p. 183-194, 1999.

GAZDA, V.E., GOMES-CARNEIRO, M.R., BARBI, N. S., PAUMGARTTEN, F.J.R. Avaliação do perfil toxicológico do extrato etanólico das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitch. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, p. 136, 2005.

GAZDA, V.E., GOMES-CARNEIRO, M.R., BARBI, N.S., PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 187-195, 2006.

GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 167-169, 2003.

GERMANO FILHO, P. Estudos Taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl (Rubiaceae, Rondeletieae). **Rodriguésia**, v. 50, n. 76/77, p. 49-75, 1999.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 89-98, 2005.

GROB, C.S.; MCKENNA, D.J.; BRITO, J.C.; NEVES, E.S.; OBERLANDER, G.; SAIDE, O.L.; LABIGALINI, E.; TALCA, C.; MIRANDA, C.T.; STRASSMAN, R.J.; BOONE, K.B. Human psychopharmacology of ayahuasca a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. **Mental Disease**, v. 184, p. 86-94, 1996.

GUARNACCIA, R.; MADYASTHA, K.M.; TEGTMEYER, E.; COSCIA, C.J. Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 5125-5127, 1972.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 853-860, 2003.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 278p., 1984

HIROYUKI, T.; TAKEDA, Y.; HIROSHI, N.; KANOMI, A.; OKUDA, T & PUFF, C. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceae Plants Containing iridoid Glycosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

HONG H., KIM B. Mixed lineage kinase 3 connects reactive oxygen species to c-Jun NH2-terminal kinase-induced mitochondrial apoptosis in genipin-treated PC3 human prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, p. 307-312, 2007.

HUI, L.; BO, C.; SHOUZHUO, Y. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, p. 295-300, 2005.

JACQUES, R.S.; FREITAS, L.S.; PÉREZ, V.F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA, J.V., CARAMÃO, E.B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 6-12, 2007.

JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; SVENDSEN, A.B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the tests methods. **Planta Medica: Journal of the Medicinal Plant Research**, v.55, n.5, p.395-8, 1987.

JIANYONG, W.; LIDONG, L.; FOO-TIM, C. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 347-352, 2001.

JIAN-BING, JI; XIANG-HONG, L.; MEI-QIANG, C.; ZHI-CHAO, X. Improvement of leaching process of geniposide with ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 5, p. 455-462, 2006.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KIM, B.C.; KIM, H.G.; LEE, S.A.; LIM, S.; PARK, E.H.; KIM, S.J.; LIM, C.J. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochem. Pharm.** V. 70, p. 1398–1407, 2005.

KITANO, A.; SAIKA, S.; YAMANAKA, O.; IKEDA, K.; REINACH, P.S.; NAKAJIMA, Y.; OKADA, Y.; SHIRAI, K.; OHNISHI, Y. Genipin suppresses subconjunctival fibroblast migration, proliferation and myofibroblast transdifferentiation. **Ophthalmic Res.**, v. 38, p. 355–360, 2006.

KOO, HYE-JIN; SONG, YUN SEON; KIM, HEE-JEONG; LEE, YONG-HA; HONG, SUNG-MIN; KIM, SU-JUNG; KIM, BYUNG-CHUL; JIN, CHANGBAE; LIM, CHANG-JIN; PARK, EUN-HEE. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, n. 2-3, p. 201-208, 2004.

KORN, M.; PEREIRA, M.G.; BORGES, S.S. Algumas aplicações analíticas dos ultrasons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, n. 96, p. 51-55, 2005.

LEMAIRE, I.; ASSINEWE, V.; CANO, P.; AWANG, D.V.C.; ARNASON, J.T. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 109-115, 1999.

LEONTOWICZ, H.; GORINSTEIN, S.; LOJEK, A.; LEONTOWICZ, M.; CIZ, M.; SOLIVA-FORTUNY, R.; PARK, Y.; JUNG, S.; TRAKHTENBERG, S.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 603-610, 2002.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1003-1008, 2007.

LOPES, D.C.; FRAGA, S.R.; REZENDE, C.M. Principais substâncias responsáveis pelo aroma de mangas comerciais brasileiras identificadas por cromatografia gasosa de alta resolução/olfatometria/espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 31-36, 1999.

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KOLODZIEJCZYK, P.P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1732-1738, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. 3. ed. São Paulo: Plantarum, p. 302, 2000.

LV, H.; SUN, H.; SUN, W.; LIU, L.; WANG, P.; WANG, X.; CAO, H. Pharmacokinetic studies of a Chinese triple herbal drug formula. **Phytomedicine**, v. 15, p. 993-1001, 2008.

MAROUNEK, M.; SKRIVANOVÁ, E.; RADA, V. Susceptibility of *Escherichia coli* to C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> fatty acids. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 6, p. 731-735, 2003.

MATASYOH, J.C.; MAIYO, Z.C.; NGURE, R.M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 526-529, 2009.

MELECCHI, M.I.S.; PÉRES, V.F.; DARIVA, C.; ZINI, C.A.; ABAD, F.C.; MARTINEZ, M.M.; CARAMÃO, E.B. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 242-250, 2006.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MONDELLO, F.; BERNARDIS, F. D.; GIROLAMO, A.; CASSONE, A.; SALVATORE, G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and –resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 158, 2006.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T. **Botânica Econômica Brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., p. 152 e 179, 1995.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N. **A Medicinal Plants of Brazil**. Algonac: Robert A. DeFillipps, p. 294-300, 2000.

NAIR, M.K.M.; JOY, J.; VASUDEVAN, P.; HINCKLEY, L.; HOAGLAND, T.A.; VENKITANARAYANAN, K.S. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3488-3495, 2005.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6 ed. Approved standard M7-A6, Pensilvania, EUA, 2003.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 273-278, 2007.

OKADA, K.; SHODA, J.; KANO, M.; SUZUKI, S.; OHTAKE, N.; YAMAMOTO, M.; TAKAHASHI, H.; UTSUNOMIYA, H.; ODA, K.; SATO, K.; WATANABE, A.; ISHII, T.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; YOKOI, T.; YOSHIZATO, K.; SUGIYAMA, Y.; SUZUKI, H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **Am. J. Physiol. Gastrointest.**, v. 292, p. 1450-1463, 2007.

ONO, M.; UENO, M.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1342-1344, 2005.

ONO, M.; ISHIMATSU, N.; MASUOKA, C.; YOSHIMITSU, H.; TSUCHIHASHI, R.; OKAWA, M.; KINJO, J.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 632-634, 2007.

ORTEGA, R.M. Importance of functional foods in the Mediterranean diet. **Public Health Nutrition**, v. 9, n. 8A, p. 1136-1140, 2006.

ORTUÑO, A.; BOTÍA, J.M.; FUSTER, M.D.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; DEL RÍO, J.A. Effect of scoparone (6,7-Dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of Tangelo Nova, *Citrus paradise*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2740-2743, 1997.

PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 299-301, 2001.

PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 167-170, 1993.

PERAZZO, F.F. in Carvalho, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd, p.423, 2004.

PERSON, C. Phylogeny of Gardenieae (Rubiaceae) base don chloroplast DNA sequences from the *rps16* intron and *trnL*(UAA)-F(GAA) intergenic spacer. **Nord. J. Bot.**, v. 20, n. 3, p. 257-269, 2000.

PERSON, C. *Agouticarpa*, a new neotropical genus of tribe Gardenieae (Rubiaceae). **Brittonia**, v. 55, p. 176-201, 2003.

PINO, J.; MARBOT, R.; VAZQUEZ, C. Volatile constituents of genipap (*Genipa americana* L.) fruit from Cuba. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 6, p. 583-586, 2005.

PINTO, A.B.; GUEDES, C.M.; MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C.A.B. Volatile constituents from headspace and aqueous solution of genipap (*Genipa americana*) fruit isolated by the solid-phase extraction method. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 3, p. 488-491, 2006.

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJIMIRSADEGHI, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 2-24, 2007.

RAGUSA-NETTO, J. Abundance and frugivory of the Toco toucan (*Ramphastos toco*) in a gallery forest in Brazil's southern Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1A, p. 133-142, 2006.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification. **Opera Botanica Belgica**, v. 1, p. 1-272, 1988.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SALISOVÁ, M.; TOMA, S.; MASON, T.J. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 4, p. 131-134, 1997.

SCHINOR, E.C.; SALVADOR, M.J.; TURATTI, I.C.C.; ZUCCHI, O.L.A.D.; DIAS, D.A. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 415-421, 2004.

SHAU-CHUN, W.; TING-YU, T.; CHIH-MIN, H.; TUNG-HU, T. Review Gardenia herbal active constituents: applicable separation procedures. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 193-202, 2004.

SHOJI, K.; JOJI, M. Hair preparations containing extracts of unripened fruits of *Genipa americana*. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 8 p., 1996

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 833 p., 2001

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SUZUKI, Y., KONDO, K., IKEDA, Y., UMEMURA, K. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. **Planta Medica**, v. 67, p. 807-810, 2001.

SPIER, A.P.; BAVARESCO, C.S.; WYSE, A.T.S.; CARVALHO, D.; SARKIS, J.J.F. Effects of resveratrol and purple grape juice on nucleotide hydrolysis by adult rat serum. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 565-571, 2007.

TAKEUCHI, S.; GOTO, T.; MIKAMI, K.; MIURA, K.; OHSHIMA, S.; YONEYAMA, K.; SATO, M.; SHIBUYA, T.; WATANABE, D.; KATAOKA, E.; SEGAWA, D.; ENDO, A.; SATO, W.; YOSHINO, R.; WATANABE, S. Genipin prevents fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality through the suppression of TNF-alpha production. **Hepatol. Res.**, v. 33, p. 298-305, 2005.

TALLENT, W.H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. **Tetrahedron**, v. 20, n. 7, p. 1781-7, 1964.

TIAN-SHUNG, W.; DAU-MIN, L.; LI-SHIAN, S.; AMOORU, G.D.; PING-CHUNG, K.; YAO-HAU, K. Cytotoxic anthraquinones from the stems of *Rubia wallichiana* DECNE. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 8, p. 948-950, 2003.

TRAORÉ, M.; JAROSZEWSKI, J.W.; OLSEN, C.E.; OUÉDRAOGO, J.B.; PIERRE, G.I.; NACOULMA, O.G.; GUIGUEMDÉ, T.R.; CHRISTENSEN, S.B. A new oxygenated ursane derivative from *Canthium multiflorum*. **Planta Medica**, v. 74, p. 560-562, 2008.

UEDA, S.; IWAHASHI, Y. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 6, p. 1677-1680, 1991.

VALACHOVIC, P.; PECHOVA, A.; MASON, T.J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 111-117, 2001.

VIDALENC, D. Method for preparing a composition for drawing a non-permanent tattoo comprising dye from *Genipa americana* fruit juice. **PCT Int. Appl.**, 21 p., 2005.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

Wang, S., Tseng, T., Huang, C., Tsai, T. Gardenia herbal active constituents: applicable separation procedures. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 193-202, 2004.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1737-1742, 2007.

XIAO-PING, H.; JANG-WOO, S.; JING-HUA, W.; JUNG-HYO, C.; JIN-YOUNG, S.; CHONG-KWAN, C.; CHANG-GUE, S. Antioxidative and hepatoprotective effect of CGX, an herbal medicine, against toxic acute injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 51-55, 2008.

YAMAGUCHY, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAJO, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.

YAMAMOTO, M.; MIURA, N.; OHTAKE, N.; AMAGAYA, S.; AISHIGE, T.; SASAKI, H.; KOMATSU, Y.; FUKUDA, K.; ITO, T.; TERASAWA, K. Genipin, a Metabolite Derived From the Herbal Medicine Inchin-ko-to, and Suppression of Fas-Induced Lethal Liver Apoptosis in Mice. **Gastroenterology**, v. 118, p. 380-389, 2000.

YESILYURT, V.; HALFON, B.; ÖZTÜRK, M.; TOPÇU, G. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 31-39, 2008.

YUNG-HUSAN, C.; FANG-RONG, C.; CHIN-CHUNG, W.; MING-HON, Y.; CHIH-CHUANG, L.; HUI-CHI, H.; YAO-HAUR, K.; YANG-CHANG-WU. New cytotoxic 6-oxygenated 8,9-dihydrofurocoumarins, hedyotiscone A-C, from *Hedyotis biflora*. **Planta Medica**, v. 72, p. 75-78, 2006.