

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA**

ROSILANE RAMOS GRAÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE AMAZÔNICA *Licaria puchury-major*
(MART.) KOSTERM.**

Manaus-AM
2010

ROSILANE RAMOS GRAÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE AMAZÔNICA *Licaria puchury-major*
(MART.) KOSTERM.**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e
Recursos Naturas da Amazônia para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia da
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Orientador: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva
Coorientadora: Prof.^a Dra. Antonia Souza Queiroz

Manaus-AM
2010

Ficha Catalográfica

G729a Graça, Rosilane Ramos
Avaliação da atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana da espécie amazônica *licaria puchury-major* (mart.) kosterm / Rosilane Ramos Graça. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas - UEA, 2010.
145 p. : il.

Dissertação – Título de Mestre - Universidade do Estado do Amazonas - UEA, 2010.

Orientador: Prof^o. Dr^o Ademir Castro e Silva.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Antonia Souza Queiroz.

1. Antioxidante 2. Atividade citotóxica 3. Botânica I.
Título.

CDU: 581.6

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária
Sheyla Lobo Mota / CRB 484

PARECER

Os membros da Banca Examinadora, designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a arguição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **ROSILANE RAMOS GRAÇA**, sob o título **Avaliação da Atividade Antioxidante, Citotóxica e Antimicrobiana da Espécie Amazônica *Licaria puchury-major* (MART.) KOSTERM**, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Após análise do referido trabalho e arguição da candidata, os membros são de parecer pela **APROVAÇÃO** da dissertação.

Manaus, 31 de Agosto de 2010.

Dr. Ademir Castro e Silva
Presidente da Banca e Orientador
(Universidade do Estado do Amazonas - UEA)

Dr. Emerson Silva Lima
(Universidade Federal do Amazonas - UFAM)

Dra. Helena Camarão
(Universidade do Estado do Amazonas - UEA)

DEDICATÓRIA

A Deus, pela minha vida; aos meus pais, Antonio Lourenço Graça (in memoriam) e Iolanda Ramos Graça; ao meu filho, Francélio Filho; ao meu marido Francélio Costa; a todos os borbenses e em especial aos coletores de puxuri; e a todos AQUELES QUE REALMENTE ME AJUDARAM na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus:

Por ter guiado meus passos e fortalecer-me em todas as fases de minha vida.

Aos meus familiares:

Aos meus pais, Antonio Lourenço da Graça (in memoriam) e Iolanda Ramos Graça, pelo incentivo, educação e compreensão.

Ao meu filho Francélio Filho, por compreender a minha ausência.

A meu marido, Francélio Costa, pela ajuda financeira.

À minha tia Izilda Ramos e família por me acolherem.

Aos avôs do meu filho, Nelson Mathias Costa e Nazinha Costa, por cuidarem e educarem na minha ausência.

Às minhas irmãs: Aparecida, Leonor, Ilane, Gerlane e Lauren; aos meus irmãos: Mario José e Wellington, pela amizade, amor, companheirismo e paciência e por acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas pela ajuda, especialmente ao Joaquim Fidel.

Aos meus primos José Carlos, Cristiane e Marluce Graça, pela ajuda, incentivo e por me acompanharem na coleta.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA):

Ao meu orientador, Dr. Ademir Castro e Silva, por me aceitar como sua aluna e acreditar em mim desde a época da graduação.

À Dra. Antonia Souza, pela amizade, conselhos, ensinamentos e ajuda.

À Prof. Dra. Sandra Patrícia Zanotto.

À amiga Carla Maria de Souza Braga pelos empréstimos de livros e incentivo na preparação e durante o mestrado.

À Coordenação, funcionários, professores e amigos (as) (Em especial: Professora Helena, Bacelar e Dolores, do Curso de Biotecnologia e Recursos Naturais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM):

Pela concessão da bolsa de estudos durante o período do curso.

Em especial : À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (Faculdade de Farmácia):

Ao colaborador Dr. Emerson Silva Lima e toda a sua equipe (sempre atenciosos durante os experimentos), e por me aceitar em seu laboratório.

Ao amigo Arleison de Souza Lima.

À Professora Dra. Francisca Simas e toda a sua equipe por colaborarem com o meu trabalho e pela consideração e atenção.

À Msc. Joelma Moreira Alcântara.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas - INPA:

Ao Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro por me aceitar no seu laboratório.

Ao Dr. Ézio Sargentini.

Em especial à amiga Rosana Carvalho, pelo apoio e amizade.

Aos borbenses:

Ao Sr. Jacó (coletor de puxuri), pelas preciosas informações e por me acompanhar em todas as coletas.

Ao Sr. Guilherme Buzaglo e família, pelas preciosas informações e por me conceder material de seu sítio.

Ao Professor Osvaldo pelas preciosas informações e por me acompanhar durante a coleta.

À Sra. Bernadete e ao Sr. Tupinanbá Saraiva, por me receberem em suas casas e me cederem material, todas as vezes em que precisei.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Agradecimento especial aos meus pais do céu

(Música: Leonardo Sullivan)

Obrigado!

Obrigado pelo tudo que me deste

E apesar dos sofrimentos e por tudo que passei

Obrigado pela força pra viver

Nesta longa caminhada que você me acompanhou

Na estrada você nunca me deixou

Pra você não tem racismo, não tem branco, não tem negro

Todos são iguais merecem o seu amor

Trago dentro do meu peito uma imagem de luz

O teu nome é JESUS

É ele sempre quem me diz

Que depois da luta a gente pode ser feliz

Obrigado, pelo teto

Obrigado, pelo pão

Que hoje eu posso dividir com o meu irmão

Obrigado Senhor por tudo.

*A confiança da Salvação em Deus
Está presente no coração daqueles que perseveram
Em sua caminhada de fé.
Por isso, quero dizer no íntimo do meu ser:
“Obrigado por estar sempre comigo, Senhor”!
Que o Espírito Santo continue agindo em mim,
Iluminando sempre os meus passos e
Despertando tudo o que de bom tenho
Em meu ser, por meio dos meus trabalhos
Realizados pelas minhas mãos.*

RESUMO

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações são capazes de inibir ou retardar a oxidação de um substrato oxidável. A atividade citotóxica detecta compostos bioativos e visa avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos. A atividade antimicrobiana abre perspectivas no desenvolvimento de antimicrobiano eficaz para o tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos. Nesse contexto foi realizada pesquisa das partes botânicas da espécie amazônica *Licaria puchury-major*, endêmica de Borba-AM, tendo como objetivo determinar as atividades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana. A quantificação dos fenólicos totais foi feita pelo método de Folin Ciocateau; para atividade antioxidante os métodos foram DPPH[•], ABTS^{•+}, sistema β -caroteno/ácido linoleico (LPO). Os ensaios citotóxicos foram o de letalidade com *A. salina* e o teste hemolítico sobre os eritrócito de camungongos (*Mus musculus Swiss*). Para atividade antimicrobiana, utilizaram-se os micro-organismos *S. aureus*, *M. Smegimates*, *B. cereus*, *E. coli* e *C. albicans*. As amostras testadas foram os óleos essenciais das flores e folhas, com seus respectivos hidrolatos, os extratos em DCM e MeOH das folhas, os extratos aquosos das folhas, sementes, caules e galhos finos e grossos; chás: sementes, folhas, galhos grossos, finos e folhas trituradas. Nos resultados da avaliação antioxidante, a amostra que apresentou maior teor de fenólicos totais foi o óleo essencial das folhas (17,63±0,51mg/EAG). No método DPPH a amostra que apresentou melhor atividade de sequestro de radicais foi o óleo essencial das folhas (CI₅₀ = 6,81µg/mL); e, no método ABTS, os extratos aquosos do caule (CI₅₀ = 2,66µg/mL) e o óleo essencial das folhas (CI₅₀ = 4,63µg/mL). No método LPO as amostras que apresentaram maior capacidade de inibir a oxidação foram: extrato em DCM das folhas (61,05±2,54µg/mL), os extratos aquosos do caule (60,82±5,53µg/mL), o extrato em MeOH das folhas (54,55±2,36µg/mL) e o óleo essencial das folhas (53,88±1,93µg/mL). Não apresentaram citotoxicidade frente à *A. salina* todas as amostras dos extratos aquosos e dos hidrolatos (>2000µg/mL). E, frente ao teste hemolítico, o melhor resultado foi o do extrato aquoso do caule, não apresentando hemólise em nenhuma concentração, seguido pelos óleos essenciais das flores e folhas, que apresentaram hemólise na concentração (1µg/mL), sendo considerada baixa a citotoxicidade. Na atividade antimicrobiana contra as bactérias *B. cereus* e *S. aureus*, as amostras que melhor inibiram o halo foram os óleos essenciais das flores e folhas, extratos das folhas em DCM e o aquoso da semente; e contra a levedura *C.albicans* os extratos em DCM e os aquosos do caule e semente. Conclui-se que a *L. puchury-major* possui potencial antioxidante e antimicrobiano, podendo abrir perspectivas de aplicabilidade biotecnológica fazendo-se necessária a continuidade da pesquisa.

Palavras-chave: Antioxidantes, citotoxicidade, antimicrobiano, *Licaria puchury-major*, óleos essenciais.

ABSTRACT

Antioxidants are substances that at low concentrations can inhibit or retard the oxidation of an oxidizable substrate. The cytotoxic activity detects bioactive compounds and aims to assess or predict the toxic effects on biological systems. The antimicrobial activity opens perspectives in the development of effective antimicrobials for the treatment of infectious diseases caused by them. In this context the research was conducted on botanical species from Amazonia, *Licaria puchury-major*, endemic Borba-AM., aiming to determine the activities: antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. The quantification of total phenolics was made by Folin Ciocateau for antioxidant activity methods were DPPH, ABTS+, β -carotene/linoleic acid system (LPO). The cytotoxicity assays were: lethality with *A. saline* and the test on the erythrocyte hemolytic camungongos (*Mus musculus Swiss*). For antimicrobial activity, we used the micro-organism: *S. aureus*, *M. Smegimates*, *B. cereus*, *E. coli* and *C. albicans*. The samples tested were: essential oils of flowers and leaves with their respective hydrolates, the DCM and MeOH extracts of leaves, the aqueous extracts of leaves, seeds, stems and branches thin and thick, teas, seeds, leaves, branches thick, thin and crushed leaves. In results of antioxidant evaluation, the sample with the highest total phenolic content was the essential oil of leaves (17.63 ± 0.51 mg/GAE). In the DPPH sample that showed the best activity was the kidnapping of radical leaf essential oil ($IC_{50} = 6.81$ mg/mL), and the ABTS method: the aqueous extracts of the stem ($IC_{50} = 2.66$ mg/mL) and oil leaf essential ($IC_{50} = 4.63$ mg/mL). In the method OLP samples with greater ability to inhibit oxidation were: DCM extract of leaves (61.05 ± 2.54 mg/mL), aqueous extracts of the stem (60.82 ± 5.53 mg/mL) MeOH extract of leaves (54.55 ± 2.36 mg/mL) and essential oil of leaves (53.88 ± 1.93 mg/mL). Showed no cytotoxicity in *A. saline*: all samples of aqueous extracts and hydrolates ($> 2000 \mu\text{g/mL}$). And against the hemolytic test: The best result was the aqueous extract of the stem showing no hemolysis at any concentration. Followed by essential oils from flowers and leaves that showed hemolysis on concentration ($1 \mu\text{g/mL}$) is considered low cytotoxicity. On antimicrobial activity against bacteria *B. cereus* and *S. aureus* better than the sample inhibited the halo were essential oils from flowers and leaves, extracts of leaves in DCM and aqueous seed. And against *C. albicans* yeast extracts in DCM and the aqueous stem and seed. It is concluded that *L. puchury-major* has antimicrobial and antioxidant potential and may open perspectives for the applicability biotechnology making it necessary to continue the research.

Keywords: Antioxidants, cytotoxicity, antimicrobial, *Licaria puchury-major*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	(a) Município de Borba; (b) Borba, à margem direita do Rio Madeira.....	24
Figura 2	(a) Cabeceira Igarapé do Querosene; (b) Igarapé do Puxurizal; (c) igapó localizado Igarapé do Piaba; (d) Área alagada.....	26
Figura 3	Árvores de Puxuri.....	27
Figura 4	Folhas de Puxuri.....	27
Figura 5	Flores de Puxuri.....	28
Figura 6	Flores de Puxuri.....	28
Figura 7	(a) Semente com dois cotilédones; (b) Moqueamento das sementes; (c) Sementes esbranquiçadas; (d) Sementes escuras (secas ao sol).....	29
Figura 8	(a) Alburno e cerne da madeira; (b) e (c) Arvores de puxuri com pequeno diâmetro.....	30
Figura 9	(a) Germinação criptocotiledonar; (b) Germinação: emergência reta; (c) Coleta dos frutos; (d) Técnica para germinação das sementes.....	31
Figura 10	(a) Frutos abortados enrugados denominados “cachimbo”; (b) Frutos apanhados.....	32
Figura 11	Coletor de sementes do puxuri no igapó do Piaba.....	32
Figura 12	Coletor procurando frutos de puxuri no igapó.....	33
Figura 13	(a) Armazenamento: frutos; (b) Frutos enterrados na floresta.....	33
Figura 14	Frutos de puxuri no paneiro, para amolecimento da casca.....	34
Figura 15	(a) e (b) “Cacuruta” das árvores de puxuri,.....	34
Figura 16	(a) Casas improvisadas; (b) Rede improvisada; (c) Árvore derrubada pelo temporal; (d) Teia feitas por “aranhas caranguejeiras”.....	35
Figura 17	(a) semente, que é ralada na língua do pirarucu; (b) Chá feito da semente ralada; (d) Defumação feita da semente ralada.....	37
Figura 18	Coleta do material botânico: (a) Igarapé do Piaba; (b) Comunidade Cinco Irmãos; (c) Sítio São Bento; (d) Igarapé do Querosene.....	65
Figura 19	Exsiccatas das folhas e frutos da <i>L. puchury-major</i> ” (a) ”puxuri-embauíba” (b) ”puxuri-roxo”.....	66
Figura 20	Teste qualitativo - Método DPPH – Amostras: 1, 2, 3 e 4.....	96
Figura 21	Teste qualitativo – método DPPH - Ext.H ₂ O das amostras: 5, 6, 7, 8 9.....	97
Figura 22	Teste qualitativo – Método: DPPH – Chás das amostras: 10, 13, 14, 15.....	98
Figura 23	Teste qualitativo – Método: DPPH – Chás das amostras: 11, 12, 16, 17.....	99
Figura 24	Teste qualitativo - Método: ABTS ⁺ –Amostras: 1, 2, 3 e 4.....	103
Figura 25	Teste qualitativo - Método ABTS ⁺ - Ext.H ₂ O das amostras: 5, 6, 7, 8, 9...	104
Figura 26	Teste qualitativo - método ABTS ⁺ : Chá: 11, 12, 13, 14, 15.....	104
Figura 27	Teste qualitativo – Método: ABTS ⁺ das amostras: 16 e 17.....	105
Figura 28	Resultado qualitativo (colorimétrico) do teste hemolítico - Amostras:1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9.....	116
Figura 29	Teste com bactérias: <i>Bacillus cereus</i> (Gram positivo) e Resultado <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positivo) e Levedura <i>Cândida Albicans</i>	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Mapa do Rio Mapiá.....	25
Quadro 2	Estrutura química da vitamina E.....	53
Quadro 3	Estrutura química do Ácido ascórbico ou vitamina C.....	54
Quadro 4	Estrutura química do β -caroteno.....	55
Quadro 5	Estrutura química do radical DPPH \cdot : na forma de radical livre e reduzida.....	58
Quadro 6	Estrutura química do cátion radical ABTS \cdot^+ na forma de radical livre e reduzida.....	58
Quadro 7	Estrutura química do β -caroteno.....	59
Quadro 8	Estrutura química do ácido linoleico.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudos realizados com a espécie <i>L. puchury-major</i>	40
Tabela 2	Principais constituintes químicos encontrados na espécie <i>L. puchury-major</i>	41
Tabela 3	Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.....	48
Tabela 4	Algumas doenças relacionadas com a geração de radicais livres.....	48
Tabela 5	Principais agentes de defesa antioxidante.....	50
Tabela 6	Algumas fontes de antioxidantes na dieta.....	55
Tabela 7	Partes estudadas da espécie <i>L. puchury-major</i>	68
Tabela 8	Preparo das soluções das amostras de <i>L. puchury-major</i>	72
Tabela 9	Rendimento das partes botânicas utilizadas nos ensaios.....	92
Tabela 10	Determinação do teor de fenólicos totais das amostras de <i>L. puchury-major</i> .	95
Tabela 11	Atividade antioxidante da <i>L. puchury-major</i> pelo método DPPH [•] expressos em(mEq) da quercetina por g das amostras dos chás.....	99
Tabela 12	Atividade antioxidante da <i>L. puchury-major</i> por meio de do teste qualitativo de varredura de radicais DPPH [•]	100
Tabela 13	Percentagem de inibição da atividade antioxidante dos chás da <i>L. puchury-major</i> pelo método ABTS ⁺	105
Tabela 14	Avaliação da Atividade Antioxidante da espécie <i>L. puchury-major</i> por meio de do Teste Qualitativo de Varredura de Radicais - ABTS ⁺	106
Tabela 15	Avaliação da Atividade Antioxidante da espécie <i>L. puchury-major</i> por meio de do Teste Qualitativo do Sistema β -Caroteno / Ác. Linoléico - LPO....	110
Tabela 16	Percentagem de inibição da atividade antioxidante da <i>L. puchury-major</i> por meio de do Teste Quantitativo do Sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	112
Tabela 17	Parâmetros Cinéticos do Potencial Antioxidante da Espécie <i>L. Puchury-Major</i> no Sistema B-Caroteno/Ácido Linoleico – LPO.....	113
Tabela 18	Análise Comparativa Por meio de dos Métodos Quantitativos Testados.....	114
Tabela 19	Avaliação da Atividade Citotóxica frente à <i>Artemia salina</i>	115
Tabela 20	Avaliação da Atividade Citotóxica Frente ao Teste Hemolítico nas Amostras da Espécie <i>Licaria puchury</i>	117
Tabela 21	Atividade Antimicrobiana das amostras de <i>L. puchury-major</i>	120
Tabela 22	Melhores resultados nos diferentes ensaios testados com amostras da espécie <i>Licaria puchury-major</i>	120

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de calibração do ácido gálico, para o cálculo do teor de compostos fenóis totais em relação à concentração ($\mu\text{g/mL}$) das amostra.....	93
Gráfico 2	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Padrão: Quercetina por meio de do método de varredura de radicais: DPPH.....	102
Gráfico 3	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do O. E. fl-n (amostra 1), por meio de do método de varredura de radicais: DPPH.....	102
Gráfico 4	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do O. E. fo-n (amostra 2), por meio de do método de varredura de radicais: DPPH.....	102
Gráfico 5	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. DCM-fo-n (amostra 3), por meio de do método de varredura de radicais: DPPH.....	102
Gráfico 6	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. MeOH-fo-n (amostra 4), por meio de do método de varredura de radicais: DPPH.....	102
Gráfico 7	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. aquoso caule-n (amostra 8), por meio de do método de varredura de radicais: DPPH.....	102
Gráfico 8	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do padrão: quercetina, por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	108
Gráfico 9	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do O.E. fl-c (amostra 1), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	108
Gráfico 10	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do O.E. fo-n (amostra 2), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	108
Gráfico 11	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. DCM-fo-n (amostra 3), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	108
Gráfico 12	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. MeOH-fo-n (amostra 4), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	108
Gráfico 13	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. Aquoso - Fo-nat. (Amostra 5), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	108
Gráfico 14	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. Aquoso – Fo-c (amostra 6), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	109
Gráfico 15	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. Aquoso – Gf-n (amostra 7), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	109
Gráfico 16	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. Aquoso – Caule-n (amostra 8), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	109
Gráfico 17	Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do Ext. Aquoso – Sem-n (amostra 9), por meio de do método de varredura de radicais: ABTS^+	109
Gráfico 18	Decaimento da inibição da atividade antioxidante da <i>L. puchury-major</i> pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico expressos em (mEq) de BHT pelas amostras dos chás.....	110
Gráfico 19	Inibição (%) da atividade antioxidante da <i>L. puchury-major</i> sistema β -caroteno/ácido linoleico em (mEq) de BHT pelas amostras dos chás.....	111
Gráfico 20	Decaimento da inibição da atividade antioxidante da <i>L. puchury-major</i> pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico expressos em (mEq) de BHT pelas amostras dos óleos essenciais, ext. DCM, MeOH e Aquosos.....	112

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1	Fluxograma da obtenção das amostras da <i>L. puchury-major</i> utilizadas nos ensaio.....	69
Esquema 2	Procedimentos dos ensaios para determinação da atividade antioxidante....	70
Esquema 3	Diluições das amostras e dos padrões.....	73
Esquema 4	Procedimento para uso da microplaca (em todas as metodologias antioxidantes).....	74
Esquema 5	Procedimento dos ensaios para determinação da atividade citotóxica frente à <i>Artemia salina</i>	85
Esquema 6	Procedimento dos ensaios para determinação da atividade hemolítica.....	88
Esquema 7	Procedimento para avaliação do potencial hemolítico em microplaca.....	89
Esquema 8	Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em cavidade.....	91

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ABTS ⁺	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
ABTS ^{·+}	2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato
[·] O ₂	Oxigênio singlete
BHA	Butylated Hydroxyanisole - 2(3)- <i>terc</i> -Butil-4-metóxi-fenol
BHT	Butylated HydroxyToluene - 2,6-Di- <i>terc</i> -butil-4-metil-fenol
CAT	Catalase
CI ₅₀	Concentração inibitória
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH	Radical 1,1- difenil-2-picril-hidrazila
DPPH [·]	2,2-difenil-1- (2,4,6-trinitrofenil) hidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERMO	Espécie reativa do metabólito de oxigênio
GSSG	Glutaciona oxidada
GSH	Glutaciona reduzida
GPx	Glutaciona peroxidase
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
mEq	Miliequivalente / Miliequivalência
MeOH	Metanol
NaCl	Cloreto de sódio
OH [·]	Radical hidroxila
O ₂ ^{·-}	Ânion radical superóxido
SOD	Superóxido desmutase
Ufc	Unidade formadora de colônia
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância (em alguns casos o índice indica o comprimento de onda em nm no qual a absorbância foi medida, p. ex., ABS _{508,8})
Cm	Centímetro
Caule-n	Caule nativo
et al.	Expressão latina abreviada <i>et alli</i> (= e outros)
Ext.	Extrato
Fe	Ferro
Fl-c	Flores cultivadas
Fo-c	Folhas cultivadas
Fo-n (1)	Folhas nativas velhas
Fo-c (2)	Folhas cultivadas novas
Fon-T (1)	Folhas nativas trituradas velhas
Fo-c-T (2)	Folhas cultivadas trituradas novas
G	Grama
GalhoF-n	Galhos finos nativos
Galhos G-n	Galhos grossos nativos
H	Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
L	Litro
M	Massa
Min	Minuto
ml	Mililitro
MG	Miligrama
m/v	Massa por volume
Nm	Nanômetro
O. E.	Óleo essencial
q.s.p	Quantidade suficiente para
RPM	Rotações por minuto
sp.	Relativo à espécie do gênero
spp.	Relativo à espécie do gênero
ssp.	Subespécie
Sem-n	Semente nativa
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

\bar{X}	média de um conjunto de dados
λ	comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda de máxima absorvância
M	fator multiplicativo (exemplos: 1 μL = 10^{-6} litro; 1 μg = 10^{-6} grama)
Σ	desvio padrão populacional
$ \Delta\text{ABS} $	valor absoluto da variação de absorvância
μg	micrograma
μL	microlitro
%	Por cento
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
1 OBJETIVOS	23
1.1 GERAL.....	23
1.2 ESPECÍFICOS.....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 A ESPÉCIE <i>Licaria puchury-major</i>	24
2.1.1 Nomes Populares	24
2.1.2 Distribuição / <i>Habitat</i>	24
2.1.3 Dispersão	25
2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE.....	26
2.2.1 A Árvore	26
2.2.2 A Folha	27
2.2.3 A Flor	27
2.2.4 O Fruto	28
2.2.5 A Semente	29
2.2.6 A Madeira	30
2.3 GERMINAÇÃO/PLÂNTULA.....	30
2.4 A SAFRA.....	31
2.4.1 A Colheita do Fruto	32
2.4.2 Armazenamento dos Frutos	33
2.5 PERIGOS E DIFICULDADES ENFRENTADOS PELOS COLETORES DE PUXURI.....	34
2.6 USOS.....	36

2.6.1 Na Medicina Popular.....	
2.6.2 Como Alimento no Município de Borba-AM.....	36
2.7 ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE DESCRITOS CRONOLOGICAMENTE....	37
2.8 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	42
2.8.1 Plantas com Atividades Antioxidantes.....	43
2.8.2 Plantas com Atividades Citotóxicas.....	44
2.8.3 Plantas com Atividades Antimicrobianas.....	45
2.9 RADICAL LIVRE.....	45
2.9.1 Oxidação Lipídica.....	46
2.9.2 Espécies reativas do oxigênio (EROs).....	46
2.9.3 Estresse Oxidativo.....	48
2.10 ANTIOXIDANTES.....	49
2.10.1 Métodos para Determinar a Avaliação <i>in vitro</i> da Atividade Antioxidante.....	56
2.11 ATIVIDADES CITOTÓXICA.....	59
2.11.1 Métodos para Determinar a Avaliação da Atividade Citotóxica.....	60
2.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	62
2.12.1 Método para Determinar a Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	62
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3.1 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS.....	63
3.2 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS EM FITOQUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	63
3.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	65
3.3.1 Locais da Coleta.....	65
3.3.2 Preparo do Material.....	65
3.3.3 Identificação.....	66
3.3.4 Obtenção das Amostras.....	66
3.3.5 Cálculo do Rendimento das Amostras.....	70
3.4 PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	70
3. 4.1 Preparo das Soluções das Amostras a Serem Testadas.....	71
3. 4.2 Preparação da Curva Dose-Resposta Realizadas.....	72
3.4.3 A Metodologia para Caracterização em Microplaca.....	73
3.4.4 Análise dos dados.....	74
3.5 METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE....	75
3.5.1 Determinação de fenóis totais – (Método: Folin-Ciocalteu).....	75
3.5.2 Teste de varredura do radical (Método: DPPH [•] e ABTS ⁺).....	77
3.5.3 Teste de Inibição de Reações de Oxidação.....	80
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	83
3.6.1 Ensaios Frente à <i>Artemia salina</i>	83

3.6.2 Teste Hemolítico.....	86
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	89
3.7.1 Método por difusão em cavidade.....	90
4 RESULTADOS.....	92
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA <i>L. Puchury-Major</i>.....	92
4.1.1 Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	92
4.1.2 Teste de Varredura de Radicais (DPPH[•] e ABTS⁺).....	96
4.1.3 Teste de Inibição de Reações de Oxidação.....	109
4.1.4 Comparação das Atividades Antioxidantes por meio das Diferentes Metodologias nas Diversas Partes Botânicas da espécie <i>Licaria puchury-major</i>.....	114
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA <i>L. Puchury-Major</i>.....	115
4.2.1 Frente à <i>A. salina</i>.....	115
4.2.2 Frente ao Teste Hemolítico.....	116
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA <i>L. Puchury-Major</i>.....	119
4.3.1 Teste Qualitativo (Verificação do Halo).....	119
4.3.2 Teste Quantitativo (Medição do Halo).....	118
4.4 COMPARAÇÃO NOS DIFERENTES ENSAIOS TESTADOS.....	120
5 DISCUSSÃO.....	121
CONCLUSÃO.....	129
PERSPECTIVAS.....	130
REFERÊNCIAS.....	131

INTRODUÇÃO

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato. São importantes na prevenção de doenças, inibindo ou atrasando a oxidação das biomoléculas por meio da prevenção da iniciação ou da propagação da cadeia de reações de oxidação.

Agentes redutores, cuja função é transferir átomos de hidrogênio, como o ácido ascórbico, são considerados antioxidantes. Alguns antioxidantes também são capazes de quelar íons metálicos como cobre e ferro, os quais catalisam a oxidação lipídica (KAUR e KAPOOR, 2001).

Em função da necessidade de testes extensos e de custo elevado para comprovar a sua segurança para aplicação em alimentos, os antioxidantes sintéticos são preteridos em relação aos antioxidantes naturais. A busca por substitutos naturais para os antioxidantes sintéticos tem elevado o número de pesquisas envolvendo os alimentos de origem vegetal, que são potenciais fontes dessas substâncias, uma vez que frutas e hortaliças contêm diversos compostos com propriedades antioxidantes. Entre estes estão o ácido ascórbico, alfa-tocoferol, carotenoides e uma variedade de compostos fenólicos. Não apenas as frutas e as hortaliças podem apresentar atividade antioxidante; as partes que compõem os vegetais arbóreos (folhas, flores, sementes, cascas, etc.) também podem conter substâncias antioxidantes (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2002).

Nesse contexto, é que realizamos pesquisa com as partes botânicas da espécie arbórea amazônica conhecida como “puxuri”.

A *Licaria puxury-major* (Mart.) Kosterm. pertence ao gênero *Licaria* e à família Lauraceae; é uma árvore de grande porte. Suas sementes aromáticas são usadas na medicina folclórica como carminativas e estomáquicas no tratamento de insônia e irritabilidade de adultos e crianças (MORS e RIZZINI, 1966; PIO CORRÊA, 1931). A população prepara o chá da planta usando uma semente e obtendo o remédio conhecido como “abafado”. (MAIA et al., 1985).

O puxuri na medicina popular é utilizado como tônico resolutivo e estimulante, contra diarreia, dispepsia, problemas intestinais e leucorreia. As partes usadas são o fruto, a casca do tronco, as folhas, que são preparadas como chá, e a semente ralada, que é utilizada para fazer emplasto (BERG e VAN DEN, 1986;1993). Vários autores ressaltam o valor da casca da árvore, das folhas e das sementes na medicina caseira e na cosmetologia. Matta (1913) cita que as sementes e as folhas são estimulantes e adstringentes, com bons resultados nos casos de dores intestinais.

Maia (1973) cita que a planta ocorre na Região Amazônica, nas matas de Tabatinga, e se estende até ao Brasil Central. Graça (2003), por outro lado, cita a ocorrência dessa planta para o município de Borba, em todos os afluentes do Rio Mapiá e também no município de Silves, prevalecendo, neste caso, o plantio.

O município de Borba está localizado na Região do Madeira-AM, e segundo Graça (2003), a abundância e a concentração da espécie *Licaria puchury-major* nessa localidade o conhecimento empírico é restrito à comunidade. Todas as partes da árvore são utilizadas, principalmente a semente, que é ralada na língua do pirarucu, no combate a todos os males do estômago. As folhas, os galhos substituem o café, e as sementes, que são abortadas pela árvore, são denominadas “cachimbo” e servem de alimento para a fauna local. Os primeiros trabalhos químicos com essa espécie datam dos séculos XVIII e XIX e são sumarizados por Gildemeister e Hoffmann (1916). A firma francesa Roure-Bertrand (1920) descreveu algumas propriedades do óleo essencial e indicou a presença de safrol, eucaliptol e isoeugenol nas sementes do puxuri. Gottlieb (1956) confirmou a presença de safrol, eucaliptol e eugenol em lugar de isoeugenol, além do ácido láurico. Mors e Rizzini (1966); Seabra et al., (1967) estudaram o óleo volátil das folhas e dos galhos finos da planta e indicaram a presença de safrol, eucaliptol, alfa-terpinol e eugenol. Maia (1973) descreveu o estudo da madeira, de onde isolou o aldeído 3,4-metilenodioxicinânico, o álcool 3,4-metilenodioxicinâmico e o aldeído siríngico, além de safrol e eugenol. Carlini et al., (1983) observaram que o óleo essencial das sementes do puxuri reduz a atividade motora e anestesia ratos, e seu hidrolato (resultante do arraste com vapor d’água) promove proteção contra as convulsões induzidas

por choque elétrico e potencializa os barbituratos utilizados para fazê-los dormir. Alguns desses efeitos farmacológicos são atribuídos à presença de safrol, eugenol e metileugenol no óleo essencial (MELLO e CARLINI et al., 1973; CARLINI et al., 1983).

Tendo em vista o exposto anteriormente sobre o uso e o conhecimento químico da espécie em questão, percebe-se a falta de informação sobre o potencial antioxidante, citotóxico e antimicrobiano da *L. Puchury-Major*. Assim, o presente projeto pretende contribuir com novas informações científicas, avaliando os possíveis potenciais das partes botânicas estudadas dessa espécie.

1 OBJETIVOS

1.1 GERAL:

Verificar o potencial antioxidante, citotóxico e antimicrobiano de várias partes botânicas da espécie amazônica *Licaria puchury-major* (Mart.) Kosterm.

1.2 ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar a atividade antioxidante das diversas partes botânicas da espécie *L. puchury-major* como os óleos essenciais, hidrolatos, chás e extratos em diclorometano, metanol e aquosos.
- b) Quantificar os compostos fenólicos totais por meio do método Folin Ciocateu.
- c) Determinar *in vitro* a capacidade de sequestro de radicais livres por meio dos métodos de varredura de radicais: DPPH[•] e ABTS⁺.
- d) Determinar *in vitro* a atividade antioxidante inibidora de reações de oxidação (ou autooxidação) por meio do sistema β -caroteno/ácido linoleico - LPO.
- e) Comparar as metodologias utilizadas na caracterização de atividades antioxidantes das diversas partes botânicas da *L. puchury-major*.
- f) Realizar a atividade citotóxica por meio do ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*.
- g) Realizar ensaios citotóxicos das amostras sobre os eritrócitos de animais (camundongos - *Mus musculus Swiss*) por meio do teste hemolítico.
- h) Avaliar a atividade antimicrobiana contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Mycobacterium Smegimates*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Cândida albicans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ESPÉCIE *Licaria puchury-major* (Mart.) Kosterm.

A espécie *Licaria puchury-major* (Mart.) Kosterm., (Meded. Bot. Mus. Rijks. Herb. 42:599, 1937) é uma árvore pertencente à família Lauraceae, com ampla utilização na medicina natural (CRONQUIST, 1981).

2.1.1 Nomes Populares

Puxuri, pixuri, puxurim, pixurim, puchuri-grosso, puchuri-miúdo, puchuri-bastardo, puchuri-pequeno, puchuri-imbaúba, puxuri-branco, puchuri-preto, puxuri-roxo, puxurirana, pexorim, pichury, louro-pucherim, fava-puxuri, fava-de-puchuri, fava-de-puxiri, fava-de-pexorim, fava-de-puchorin (BERG e VAN DEN, 1986; 1993; GRAÇA, 2003; LÊ COINTE, 1947; MATTA, 1913; REVILLA, 2002; ROCQUE, 1968; SILVA et al., 1977).

2.1.2 Distribuição / *Habitat*

Maia (1973) cita que a planta ocorre na Região Amazônica, nas matas de Tabatinga, e se estende até ao Brasil Central. Graça (2003) constatou que a maior ocorrência nativa da espécie *Licaria puchury-major* (Mart.) Kosterm. se dá no município de Borba (Figura 1a), localizado na Região do Madeira-Am (Figura 1b).



Figura 1: (a) Município de Borba; (b) Borba, à margem direita do Rio Madeira.
Fonte: Rosilane R. Graça

Há abundância da espécie no Rio Mapiá e em todos os seus afluentes (Quadro 1), a qual habita as margens dos rios e igarapés periodicamente inundáveis e os igapós de águas pretas, cujas águas são bastante frias, fatores favorecidos pela área, pelo clima e pela região. Há também ocorrência no município de Silves, prevalecendo o plantio.



Quadro 1: Mapa do Rio Mapiá
Fonte: Rosilane R. Graça

2.1.3 Dispersão

A dispersão dos frutos é do tipo zoocórica, feita por pássaros, macacos e certos roedores, que são atraídos pelos frutos maduros, os quais continuam com coloração verde (*Licaria*); possuem cúpula ou pedúnculos espessos e rugosos. Os espécimes ocorrem próximos ou nas cabeceiras de rios (Figura 2a) e igarapés (Figura 2b), igapós (Figura 2c) ou em áreas alagadas (Figura 2d). Possui também dispersão hidrocórica, uma vez que os frutos possuem espaços cheios de ar (aerênquima) entre a testa e o endocarpo, que contribuem para a flutuação (GRAÇA, 2003).

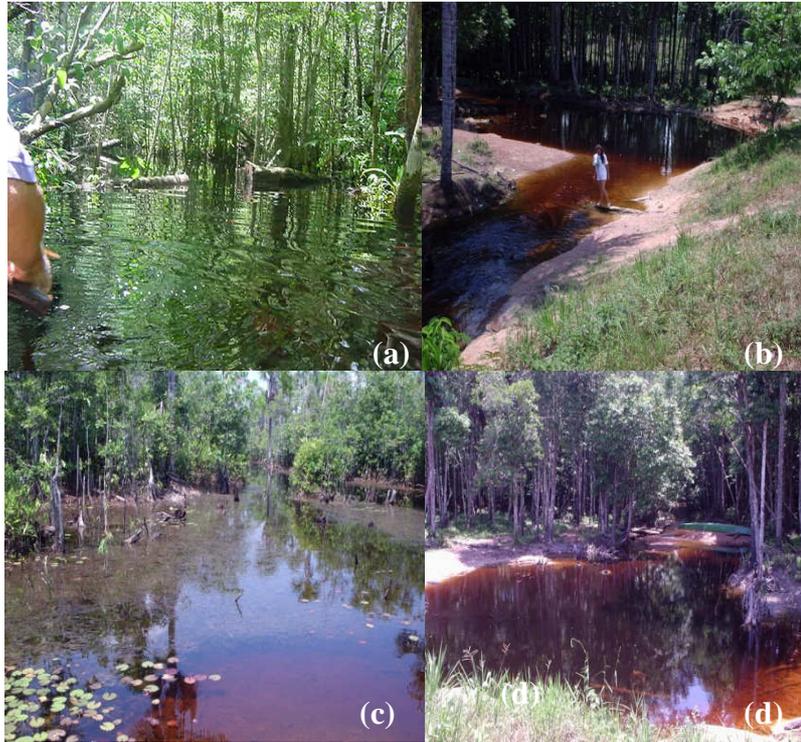


Figura 2: (a) Cabeceira do Igarapé do Querosene; (b) Igarapé do Puxurizal, (c) igapó localizado no Igarapé do Piaba (d) Área alagada próximo ao balneário do Lira.
Fonte: Rosilane R. Graça

2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE:

2.2.1 A Árvore

As árvores nativas da *L. puchury-major* apresentam odor característico na casca, na madeira, nas folhas e nos frutos. A altura e o volume do fuste variam de acordo com a localização dos indivíduos. Na floresta úmida, periodicamente alagável, a população é mais densa, e os indivíduos são mais volumosos e produtivos, principalmente nas cabeceiras dos igarapés, os quais atingem em média 25-30m de altura e 70-80cm de diâmetro, córtex muito aromático e ramos eretos; quando jovens, glabros (Figura 3). No igapó assumem menor porte e volume, atingindo no máximo 11-15 metros de altura por 55cm de diâmetro. A casca do tronco é em geral marrom-acinzentada com lenticelas, e manchas líquênicas brancas e esverdeadas (GRAÇA, 2003).



Figura 3: Árvores de Puxuri
Fonte: Rosilane R. Graça

2.2.2 A Folha

As folhas são alternas ou subopostas, cartáceas, subcoriáceas a coriáceas, elípticas a oblongas, 8-14cm de comprimento, 3,5-5,5cm de largura, ápice acuminado a ligeiramente caudado, base obtusa a subaguda, glabras, lustrosas na face ventral, pardacentas e mais claras no dorso (Figura 4). (GRAÇA, 2003).



Figura 4: Folhas de Puxuri
Fonte: Rosilane R. Graça

2.2.3 A Flor

Há inflorescências em panículas axilares. Flores com perianto cilíndrico, lobos agudos. Androceu com dois verticilos externos estéreis; anteras 3, introsas, férteis no verticilo interno.

Ginoceu de ovário glabro, elipsoide, estilete curto e esterigma obtuso (Figura 5). (GRAÇA, 2003).



Figura 5: Flores de Puxuri
Fonte: Rosilane R. Graça

2.2.4 O Fruto

O fruto do puxuri é classificado como uma baga do tipo bacáceo (BARROSO et al., 1999). Possui ramos glabros com odor e sabor aromático (MAIA, 1973). Segundo Graça, (2003), o fruto apresenta as seguintes características: ovoide, 2-5cm de comprimento, 1-2cm de diâmetro; a parte externa da “casca verde” é constituída pelo epicarpo + mesocarpo, seguida pelo endocarpo, que, por ser mais resistente, é chamado de “casca dura”; é doce e aromático, inserido em uma cúpula espessa e rugosa, que o recobre até quase a metade quando maduro. A coloração verde do fruto não é um bom parâmetro para identificar se está fisiologicamente maduro, uma vez que na maturação se apresenta verde, variando de verde-claro (puxuri-embraúba) (Figura 6a) para o verde-escuro (puxuri-roxo) (Figura 6b).



Figura 6: (a) Frutos do puxuri verde-claro (puxuri-embraúba); (b) Frutos do puxuri verde-escuro (puxuri-roxo)
Fonte: Rosilane R. Graça

2.2.5 A Semente

A semente é constituída por dois cotilédones espessos e aromáticos, revestidos pelos tegumentos: a testa (tegumento externo) e o tegma (tegumento interno), os quais se separam somente após serem “moqueados” (Figura 7a). A exploração das sementes do puxuri no município de Borba remonta à década de 50. Muitos foram os exploradores que sobreviveram com suas famílias apenas com esse tipo de atividade.

O processo de “moquear” as sementes cruas do puxuri consiste em levar ao forno de barro aquecido somente pelas brasas as sementes ainda com o tegumento, as quais são colocadas em um grande tacho, onde são mexidas com um remo para não queimarem (Figura 7b). As que ficam mais escuras são as que pegam mais calor e, portanto, não podem ficar sem serem mexidas, a fim de não queimarem e serem descartadas. O aquecimento é somente para soltar o tegumento. O processo é semelhante ao feito com o amendoim (*Arachis sp.*), que, depois de torrado, perde a “casca” com maior facilidade. As sementes do puxuri, após serem “moqueadas”, ficam esbranquiçadas (Figura 7c), e o próximo passo, é levá-las ao sol durante 8 a 10 dias para secarem e ganharem cor escura (Figura 7d) a fim de serem, então, comercializadas, visto que as sementes cruas não têm o mesmo valor comercial pelo fato de que neste estado não se podem distinguir as sementes apanhadas e as sementes de “louro-puxuri” (*Mezilaurus sp.*), as quais, embora de menor tamanho, são semelhantes, de forma que, após o processamento de moqueamento, murcham. (GRAÇA, 2003).



Figura 7: (a) Semente com dois cotilédones; (b) Moqueamento das sementes, (c) Sementes esbranquiçadas; (d) Sementes escuras (secas ao sol).

Fonte: Rosilane R. Graça

2.2.6 A Madeira

A madeira tem aroma característico decorrente da existência de óleo essencial no interior de células oleaginosas. É moderadamente pesada, alburno castanho-claro pouco diferenciado do cerne (Figura 8a), apenas um pouco mais escuro e de aspecto brilhoso; macia ao corte manual; oferece bom acabamento; grã direita, textura fina a média; cheiro característico. É importante destacar que a madeira do puxuri não é utilizada no município de Borba, porque, em geral, as árvores mais acessíveis possuem pequeno diâmetro (Figuras 8b e 8c). As árvores mais volumosas se encontram em locais pouco acessíveis à população e são preservadas pelos próprios moradores, sendo, então, proibida a derrubada dessas árvores (GRAÇA, 2003).



Figuras 8: (a) Alburno e cerne da madeira; (b) e (c) Árvores de puxuri com pequeno diâmetro.
Fonte: Rosilane R. Graça

2.3 GERMINAÇÃO / PLÂNTULA

A germinação do “puxuri” (*Licaria puchury-major*) é hipógea criptocotiledonar, com o epicótilo reto emergindo dos cotilédones (Figura 9a); eófilos alternos, inteiros, sem estípulas, penínervos. Aroma e indumento frequentemente diagnósticos. Mesmo após a germinação, os cotilédones apresentam cheiro forte e aromático, característico da espécie. A plântula (Figura 9b) apresenta sistema radicular pivotante, com raiz primária axial, cilíndrica, creme, espessa, glabra; as raízes secundárias são irregularmente distribuídas, espessas, cremes, glabras; o hipocótilo não se desenvolve; o epicótilo é longo, cilíndrico, verde-oliva, herbáceo, estriado, coberto de indumentos brancos em toda a sua extensão. Ao longo do epicótilo há distribuição de cinco pares de catáfilos alternos; o metáfilo é simples, peciolado, alternativo, verde, glabro, com pigmentos avermelhados distribuídos nos bordos das nervuras secundárias; nervura principal nas faces adaxial e abaxial proeminente; nervação penínervea,

verde em ambas as faces, ápice acuminado, margem inteira e base simétrica. As sementes, após a coleta (Figura 9c), são submetidas à imersão em água até o epicarpo e o endocarpo amolecerem e os cotilédones serem retirados manualmente para, então, serem plantados (Figura 9d) (GRAÇA, 2003).

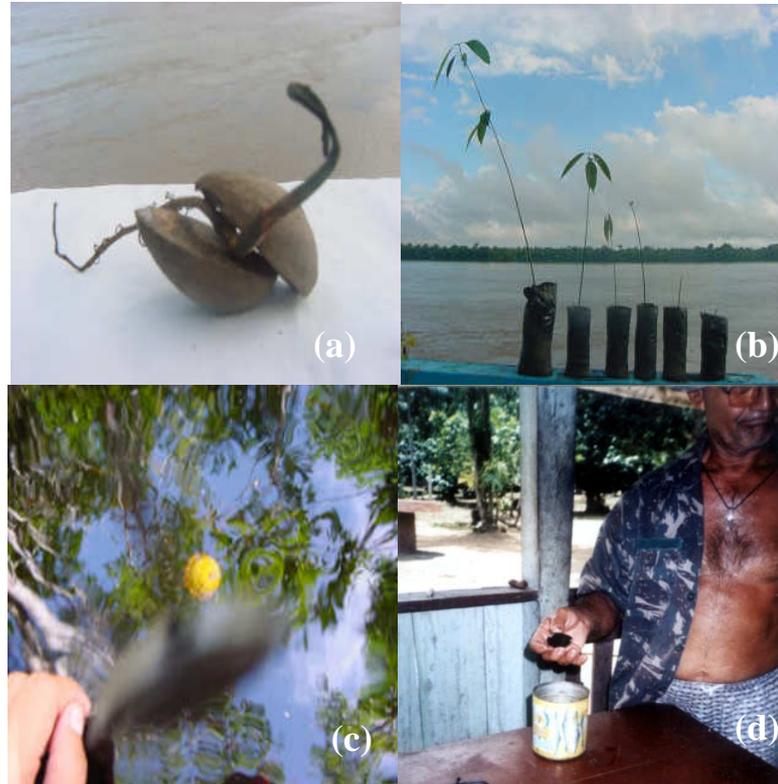


Figura 9: (a) Germinação hipógea criptocotiledonar; (b) Germinação: emergência reta; (c) Coleta dos frutos; (d) Técnica experimental para germinação das sementes.

Fonte: Rosilane R. Graça

2.4 A SAFRA

A floração da espécie é anual, a partir do mês de maio até agosto, sendo que somente a cada três anos a produção dos frutos é mais abundante. Na época da floração, os coletores começam a observar as árvores, e aquelas que não florescem já sabem que não vão produzir frutos e, conseqüentemente, não irão dar sementes, logo não serão visitadas na época da colheita. O período em que mais caem frutos é de 15 de fevereiro a 15 de março. Os primeiros frutos que caem no início de fevereiro são chamados de “cachimbo” (Figura 10a) e não servem para comercialização nem para reprodução/plantio pelo fato de serem abortados e não se desenvolverem, permanecendo pequenos e murchos (enrugados). Os frutos bem desenvolvidos e maduros caem naturalmente das árvores e não ficam murchos; entretanto os que são apanhados diretamente da árvore ainda imaturos ficam murchos e enrugados e, ao

serem “moqueados” ou secos ao sol, não servem para comercializar (Figura 10b) (GRAÇA, 2003).



Figura 10: (a) Frutos abortados enrugados denominados: “cachimbo”; (b) Frutos apanhados.
Fonte: Rosilane R. Graça

2.4.1 A Colheita do Fruto

Para a colheita do fruto do puxuri, é necessário muita atenção, uma vez que possui a mesma cor das folhas, o que torna difícil a distinção. Outra dificuldade é a localização das árvores, pois muitas se localizam no igapó, no meio de muitas outras espécies. Entretanto os coletores conhecem todas as árvores e sabem com precisão o lugar de cada uma delas. Isso porque, todos os anos, no mesmo período, passam o dia todo no meio do igapó, dentro de uma canoa procurando sementes (Figura 11) (GRAÇA, 2003).



Figura 11: Coletor de sementes do puxuri no igapó do Piaba.
Fonte: Rosilane R. Graça

Os coletores de puxuri-roxo passam horas dentro d’água olhando para o fundo do igarapé à procura do fruto (Figura: 12). Em lugares de difícil acesso, os coletores chegam a cair nas águas do igapó ou no pântano com uma cuia nas mãos para juntar os frutos e levá-los

até a canoa. De regresso, ao chegarem a casa, um outro membro da família se desloca para o mesmo local a fim de continuar a coleta, mantendo dessa maneira um trabalho quase sem interrupção. Essa é a rotina de várias famílias de coletores que permanecem na floresta durante a época da safra. Um fato interessante é que, mesmo durante a chuva, os coletores permanecem nas canoas embaixo das árvores esperando os frutos caírem, pois, segundo eles, é a hora em que mais caem frutos e, portanto, ninguém espera a chuva passar com medo de não conseguir juntar nenhum fruto (GRAÇA, 2003).



Figura 12: Coletor procurando fruto de puxuri no igapó.
Fonte: Rosilane R. Graça

2.4.2 Armazenamento dos Frutos

Os moradores que vivem da colheita dos frutos do puxuri juntam o produto oriundo de várias localidades guardando-os em sacos de fibra sintética (Figura 13a) e posteriormente enterrando-os no meio da floresta (Figura 13b), que, segundo eles, é o lugar mais seguro para evitar que outras pessoas levem o produto de seu trabalho, visto que eles passam a maior parte do tempo dentro do igapó coletando os frutos do puxuri (GRAÇA, 2003).



Figura 13: (a) Armazenamento em sacos de fibra sintética; (b) Frutos enterrados na floresta.
Fonte: Rosilane R. Graça

Depois de desenterrados, os frutos são lavados e então colocados em um “paneiro”, dentro do igarapé (Figura 14), ou dentro de uma canoa com água, onde permanecem por algumas horas para que amoleça a “casca verde” (epicarpo + mesocarpo), a qual é retirada manualmente; a “casca dura” (endocarpo), por ser mais resistente, é raspada com uma colher, restando somente a semente recoberta apenas pelos tegumentos, a testa (tegumento externo) e o tegma (tegumento interno). A parte mais espessa são os dois cotilédones, que se separam somente depois que as sementes são “moqueadas” (GRAÇA, 2003)



Figura 14: Frutos de puxuri no paneiro, para amolecimento da casca.
Fonte: Rosilane R. Graça

2.5 PERIGOS E DIFICULDADES ENFRENTADOS PELOS COLETORES DE PUXURI

Na época da colheita, por ser um período chuvoso, o igarapé aumenta o volume de suas águas. Com isso, as cobras de diversos tipos se escondem nas “cacurutas” - que são um amontoado de terras do próprio igapó, formado 90% por cauxi, que se acumula no pé das árvores do igapó desenvolvendo um tipo de solo roxo (Figura 15a e 15b). Quanto mais altas as árvores, maiores são as “cacurutas”, lugar aonde as cobras vão em busca de alimento, procurando capturar os roedores que habitam o igapó e que, por sua vez, se alimentam do fruto do puxuri; uma das cobras mais comuns é a “scuriju” (GRAÇA, 2003).



Figura 15: (a) e (b) “Cacuruta” das árvores de puxuri, formada por amontoados de terras próprias do igapó.
Fonte: Rosilane R. Graça

Outra dificuldade é a localização das árvores, pois habitam lugares de difícil acesso como igapós, pântanos e cabeceiras de rios. Por estes serem distantes, os coletores com seus familiares permanecem na floresta durante toda a época da safra, morando em casas improvisadas denominadas “tapiris” (Figura 16a) ou improvisando redes no meio da floresta (Figura 16b) e sofrendo, com isso, intempéries locais. O único meio de transporte para se chegar a essas localidades é de canoa. Devido à altura das árvores e pelo fato de os frutos não poderem ser apanhados porque murcham e perdem seu valor comercial, a maneira mais fácil é coletá-los durante o temporal, quando caem mais frutos, e por isso os coletores de puxuri passam a maior parte do tempo molhados, por dois motivos: pelas chuvas, comuns na época da colheita, e por permanecerem por muito tempo na água, que é muito fria, à procura dos frutos que ficam no fundo ou ainda por terem que nadar pelo igapó, quando a canoa não dá para passar por entre os galhos das árvores que estão submersas. Por essa razão, a maioria dos coletores sofre de reumatismo. Outro perigo constante é a possibilidade de pegar choque do peixe elétrico, o “puraquê” (*Electrophorus electricus*). Também pode ocorrer, durante o temporal, a queda de sobre os coletores (Figura 16c). É comum, também, encontrar árvores cobertas por teias de aranhas parecendo nuvens (Figura 16ad), feitas pelas “aranhas caranguejeiras”, e o risco de serem picados por estas e por outros insetos peçonhentos (GRAÇA, 2003).



Figura 16: (a) Casas improvisadas: “tapiris”; (b) Rede improvisada para descanso; (c) Árvore derrubada pelo temporal; (d) Teia feitas por “aranhas caranguejeiras”.

Fonte: Rosilane R. Graça

2.6 USOS:

2.6.1 Na Medicina Popular

Vários autores ressaltam o valor das várias partes botânicas da espécie *L. puchury-major* na medicina caseira e na cosmetologia. Berg e Van Den (1986; 1993) cita que o puxuri é utilizado como tônico resolutivo e estimulante, contra diarreia, dispepsia, problemas intestinais e leucorreia. As partes usadas são o fruto, a casca do tronco e as folhas, que são preparados como chá; a semente ralada é utilizada para fazer emplastos contra queimaduras e contra diarreia, dispepsia e leucorreia (corrimentos).

As sementes também são usadas como carminativas e estomáquicas no tratamento de insônia e irritabilidade de adultos e crianças (MORS e RIZZINI, 1966; PIO CORRÊA, 1931). A população prepara o chá da planta usando uma semente triturada em um copo de água fervente. O remédio assim elaborado é conhecido como “abafado” (MAIA et al., 1985).

Matta (1913) cita que as sementes e as folhas são estimulantes, tônicas e adstringentes, com bons resultados nos casos de dores intestinais e paresia dos intestinos, porque ativa os movimentos peristálticos. O cozimento das folhas verdes é usado contra reumatismo e o chá da casca do tronco é resolutivo e usado também contra os problemas intestinais e asma (ROSAS, 1978).

2.6.2 Como Alimento no Município de Borba-AM:

2.6.2.1 Pelos Animais

As árvores localizadas nas cabeceiras dos rios, por estarem próximas à margem, quando estão com frutos, são muito procuradas por macacos, morcegos e vários tipos de aves como, por exemplo, papagaio e araras. Os frutos que não são coletados permanecem na água e servem de alimentos para as tartarugas, cabeçudos e matrinxã (*Brycon spp.*); o tracajá (um quelônio da família das tartarugas) não come esse fruto. Os coletores e os moradores que residem às margens dos rios habitados pela espécie afirmam que as carnes desses animais consumidores agregam sabor e aroma do fruto puxuri. Os que caem próximo à margem do rio são comidos pelos animais roedores como ratos, cutias e pacas. Aqueles que não são

coletados ou comidos germinam. Os primeiros frutos de “puxuri” são todos abortados pela árvore, os quais os coletores locais denominam como “cachimbo”, são exclusivamente destinados para a alimentação da fauna local, visto que os coletores não têm interesse em coletá-los por serem enrugados e por não possuírem valor comercial (GRAÇA, 2003).

2.6.2.2 Pelas Comunidades

No município de Borba são utilizadas todas as partes da árvore, principalmente a semente, que é ralada na língua do pirarucu (Figura 17a), que resulta em um pó fino com o qual é feito o chá (Figura 17b) utilizado no combate aos males do estômago, em emplastos, em banhos e em defumação (Figura 17c). As folhas e os galhos finos substituem o café, nas comunidades que ficam distante da cidade. As outras partes são utilizadas também para fazer banhos e defumação para energizar ambientes. Os coletores vendem as sementes moqueadas para o comércio local, cujos receptores revendem para compradores de outros estados, porém no mercado não se conhece nenhum produto feito a partir de alguma parte da árvore (GRAÇA, 2003).

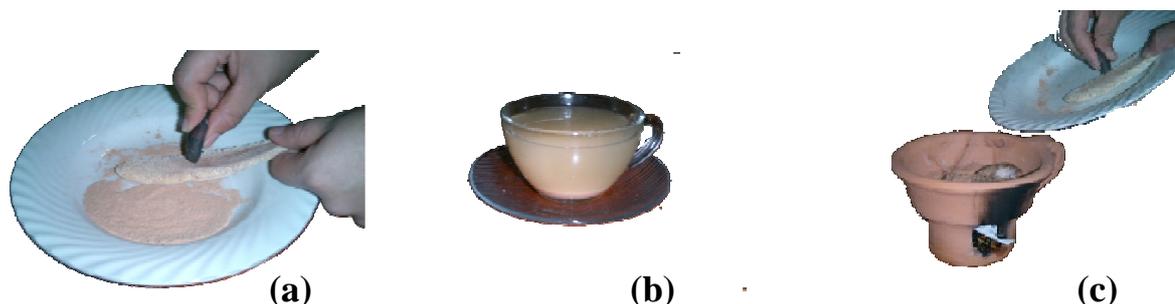


Figura 17: (a) semente, que é ralada na língua do pirarucu; (b) Chá feito da semente ralada; (d) Defumação feita da semente ralada.

Fonte: Rosilane R. Graça

2.7 ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE DESCRITOS CRONOLOGICAMENTE:

O primeiro registro foi sobre seu gênero: *Licaria*, que foi atribuído, por ser assim conhecido, pelos indígenas de “Licari”, o qual foi descoberto após uma viagem de estudo à Guiana Francesa, no período de 1762-1764 (MARQUES, 2001), não sendo descrita a ocorrência da espécie *Licaria puchury-major* nessa localidade. Os primeiros estudos documentados com a espécie foram realizados por Robes, (1799), seguido por Bonastre e Muller (1853), que não fizeram estudo químico. O primeiro relato sobre o uso da espécie foi

no Brasil, no século XIX, em 1855, no Grão-Pará, onde a semente ralada era chamada de “pó de marfim”, utilizada nos casos de *cólera murbus*, doença trazida da Europa particularmente do norte de Portugal (BELTRÃO, 1996; 1997; 2000). Matta (1913) encontrou nas sementes do puxuri óleo essencial e fixo, que descreveu como substâncias gordurosas sólidas, resina mole, matéria corante, amido, ácido volátil e sacarina. Descreveu ainda que o óleo essencial é amarelado, de gosto acre e amargo e cheiro ativo; e o óleo fixo apresenta consistência de manteiga de cacau. Os estudos realizados com as sementes foram sumarizados por Gildemeister e Hoffman (1916). A empresa francesa de fragâncias Roure Bertrand Duport (1920) realizou o primeiro estudo químico com identificação das substâncias contidas no óleo essencial das sementes e indicou a presença do safrol, eucaliptol e isoeugenol. Em consonância com esses resultados, foi feito estudo comparativo realizado por Gottlieb (1956), que confirmou a presença de safrol (36%), eugenol (11,4%) no lugar de isoeugenol, eucaliptol (5,4%) e o ácido laurico (8,9%). Mors e Rizzini (1966) realizaram o primeiro estudo químico com os óleos essenciais das folhas e galhos finos, não especificando se nativos ou cultivados, e indicaram no óleo essencial das folhas: a presença de eucaliptol (47,6%), safrol (21,7%), α -terpinol (11,7%) e eugenol (1,7%). No óleo essencial dos galhos finos: eugenol (61,0%), safrol (20,1%) e eucaliptol (10,8%). Os resultados obtidos foram confirmados por estudo realizado por Seabra e colaboradores, (1967). Mello e Carlini (1973) estudaram os efeitos farmacológicos dos constituintes presentes no óleo essencial das sementes. Maia (1973) realizou estudo com os extratos benzênico e etanólico da madeira cultivada proveniente dos galhos grossos (conforme metodologia) e identificou as substâncias: aldeído 3,4-metilenodioxicinâmico, álcool 3,4-metilenodioxicinâmico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído e mais três não identificadas. Em seguida foram realizados vários estudos também provenientes da madeira dos galhos grossos: Silva et al., (1973) realizaram o estudo Arylpropanoids from *Licaria puchury-major*. Laux (1974) realizou trabalho com o extrato benzênico com as cascas da madeira provenientes dos galhos grossos (conforme metodologia) e identificou as substâncias: sitosterol + stigmasterol, safrol, eugenol, 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (liquexantona), 1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona (fisciona). Em seguida Laux e colaboradores (1974) realizaram estudo químico com os líquens impregnados na casca da madeira e identificaram duas substâncias: 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (liquexantona) e 1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona (fisciona), constatando que estas são metabólitos do líquen *Graphina confluens*. Dallmeier e Carlini (1981) estudaram os efeitos farmacológicos do eugenol. Carlini et al., (1983) realizaram estudo farmacológico do óleo essencial das sementes, e observaram a redução da

atividade motora e anestésica dos ratos. Analisaram também os hidrolatos (resultantes do arraste a vapor d'água do óleo essencial) e observaram que ocorre a proteção contra as convulsões induzidas por choque elétrico e ainda potencializam-se os barbituratos utilizados para fazê-los dormir. E constataram que os efeitos farmacológicos são atribuídos à presença de safrol, eugenol e metileugenol encontrados no óleo essencial. Maia et al. (1985) identificaram 16 substâncias no óleo essencial das sementes por meio de análise de CG/MS; os componentes majoritários foram: safrol (36%), 1,8-cineol (21,12%), limoneno (12,20%), α -terpinol (10,71%). Himejima e Kubo (1992) realizaram estudo sobre a avaliação antimicrobiana dos extratos hexânicos das sementes, e identificaram as substâncias presentes, que foram os compostos fenólicos: safrol, metileugeol, eugenol e anetol; monoterpênicos: α -terpinol, 1,8-cineol, 4-terpinol, geraniol, limoneno, γ -terpineno e lilanol; o sesquiterpeno cariofileno; além do ácido láurico. E descreveram que as substâncias testadas *in bruto* não mostraram atividade contra os micro-organismos testados; somente quando fracionadas. Graça (2003) realizou estudo etnobotânico em várias comunidades do município de Borba-AM, onde fez levantamento sobre o uso, habitat, safra, colheita a respeito da espécie. A tabela 1 mostra os estudos realizados cronologicamente com a espécie. E a tabela 2 descreve algumas substâncias encontradas nas diversas partes botânicas da *L. puchury-major*.

Tabela 1
Estudos realizados com a espécie *L. puchury-major*

Data	Autor	Parte botânica	Substâncias
1799	Robes	Sementes	Não fez estudo químico
1853	Bonaitre e Muller	Sementes	Subst. gordurosa sólida, resina mole, matéria corante, amido, ácido volátil e sacarina.
1913	Bonaitre <i>apud</i> Matta	Sementes O.E. e fixo	Subst. gordurosa sólida, resina mole, matéria corante, amido, ácido volátil e sacarina.
1916	Gildemeister & Hoffmann	Sementes	Não fez estudo químico
1920	A firma francesa Roure-Bertrand	Óleo essencial sementes	Safrol, eucaliptol, isoeugenol
1956	Otto Richard Gottlieb	Óleo essencial sementes	Safrol (36%), eucaliptol e eugenol(11.4%), ácido láurico
1966	W. B. Mors e C. T. Rizzini	Folhas	eucaliptol, safrol, α -terpinol, eugenol
		Galhos finos	eugenol, safrol, eucaliptol
1967	Seabra et al.	Folhas	eucaliptol, safrol, α -terpinol, eugenol
		Galhos finos	eugenol, safrol, eucaliptol
1973	José Guilherme Soares Maia	Extratos benzênico e etanólico da madeira dos galhos grossos	aldeído 3,4-metilenodioxicinâmico, álcool 3,4-metilenodioxicinâmico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído e mais 3 substâncias não identificadas
	Maia; Silva et al.	Madeira do tronco	aldeído 3,4-metilenodioxicinâmico, o álcool 3,4-metilenodioxicinâmico; aldeído siríngico, safrol, eugenol.
	Melo e Carlini	Óleo semente	eugenol
1974	Delcio Orni Laux	Extratos benzênico da casca da madeira dos galhos grossos	sitosterol + stigmasterol, safrol, eugenol, 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (liquexantona), 1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona (fisciona).
	Delcio Orni Laux	Líquén	1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (liquexantona)
	Wirth e Hale Jr	Líquén	1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona (fisciona)
1983	Carlini et al	Semente e hidrolato	Safrol, eugenol, metileugenol, 1,8-cineol, safrol, eugenol
1985	J. G. Soares Maia, L. Scott Ramos e A. I. Reis Luz	O.E. Sementes	Safrol, 1,8-cineol, limoneno, α -terpinol, , eugenol, metileugenol
1992	Masaki Himejima e Isao Kubo	Extrato em hexano (semente)	safrol, metileugeol, eugenol e anetol; α -terpinol, 1,8-cineol, 4-terpinol, geraniol, limoneno, γ -terpineno e lilanol,cariofileno além do ácido láurico..
2003	Graça, 2003	Estudo etnobotânico	Não fez estudo químico

Tabela 2
Principais constituintes químicos encontrados na espécie *L. puchury-major*.
(Adaptado da tabela1)

Classes Químicas	Principais contituientes químicos encontrados na <i>L. puchury-major</i>							
	O.E. semente	Hidrolato do (O. E. Sem.)	Ext. hexânico das sementes	O.E. (Folhas)	O.E. (galho grosso)	Extrato benzênico madeira (galho grosso)	Extrato benzênico Casca (galho grosso)	Extrato benzênico Líquen da casca (galho grosso)
Compostos fenólicos	safrol	safrol	safrol	safrol	safrol	safrol	safrol	
	eugenol	eugenol	eugenol	eugenol	eugenol	eugenol	eugenol	
	metileugenol		metileugenol					
Monoterpeno	eucaliptol (1,8-cineol)		eucaliptol (1,8-cineol)	eucaliptol (1,8-cineol)	eucaliptol (1,8-cineol)			
	α -terpinol		α -terpinol	α -terpinol				
	4-terpinol		4-terpinol					
	γ -terpineno		γ -terpineno					
	limoneno		limoneno					
	lilanol		lilanol					
Sesquiterpeno			geraniol				1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona	1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona
			cariofileno					
Outros						aldeído siríngico		
						aldeído 3,4-metilenodioxicaníco		
						álcool 3,4-metilenodioxicanâmílico		
							stigmasterol	
							stigmasterol	
							1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona	1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona
						1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona	1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona	

2.8 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Plantas medicinais são aquelas que têm efeito definido sobre doenças ou sintomas e que resistem à experimentação científica. Muitas destas devem sua ação farmacológica aos princípios ativos conhecidos, vindo a fornecer, em vários casos, matéria-prima para a indústria farmacêutica (LEE et al, 2004; NATARAJAN, 2005).

O uso de plantas medicinais e de seus extratos vem crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Uma considerável parte da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (BALUNAS et al., 2006; VARANDA, 2006). É importante ficar atento sobre “o uso popular tradicional de plantas medicinais”, pois somente a sua utilização não é suficiente para validá-las eticamente como medicamentos eficazes e seguros. A validação científica é essencial para o seu uso como medicamento alternativo (ABOUT, 1988; SIMÕES, 1999). Houve grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais visando à obtenção de novos compostos com propriedades farmacêuticas (CECHINEL e YUNES, 1998). Dentre estes compostos se destacam os constituintes químicos existentes nos óleos essenciais das plantas, pois pertencem ao maior e mais diversificado grupo dentro dos produtos naturais e apresentam uma grande importância terapêutica e econômica (SILVA et al, 2003b). Destaca-se que a composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém os fatores ambientais podem causar variações significativas em seus componentes. A época da colheita, fontes geográficas, o horário, o modo de secagem do material vegetal e fatores ambientais, como umidade, água, solo e herbivoria, também podem influenciar sobre a composição e o teor do óleo (SILVA et al., 2003a; SILVA et al, 2003b, GOBBO-NETO & LOPES, 2007) e, com isso, aumentar ou diminuir a resposta biológica (SANTOS et al, 2004; BURT, 2004). A definição de óleos essenciais é descrita por Cowan:

Os óleos essenciais, também denominados óleos etéreos (pela solubilidade em solventes orgânicos apolares) ou essências (pelo aroma agradável e intenso), são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e com densidade menor do que a da água, formados pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas. Os constituintes dos óleos podem ser baseados em uma estrutura teórica denominada de isopreno (1999).

Variam desde hidrocarbonetos terpênicos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos), terpenos oxigenados (álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis,

ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas) até compostos com enxofre e nitrogênio (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Constituem também matérias-primas de grande importância para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia. As substâncias orgânicas encontradas nos óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas são puras e extremamente potentes, consideradas a *alma* da planta, e são os principais componentes bioquímicos que possuem ação terapêutica. (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; MEDONÇA et al., 2008; SONWA e KONIG, 2001; SOUZA FILHO, 2009; ZAMBONI, 1983).

Nas Lauraceae, os óleos ocorrem em células parenquimáticas diferenciadas, onde os óleos essenciais podem ser obtidos de várias partes do vegetal, podendo estar estocados em órgãos como flores, folhas ou ainda nas cascas dos caules, madeiras, raízes, rizomas, frutos, ramos, galhos ou sementes. E, embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição varia conforme a localização. Apresentam misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, com até centenas de constituintes distintos, havendo sempre a prevalência de um ou dois grupos químicos, que assim irão caracterizar os aromas. Os componentes terpênicos, principais constituintes dos óleos essenciais, apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade herbicida, antimicrobiana, citostática, antitumoral e antioxidante (BARROS et al., 1997; MAIA et al., 2001; SILVA et al., 1992; SOUZA, 2007).

2.8.1 Plantas com atividades antioxidantes

O interesse na pesquisa por novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos, levando as indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos a terem a maior atenção quanto a novas fontes de antioxidantes naturais. (MANCINI FILHO et al., 1998). Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes. Os principais compostos antioxidantes encontrados nas plantas são os fenólicos, entre eles os flavonoides. No Brasil e recentemente na Região Amazônica, o interesse em antioxidantes polifenólicos derivados de plantas tem aumentado notavelmente na última década, devido a seu elevado poder de remoção de radicais livres associados com várias doenças. As substâncias antioxidantes presentes nas plantas podem ser de vários tipos:

antocianidinas, cumarinas, compostos fenólicos, flavonóides, licopeno, terpenos entre outros (SILVA et al., 2005).

Os chás são bebidas populares e fontes significativas de compostos fenólicos; são considerados importantes integrantes das dietas devido ao seu alto potencial antioxidante. Em função disso têm atraído muita atenção nos últimos anos associados ao fato de serem abundantes na dieta de milhares de pessoas em todo o mundo. São ricos em catequinas, uma das seis classes dos flavonoides. As catequinas dos chás apresentam propriedades biológicas como atividade antioxidante e são sequestradoras de radicais livres (ASOLINI et al., 2006).

Várias pesquisas no Japão mostraram que o consumo de cinco ou mais xícaras de chá por dia correlacionava-se negativamente com a recorrência das Fases I e II do câncer de mama em mulheres (JANKUN et al., 1999; SAKANAKA et al., 1989). Guo et al. (2005) citam que os compostos fenólicos presentes no chá verde apresentaram efeitos protetores às células contra a neurotoxina pro-parkinsoniana (6-OHDA). Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nas frutas, vegetais, chás e vinhos. Estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro* mostram múltiplos efeitos biológicos relacionados aos compostos fenólicos da dieta, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE et al., 2007; KUO, et al., 2005).

2.8.2 Plantas com Atividades Citotóxicas

Diante do uso descontrolado de fitoterápicos, tornou-se de grande importância o desenvolvimento de pesquisas na busca de comprovação científica de inúmeras plantas medicinais de uso popular para suas indicações, contraindicações e principalmente para verificar os efeitos tóxicos. Na área da fitoterapia, por exemplo, pesquisas são realizadas com o propósito de encontrar plantas que possuam princípios ativos na estrutura celular do eritrócito (CORRÊA et al., 2003 apud ALÍCIO 2008).

O conhecimento da constituição química das plantas aplicado na medicina popular envolve o estudo de interações do organismo com os efeitos das inúmeras classes de compostos e moléculas que podem existir numa única planta. Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994).

2.8.3 Plantas com Atividades Antimicrobianas

A busca de moléculas antimicrobianas naturais presentes em plantas tem sido alvo de diversos estudos científicos, e os dados obtidos são muito promissores na busca de novas substâncias bioativas (DUARTE et al, 2007; FRANCO, et al., 2007). Na medicina caseira, o decocto das cascas de planta é amplamente empregado, na maioria das regiões do Brasil, no tratamento de várias doenças como leucorreia, hemorragias, diarreia, hemorróidas; para limpeza de ferimentos, entre outras utilidades (NUNES et al., 2003; SOUZA et al., 2007). Essas atividades devem-se à riqueza em taninos presentes nas cascas de plantas (SANTOS et al., 2006). Segundo Toledo (2002) o extrato obtido das cascas de *Stryphnodendron adstringens*, conhecida popularmente como “barbatimão” demonstra atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Astolfi et al. (2007) citam em estudo realizado com o óleo essencial de *Cinnamomum camphora*, espécie pertencente à família Lauraceae, que o óleo apresentou ótimo resultado como agente antimicrobiano, quando testado com as bactérias gram-positivas: (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidi*), como também com as gram-negativas (*Citrobacter freundii*, *Shigella flexneri*).

Diferentes modos de ação dos óleos essenciais compõem os mecanismos de inibição dos micro-organismos. Compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais têm sido conhecidos por possuir atividade antimicrobiana, e alguns são classificados como “substâncias reconhecidamente seguras” (SINGH et al., 2002; DE JESUS, 2007).

O uso de plantas pode representar uma alternativa de substituição aos antissépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a esses compostos, uma vez que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (BARBOUR et al., 2004; MONTHANA e LINDEQUIST, 2005; SOUZA et al., 2007).

2.9 RADICAL LIVRE

O primeiro radical livre orgânico independente foi preparado no século XX, em 1900, no laboratório de Michigan, pelo russo Moses Gomberg, que utilizou a trifenilmetila, em uma solução amarelada, obtendo-se o radical livre a partir do trifenilmetano, um hidrocarboneto que serve de base para diversos corantes. E então a expressão “radical livre” passou a

significar uma molécula relativamente instável, com um ou mais elétrons sem par, cuja movimentação na órbita da molécula cria um tipo de efeito magnético, fazendo que o radical livre se combine com moléculas próximas (COOPER, 2005).

Muitos radicais livres são tão instáveis que existem apenas por alguns momentos ou microssegundos. Durante sua curta existência, os radicais atuam como catalisadores, ou pontes, para desencadear reações químicas ou modificações em outras moléculas. A qualidade veloz e altamente interativa de vários radicais livres foi identificada em 1929 pelos seguintes pesquisadores: o químico austríaco Friedrich Adolf Paneth e o alemão W. Hofeditz (COOPER, 2005). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. (HALLIWELL, 1997; GUO, 2003).

2.9.1 Oxidação Lipídica

A oxidação é uma reação que pode ocorrer nos alimentos provocando a perda do valor nutritivo pela decomposição dos ácidos graxos e a formação de compostos que podem reagir com outros componentes dos alimentos, os quais, com isso, se tornam prejudiciais aos organismos humano e animal. (MARINOVA e YANISHILIELA, 2003; MATHEW e ABRAHAM, 2005). A reação oxidativa pode ser prevenida pela adição de antioxidantes. Rigano e Distante (2010) citam que os processos químicos que ocorrem durante as reações abrangidas pela oxidação são:

- a) Redução do número de elétrons externos ao redor de um átomo ou de uma molécula, exceto de oxigênio);
- b) Adição de átomos de oxigênio a uma molécula;
- c) Retirada de átomos de hidrogênio de uma molécula, geralmente orgânica;
- d) Aumento do número de elétrons ao redor de um átomo de oxigênio;
- e) Formação de radicais livres.

2.9.2 Espécies reativas do oxigênio (EROs)

O processo que ocorre para a produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs), é descrito por Matsuo e Kaneko:

Durante a respiração celular na cadeia transportadora de elétrons, o oxigênio molecular é completamente reduzido a água. A molécula de oxigênio pode aceitar um total de quatro elétrons para ser reduzida a duas moléculas de água, mas pode, também, ser reduzida por um elétron por vez, levando à produção de Radical

Livre (RL), ou seja, a redução do oxigênio molecular forma as principais Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Dois a cinco por cento do oxigênio utilizado nesse processo são desviados para a formação de radicais. Após a formação, agentes antioxidantes atuam minimizando os efeitos deletérios sobre a célula. Durante esse processo podem ser formados outros elementos químicos que, ao reagirem com metais de transição, formam radicais livres adicionais; essas substâncias são capazes de reagir com qualquer tipo de molécula orgânica, extraindo elétrons e gerando novos radicais livres em cadeias citotóxicas (2000).

Segundo Ames e colaboradores (1993), descrevem que a redução do oxigênio molecular leva à formação das principais EROs:

- a) $\text{OH}\cdot$ - (Radical hidroxila) - Mostra uma pequena capacidade de difusão; é a espécie oxidante mais reativa na indução de lesões nas moléculas celulares; ataca rapidamente o DNA e provoca alterações químicas na desoxirribose, nas bases de purina e pirimidina. Esse processo gera mutações e ruptura dos filamentos do DNA.
- b) O_2^- - (Radical superóxido) - Apresenta uma baixa capacidade de oxidação; é formado *in vivo* como resultado de um incidente químico. Qualquer elétron que passa pela cadeia respiratória nas mitocôndrias se destaca do transportador de elétrons e passa diretamente para o oxigênio molecular formando, assim, o radical superóxido O_2^- , (FRIDOVICH, 1974; PINHEIRO, 2004). Trata-se de um processo comum na natureza e que pode modificar proteínas, porém é essencial para o equilíbrio fisiológico, porque permite que os fagócitos destruam qualquer cepa bacteriana.
- c) O_2^{\cdot} - (Oxigênio singlete) – É uma forma eletronicamente excitada do oxigênio molecular, produzida na célula via fotoquímica. É um radical muito reativo sobre as estruturas do DNA, do colesterol e dos lipídios. Provoca o enrugamento e o envelhecimento precoce.
- d) H_2O_2 - (Peróxido de Hidrogênio - água oxigenada) - Não é considerado um radical livre verdadeiro. Este composto não apresenta grande reatividade, mas pode formar oxidantes potentes *in vivo*, como o radical hidroxila. É capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas.

A produção de EROS nem sempre é prejudicial ao organismo; pelo contrário, é necessária em vários processos biológicos: sinalização celular, contração muscular e sistema imune (MATSUO E KANEKO, 2000). Quando as células são agredidas por algum agente estressor (que também pode ser RL), elas acabam produzindo RL para combatê-lo. O grande problema é, quando os níveis totais gerados de RL forem maiores que a capacidade de defesa,

podem induzir danos a biomoléculas e em grande extensão, levando à morte celular. (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

2.9.3 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes resulta na indução de danos celulares provocados pelos radicais livres é denominado “estresse oxidativo” (SIES, 1993; GUO, 2003). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores endógenos e exógenos (Tabela 3). Na condição de pró-oxidante a concentração dos radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (KAUR e KAPPOR, 2001).

Tabela 3
Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres

Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbica	Radiações gama e ultravioleta Ozônio
Inflamações	Poluição
Peroxisomos	Estresse
Enzimas do citocromo P450	Alimentação deficiente
	Cigarro
	Medicamentos
	Ozônio

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças (Tabela 4). (HALLIWELL, 1992; MARTINEZ-VALVERDE, 2002).

Tabela 4
Algumas doenças relacionadas com a geração de radicais livres

Artrite	Disfunção cerebral
Aterosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Enfisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

2.10 ANTIOXIDANTES

São definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato. Os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, pois eles são estáveis em ambas as formas (BACALLAO et al., 2001; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000).

Segundo Halliwell (1997; 1999); Prior e Cao, (1999), entre as diversas classificações existentes, as inúmeras substâncias antioxidantes podem ser classificadas em:

a) Quanto à localização: São exógenos (oriundos dos alimentos ingeridos) e endógenos (sintetizados pelo próprio organismo) (SILVA et al., 2005; SOUZA et al., 2008).

b) Quanto à Origem:

- Antioxidantes enzimáticos: representados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).

- Antioxidantes não enzimáticos: incluem os compostos sintetizados pelo organismo (bilirrubina, ceruplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q-10) e os ingeridos por meio da suplementação alimentar, tais como ácido ascórbico, δ -tocoferol, β -caroteno, flavonoides, entre outros.

c) Existem duas categorias básicas de antioxidantes, denominadas: sintético e natural (HALL III E CUPPET, 1997).

d) Quanto ao mecanismo de defesa podem ser classificados em três tipos (BENZIE, 1996; HALLIWELL, 1997; PRIOR e CAO, 1999):

- Antioxidantes de prevenção: Inibem a formação de radicais livres principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre;

- Antioxidantes varredores: Impedem o ataque dos radicais livres às células por meio da interceptação desses radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonoides e carotenoides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres;

- Antioxidantes de reparo: Favorecem a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas.

Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (Tabela 5) (SIES, 2003).

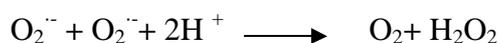
Tabela 5
Principais agentes de defesa antioxidante

Enzimáticos	Não enzimáticos
Superóxido dismutase	δ-tocoferol (vitamina E)
Catalase	β-caroteno
Glutathiona peroxidase	Ácido ascórbico (vitamina C)
Enzimas de reparo	Flavonoides
NADPH-quinona oxidoreductase	Proteínas do plasma
	Selênio
	Glutathiona
	Clorofilina
	L-cisteína
	Curcumina

a) Antioxidantes Enzimáticos:

O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (BARNETT e KING, 1995). Segundo Guo e colaboradores (2003), os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (BIANCHI, 1999; GUO et al., 2003).

- Superóxido Dismutase (SOD) – É por meio da reação de dismutação que a enzima SOD converte o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; é a primeira linha de ação defensiva do organismo contra as espécies reativas. Existem duas formas de superóxido dismutase: o cobre-zinco superóxido presente no citossol e o manganês-superóxido presente na mitocôndria (FRIDOVICH, 1989).

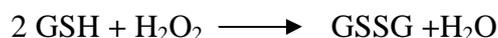


- Catalase (CAT) - A enzima catalase constitui o terceiro mecanismo redutor do organismo, atuando na degradação do peróxido de hidrogênio H_2O_2 de forma complementar à glutathiona redutase. Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular, e a outra é reduzida à água (GUO et al., 2003). Está localizada, principalmente, no peroxissoma, entretanto outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade com essa enzima (FRAISSE, 1993).



- Glutathiona Peroxidase (GPx) - A glutathiona peroxidase é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio H_2O_2 e dos peróxidos lipídicos

(hidroperóxidos orgânicos) (ROOH)) por meio da conversão da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG) (HALLIWELL, 1994) reduzindo para H₂O e álcool, usando a glutathiona (GSH) como doador de elétrons. Está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. (BECKER et al., 1996).



b) Antioxidantes Não Enzimáticos:

Encontrados largamente na natureza, são os chamados antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais e estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e os carotenoides como antioxidantes lipofílicos. (AMES et al., 1995; HALLIWELL, 1996).

- Compostos fenólicos:

Englobam desde moléculas simples até aquelas com elevado grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais nas formas livres ou conjugados (ligados a açúcares e proteínas). Estão divididos em dois grandes grupos: os flavanoides e seus derivados e os ácidos fenólicos (ácido cinâmico e derivados). Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas, encontrados nas frutas e hortaliças (SOUZA et al., 2008). Os compostos fenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas conforme descrito por Hermes-Lima:

A partir da glicose que é processada e usada para gerar os metabólitos secundários, originados a partir de aminoácidos aromáticos, como o triptofano, fenilalanina e a tirosina, precursores de compostos aromáticos. Alguns metabólitos secundários derivados do acetato são produzidos pela combinação desses intermediários ou de seus derivados, como flavonoides, antraquinonas e taninos. Nas plantas, os compostos fenólicos funcionam como componente estrutural, possuindo também excelentes atividades antioxidantes, antimicrobianas e antivirais (2004).

São um dos maiores grupos de componentes dietéticos não essenciais que estão associados à inibição da arteriosclerose e do câncer. A bioatividade dos fenólicos pode ser atribuída à sua habilidade de quelar metais, inibir a peroxidação lipídica e sequestrar radicais livres (CHEUNG et al., 2003; VILLANO et al., 2007).

As propriedades antioxidantes dos fenólicos ocorrem, principalmente, devido a seu potencial de oxirredução, que lhes permite atuar como agentes redutores, doando hidrogênio e neutralizando radicais livres (BORGUINI, 2006; RICE-EVANS et al., 1997). Uma substância polifenólica pode ser definida como um antioxidante unicamente se preencher duas condições: (1) quando presente em baixa concentração relativa ao substrato a ser oxidado,

este possa retardar ou prevenir a oxidação e; (2) quando os radicais formados após a reação sejam estáveis (KAUR e KAPOOR, 2001).

Esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica. Em certos sistemas podem inibir os processos da oxidação, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos, apresentando-se com atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997; HALLIWELL et al., 1995; HASSIMOTO et al., 2005).

Halliwell e colaboradores (1995) citam que os compostos fenólicos mais estudados são os ácidos cafeico, gálico e o elágico. Eis alguns com suas importâncias e onde são encontrados:

a) Ácido elágico - Encontrado principalmente na uva, morango e nozes, tem sido efetivo na prevenção do desenvolvimento do câncer induzido pelas substâncias do cigarro (CASTONGUAY et al., 1990 apud BIANCHI e ANTUNES, 1999);

b) Ácido caféico - Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, aquele mais comumente encontrado e de maior representatividade na dieta é o ácido caféico, composto sensível ao calor e produzido a partir da L-fenilalanina ou L-tirosina. Apesar do nome que o remete ao café, pode também ser encontrado em frutas e vegetais, como maçã, ameixa, uvas, tomates, e nas folhas de *Alsophila spinulosa*, uma pteridófito originária da China (CHIANG et al. 1994; MAURÍCIO, 2006);

c) Curcumina - Um composto fenólico usado como corante de alimentos, é um antioxidante natural derivado da cúrcuma (*Curcuma longa*) que tem sido extensivamente investigado. A curcumina sequestra os radicais livres e inibe a peroxidação lipídica, agindo na proteção celular das macromoléculas, incluindo o DNA, dos danos oxidativos (SUBRAMANIAN et al., 1994);

d) Flavonoides - São substâncias pertencentes a uma classe de produtos naturais, que atualmente podem ser consideradas como micronutrientes; estão presentes na dieta humana rica em vegetais e frutas encontradas largamente na natureza e ocorrem em plantas na forma livre ou glicosilada. Inibem as enzimas responsáveis pela produção do ânion superóxido e de outras enzimas envolvidas na produção de outras ERMOS, reduzindo a captura de espécies radicalares (CHOI et al., 2002; KORKINA e AFANAS ES, 1997; RICE-EVANS, 1995; SOUZA, 2008). Eis alguns flavonoides conforme descrito por Bianchi e Antunes (1999):

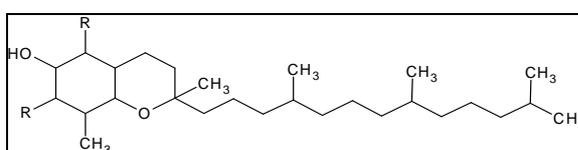
- Quercetina - Está presente nas frutas e vegetais; é o flavonoide mais abundante encontrado no vinho tinto. Entretanto esse antioxidante pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (GASPAR et al., 1993);

- Miricetina, quercetina e rutina - São mais eficientes que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 no DNA de linfócitos humanos (NOROOZI et al., 1998);
- (-)-epicatequina e rutina - Apresentaram atividade antioxidante sobre o OH^\cdot superior ao antioxidante manitol, um conhecido sequestrador de radicais hidroxila (HANASAKI et al., 1994);
- (-)-Epicatequina e (-)-epigallocatequina - São flavonoides naturais com propriedades antioxidantes e inibidores do processo de carcinogênese, encontrados no chá verde e em menores concentrações no chá preto (MUKHERJEE et al., 1997; RICE-EVANS et al., 1995).

Vitaminas antioxidantes:

As vitaminas C, E e o β -caroteno são excelentes antioxidantes, pois sequestram os radicais livres com eficiência. Fatores adversos como o uso de medicamentos, o tabagismo, as condições nutricionais, o consumo de álcool, a poluição do ar e outros podem diminuir os níveis de antioxidantes celulares (MACHLIN, 1992; ROE, 1992). As defesas antioxidantes do organismo se restabelecem com dietas apropriadas e suplementos vitamínicos (ANDERSON, 1996). O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998).

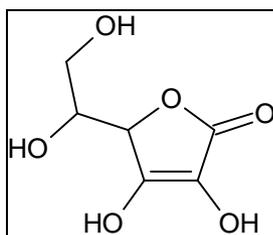
a) Vitamina E ou δ -tocoferol - (Quadro 2) - É lipossolúvel, presente nas membranas biológicas. Possui a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres (NUNES et al., 2007; TRABER 1997). Sua principal função está relacionada à interrupção das reações de auto-oxidação dos ácidos graxos altamente insaturados, atuando no processo inicial da peroxidação lipídica nas membranas biológicas em presença das ERMOS (LENHNINGER, 1986). É um componente dos óleos vegetais encontrado na natureza em quatro formas diferentes: α , β , γ e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma (PUGLISSE, 1998).



Quadro 2: Estrutura química da vitamina E

Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutatona, a vitamina C e os carotenoides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo (GARCÍA-ALONSO, 2004; RILEY, 1994). Evidências sugerem que essa vitamina impede ou minimiza os danos provocados pelos radicais livres associados com doenças específicas, incluindo o câncer, a artrite, a catarata e o envelhecimento (GARCÍA-ALONSO, 2004; HEINONEN et al., 1998; NATARAJAN, et. al., 2005).

b) Vitamina C ou ácido ascórbico - (Quadro 3) – É uma vitamina hidrossolúvel considerada um dos mais importantes antioxidantes presentes em fluidos extracelulares. No organismo, atua em defesa à ação das ERMOs, evitando a oxidação dos lipídeos insaturados. Porém, em elevadas concentrações ou na presença de metais (ferro ou cobre), poderá exercer função pró-oxidante, promovendo a lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A vitamina C ajuda a restaurar o fornecimento da vitamina, sendo esta protetora da toxicidade das drogas ou substâncias químicas, poluentes atmosféricos, exercício extenuante e radiação ultravioleta (PUGLIESE, 1998).

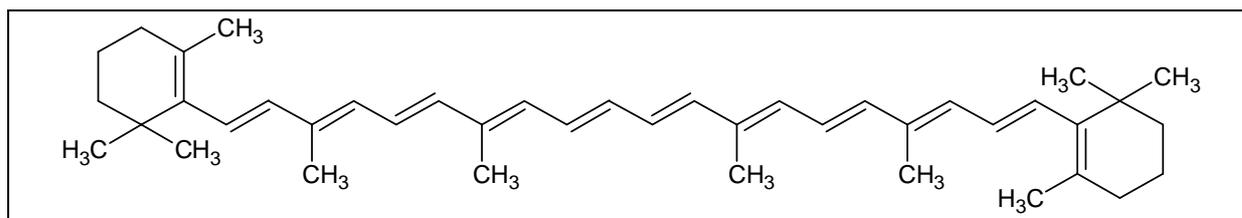


Quadro 3: Estrutura química do ácido ascórbico ou vitamina C

A vitamina C é um cofator de pelo menos 8 enzimas, tais como a hidroxilase de prolina e hidroxilase de lisina. Existe uma inter-relação entre os sistemas antioxidantes. Por exemplo, a vitamina C cede elétrons e reduz novamente a vitamina E, formando assim o ácido desidroascórbico, que pode ser regenerado pelo sistema redox da glutatona. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

c) β -Caroteno / vitamina A - (Quadro 4) - O β -Caroteno é um dos principais carotenoides (que são grupos de pigmentos naturais responsáveis pela coloração de inúmeros vegetais). O β -Caroteno também é conhecido como pró-vitamina A, pois, em nosso organismo, ele se transforma em vitamina A, de acordo com a necessidade (AGARWAL e RAO, 2000).

Estudos epidemiológicos também mostraram que o consumo regular de alimentos ricos em vitaminas A e C pode diminuir a incidência de câncer retal e de cólon. O β -caroteno, o mais importante precursor da vitamina A, está amplamente distribuído nos alimentos e possui ação antioxidante (GEY, 1998).



Quadro 4: Estrutura química do β -caroteno

Emprego dos antioxidantes:

a) Naturais

Conforme citado anteriormente os antioxidantes estão largamente distribuídos na natureza, presentes nos vegetais, e em particular nas especiarias e frutas; são encontrados em sua constituição, além dos nutrientes essenciais, compostos com ação antioxidante, de natureza fenólica, dentre os quais se destacam os polifenóis (HALLIWEL, 1996; HARBORNE e WILLIAMS 2000). Pompella (1997) cita que o emprego de antioxidantes naturais na dieta é de grande importância, visto que estão relacionados com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres.

Os antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonoides, carotenoides, curcumina e outros, são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (NATARAJAN, 2005; WATERS et al., 1996). Nos alimentos é encontrada uma variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (HUANG et al. 2005; NATARAJAN et al., 2005). A tabela 6 mostra onde os antioxidantes naturais podem ser encontrados:

Tabela 6
Algumas fontes de antioxidantes na dieta

ANTIOXIDANTES	ALIMENTOS
β -Caroteno	Mamão, Cenoura
Flavonóides	Brócolis, Salsa
Vitamina C	Laranja, Morango
Catequinas	Chá
Quercetina	Vinho
Carotenóides	Tomate
Ácido elágico	Uva
Curcumina	Curry
Polifenóis	Noz
Clorofinila	Espinafre
Taninos	Repolho

b) Sintéticos

A utilização de antioxidantes sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres, que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (ALONSO et al., 2004; MOURE et al., 2001). Dentre os sintéticos mais utilizados, destacam-se: BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), GP (galato de propila) e TBHQ (terc-butil hidroquinona) (HIROSE et al., 1981; RAMALHO e JORGE, 2006). São também aplicados em óleos e alimentos gordurosos para prevenir a deterioração oxidativa. No entanto propriedades carcinogênicas têm sido apontadas para os antioxidantes sintéticos. Assim, pesquisas sobre o potencial de aplicação de antioxidantes naturais provenientes de alimentos, para proteger os alimentos da oxidação, têm recebido maior atenção da comunidade científica (CHEUNG et al., 2003). O emprego desses compostos tem sido alvo de questionamentos, quanto à sua inocuidade, motivando a busca de antioxidantes naturais, que possam atuar isolados ou, sinergicamente, com outros aditivos, em substituição aos sintéticos (SOARES 2002).

2.10.1 Métodos para Determinar a Avaliação *in vitro* da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante pode ser determinada por meio de inúmeros métodos tanto *in vitro* como *in vivo*; a caracterização das atividades pode ser antioxidante/redutora (antioxidante: interfere com reações de oxidação mediante vários mecanismos; redutor: provoca reação de redução - aumento do número de elétrons ao redor de uma molécula/átomo). Pode ser realizada por meio de vários métodos químicos e tem sido largamente utilizada pelos fitoquímicos em extratos de origem vegetal. Essa atividade pode ser determinada utilizando-se substâncias conhecidas, capazes de serem reduzidas na presença de antioxidantes. (ARTS et al., 2004; BACALLAO et al., 2001; MENSOR et al., 2001; MOLYNEUX, 2004; YANG et al., 2007; VARGAS, 2008)

Segundo Arnao (2000), os principais passos para realização de um ensaio químico para caracterização dessa atividade são:

- a) Dissolver um cromógeno em meio apropriado;
- b) Adicionar o antioxidante (extrato/fração);

- c) Medir a perda fotométrica do cromógeno de natureza radicalar, de acordo com a perda de coloração, que ocorre proporcionalmente à concentração, observando a diminuição na absorvância de luz em um comprimento de onda conhecido;
- d) As diminuições podem ser correlacionadas em uma curva da dose-resposta com um antioxidante padrão, expressando a atividade antioxidante como equivalente à do antioxidante padrão.

Os métodos para determinar a atividade antioxidante *in vitro* são classificados em: (DAVID et al., 2004), citado por Vargas, (2008).

- a) Varredura de radicais livres: DPPH[•] e ABTS⁺ - Empregam-se radicais estáveis em solução colorida. Após a adição do antioxidante com capacidade de sequestrar esses radicais que foram produzidos, ocorre mudança de coloração da solução;
- b) Inibidores de reações de oxidação ou auto-oxidação: O sistema β -caroteno/ácido linoleico (LPO – Lipoperoxidação), onde se empregam lipídios como substrato.
- c) Medidores de potencial de oxirredução;
- d) Ressonância magnética nuclear de *spin* de elétron.

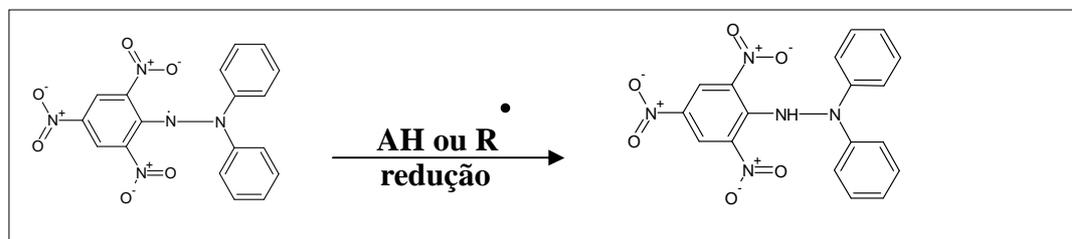
2.10.1.1 Método para Quantificação de Fenóis Totais (fenóis e polifenóis)

Os polifenóis têm capacidade comprovada de doar hidrogênios e quelar íons metálicos como ferro e cobre, inibindo a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SOARES, 2002; VILLANO et al., 2007). Um dos métodos mais utilizados para quantificar os compostos fenólicos é realizado usando-se o reagente Folin-Ciocalteu, método que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760nm, conforme descrito por Swain e Hillis (1959). Esse método permite também quantificar flavonoides, antocianinas e compostos fenólicos presentes nas amostras.

2.10.1.2 Método DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

O método da atividade antioxidante pela captação do radical DPPH[•] foi inicialmente proposto por Blois (1958). O radical DPPH[•] é caracterizado como um radical livre, estável, de cor violeta e com banda de absorção em solução centrada em 517nm. Quando uma solução de DPPH[•] é misturada a outra que possa doar um próton, a forma reduzida do DPPH[•] é gerada, com a perda da cor violeta e o aparecimento de uma cor amarela clara (MOLINEUX, 2004).

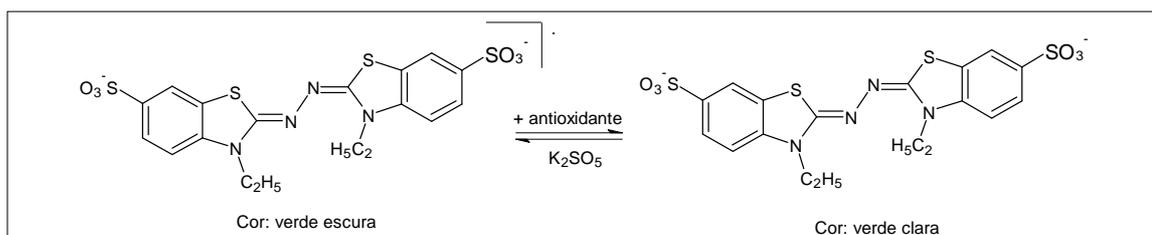
Portanto esse método mede a capacidade em doação de prótons da amostra. Sua popularidade pode ser atribuída a sua simplicidade e velocidade de análises, mas isso é atingido a certo preço: a relevância dos dados obtidos deve ser cuidadosamente considerada (ANTOLOVICH et al., 2002) (Quadro 5).



Quadro 5: Estrutura química do radical DPPH^{•+} : na forma de radical livre e reduzida

2.10.1.3 Método ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato))

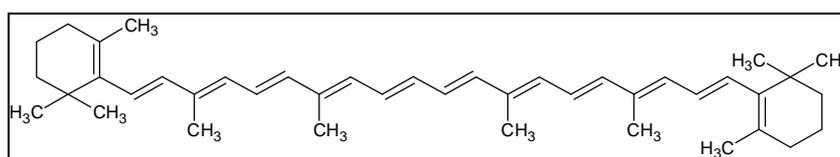
Um dos métodos mais utilizados é do ABTS^{•+}, o qual é solúvel tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico e, portanto, pode-se medir a capacidade antioxidante de compostos tanto de natureza hidrofílica quanto lipofílica. O radical ABTS^{•+} tem também a vantagem de seu espectro apresentar absorvância máxima a 414, 654, 754 e 815nm, (KUSKOSKI et al., 2005). Segundo Re e colaboradores (1998), o teste de varredura do radical 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) ou ABTS^{•+}, é baseado na redução deste reagente, e a atividade antioxidante é mediante a captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) – que é gerado por meio de uma solução, onde o cátion radical ABTS^{•+} é preparado a partir da reação de solução estoque de ABTS^{•+} com solução de persulfato de potássio. Com isso, o radical livre ABTS^{•+} é gerado após essa reação química e, para isso, a solução é armazenada em frasco âmbar no escuro por 12 horas e, após esse período reacional, a solução deverá ser diluída até a obtenção de absorvância no espectrofotômetro de UV a 620nm. O cátion radical ABTS^{•+} captura os hidrogênios mudando sua coloração azul para incolor (Quadro 6). As leituras deverão ser realizadas em dois tempos de reação. A curva de calibração deverá ser preparada com uma amostra padrão (ARNAO et al., 2000; 2001).



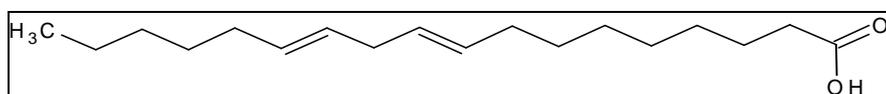
Quadro 6: Estrutura química do cátion radical ABTS^{•+} na forma de radical livre e reduzida

2.10.1.4 Sistema β -caroteno/ácido linoleico (Lipoperoxidação – LPO)

Os inibidores de reações de oxidação ou auto-oxidação avaliam a atividade antioxidante de uma determinada substância com acompanhamento da concentração das substâncias a serem protegidas. Os medidores de potencial de oxirredução têm este nome por avaliarem, primeiramente, o potencial de oxidação e redução. Teoricamente, a capacidade antioxidante da substância é proporcional ao valor do potencial de redução (CARVALHO, 2004). Esse método foi primeiramente desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). O sistema β -caroteno/ácido linoleico emprega lipídeos como substrato, baseando-se na descoloração do β -caroteno (Quadro 7) induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (Quadro 8). É um método executado em meio emulsionado, simples, sensível, mas não específico (diferentes indutores, como oxigênio, luz e calor, podem interferir no ensaio). A queda na absorvância é efetuada a 492nm, na presença e na ausência de um antioxidante (controle), e a percentagem de inibição da oxidação lipídica é determinada em relação ao controle (ANTOLOVICH et al., 2002). Esse método já foi utilizado para se determinar atividade antioxidante em diversos alimentos, como na castanha-do-Brasil (MELO, 1989) e em diversas hortaliças asiáticas como o brócolis, couve-de-Bruxela e tomate (KAUR e KAPOOR, 2002).



Quadro 7: Estrutura química do β – Caroteno



Quadro 8: Estrutura química do ácido linoleico

2.11 ATIVIDADES CITOTÓXICA

A atividade citotóxica é importante para a descoberta de compostos com atividade anticâncer (CEPLEANU et al., 1994). A busca de novos compostos antimutagênicos que atuem na prevenção da oxidação de biomoléculas importantes é um campo promissor em fitoterapia (RAMOS et al., 2003).

2.11.1 Métodos para Determinar a Avaliação da Atividade Citotóxica

Dentre os inúmeros ensaios realizados para detectar a atividade citotóxica, pode ser utilizado o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982), como também o ensaio sobre os eritrócitos humanos dos extratos de plantas pode ser obtido por meio do teste hemolítico, pelo fato de existirem determinados compostos cujas propriedades físico-químicas e biológicas apresentam a capacidade de desorganizar as membranas das células sanguíneas, causando hemólise. (CARVALHO, 2009; EVANS, 2002).

2.11.1.1 Atividade *in vivo* Frente ao Microcrustáceo *Artemia salina*

Artemia salina é uma espécie de microcrustáceo da ordem *Anostraca*, utilizada como bioindicador de toxicidade. Esta espécie é utilizada em testes de citotoxicidade devido à sua capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo, desse modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas de organismo-teste. É uma espécie de fácil manipulação em laboratório e de baixo custo econômico (CALOW, 1993; LIMA et al., 2009).

O bioensaio frente à *Artemia salina* é utilizado para testar a atividade citotóxica dos extratos de plantas e consiste em avaliar a exposição de um determinado composto frente a esse crustáceo. A análise é feita mediante o cálculo da Concentração Letal (CL₅₀), ou seja, a concentração que dizima metade de uma população (DOLABELA, 1997). Nesses estudos envolvendo atividades citotóxicas, são realizadas avaliações estimativas e preliminares das propriedades tóxicas dos extratos ou substâncias isoladas dos extratos de plantas (CHAN et al., 1982). Essas análises são capazes de nos fornecer informações importantes acerca dos riscos à saúde do ser humano e dos animais, resultantes de uma exposição, mesmo que de curta duração, a eles. O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, por ser um procedimento biológico rápido, de baixo custo e simples, tem sido amplamente utilizado e tem sido demonstrada uma boa correlação com a atividade antitumoral, sendo então indicado na avaliação preliminar de extratos vegetais e compostos puros (SIQUEIRA et al., 2001).

2.11.1.2 Atividade *in vivo* Frente ao Teste Hemolítico

Hemólise é o rompimento dos eritrócitos (glóbulos vermelhos) com liberação de hemoglobina no plasma (sangue circulante: hemólise intravascular; ou num tecido: hemólise extravascular). As células vermelhas não apresentam organelas citoplasmáticas e contêm em seu interior uma solução de proteínas e eletrólitos, sendo que a hemoglobina (Hb) constitui mais de 95% das proteínas intracelulares (LEE et al., 1998). Quando as hemácias são submersas em soluções hipotônicas ou em água destilada, a Hb sai das células e se difunde para o meio. Esse fenômeno é denominado hemólise e pode também ser produzido por diversas substâncias, tais como saponinas (VILLELA et al., 1978; ASCARI, 2007). As análises *in vitro* e *in vivo* são importantes na detecção de bioatividades de extratos e de substâncias isoladas de materiais vegetais e outros (BLANCO, 2006). A facilidade de obtenção ou a essencial função biológica (transporte de O₂) dos eritrócitos são usados como modelo biológico. A própria medida hemolítica é um fator determinante na atividade biológica, visto que, por meio desta, pode ser verificada a funcionalidade dos eritrócitos quando estes interagem com a droga testada, a qual pode ser um álcool (CHI e WU, 1991; SEEMAN, et.al., 1970), surfactantes (GALEMBECK, 1998), antielmínticos (MALHEIROS et al, 2000) e anestésicos locais (SEEMAN, et.al., 1972).

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) pode ser definida como a resistência dos eritrócitos à hemólise, avaliada pelo uso de soluções tamponadas de Cloreto de Sódio (NaCl) em água destilada em concentrações crescentes de 0,9 a 0%. Vários fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam a fragilidade osmótica dos eritrócitos, ocorrendo diminuição ou aumento desta em condições diversas, a exemplo fatores como a forma, o volume, o tamanho do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, além das diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural delas (PERK et al., 1964 apud ALÍCIO, 2008).

Os eritrócitos apresentam membrana lipoproteica, contendo aproximadamente quantidades iguais de lipídeos e proteínas. Os lipídeos são fosfolipídios, em sua maior parte colesterol não esterificado, e eles têm papel importante na manutenção da flexibilidade e da deformabilidade celular. Os componentes proteicos da membrana são divididos em proteínas transmembrânicas, que atravessam a bicamada lipídica, e proteínas interiores, situadas na base da bicamada lipídica (LACERDA, 2005 apud ALÍCIO, 2008). Alterações na estrutura da membrana podem afetar o balanço de água e o fluxo de íons, provocando deficiências

específicas ou alterações de certos componentes da membrana, resultando em uma série de enfermidades a exemplo da anemia (MURRAY et al., 2005 apud ALÍCIO, 2008).

2.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Tem sido considerada a base de várias aplicações, incluindo preservação de alimentos e produção de fármacos alternativos (TSIGARIDA, et al., 2000)., A investigação por antimicrobianos com atividade assume relevância particular devido ao aumento da resistência de determinadas bactérias aos antibióticos mais comuns e aos agentes microbianos utilizados na preservação de alimentos (ADAM, 2002). Os resultados de estudos obtidos com as diferentes metodologias utilizando micro-organismos podem abrir perspectivas no sentido de desenvolver um antimicrobiano eficaz, podendo ser usado no tratamento de doenças infecciosas causadas por estes (ASTOLFI et al., 2007).

2.12.1 Método para Determinar a Avaliação da Atividade Antimicrobiana

2.12.1.1 Método por Difusão em Cavidade

Um dos ensaios microbiológicos muito utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana é o método de difusão em meio sólido por cavidade-placa, o qual é realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Mueller-Hinton, que, após serem previamente inoculados com o micro-organismos, são feitos orifícios de 7mm de diâmetro por 5mm de profundidade feitos no próprio meio de cultura, são adicionadas a solução a ser testada. A formação do halo de inibição é avaliada em comparação com uma droga padrão e com a medição do diâmetro (CLEELAND e SQUIRES, 1991).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS.

Leitor de microplaca Elisa, modelo DTX800 multimode detector, (Beckman Coulter);

Evaporador rotatório FISATOM 802;

Spry draying, modelo Dwyer MSD 1.0, fabricante Labmaq do Brasil Ltda.

Incubadora TE-420, fabricante: Tecnal;

Banho Maria TE-054 mag, fabricante Tecnal

Deionizador de água: millipore Milli-RO 12 plus (sistema millipore corp, MA, EUA).

Balança analítica marca Mettler-Toledo, modelo AB204, capacidade de 210g;

Balança semianalítica, modelo BG 200, marca QUIMIS;

Lavadora ultrassônica, modelo USC 1400, marca UNIQUE;

Pipetas automáticas, modelos GILSON de volume variável P20, P200 e P1000;

Micropipetas de volume variável (2-20 μ L; 30-200 μ L; 200-1000 μ L), fabricante Gilson, modelos Pipetman P20, P200 e P1000;

Pipetas monocanal e multicanal eppendorf (Eppendorf do Brasil Ltda. – São Paulo, Brasil).

Microtubos *Eppendorf* STANDART 3810 de 1,5 e 2,0mL;

Centrifuge 5804R, fabricante Eppendorf;

Centrífuga para microtubos, fabricante Eppendorf, modelo Mini Spin;

Cronômetro digital;

Vidrarias diversas;

3.2 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS EM FITOQUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os reagentes e os solventes utilizados foram de grau analítico, e a maioria deles foram obtidos dos fabricantes: Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). E também do Laboratório (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), entre outros.

Solventes utilizados nas extrações das amostras e ensaios:

- Etanol (C₂H₆O);

- Metanol (CH₃OH);

- Diclorometano (CH_2Cl_2);
- Hexano (C_6H_{14});
- Éter etílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$);
- A água utilizada nos experimentos foi deionizada e/ou destilada diariamente a fim de garantir a qualidade das soluções.

Materiais utilizados em diversos ensaios:

Testes de Atividade Antioxidante:

- ABTS⁺ (ácido-6-sulfônico-2,2,-azinobis3-etilbenzotiazolina); Sigma-Aldrich (Miami-EUA);
- DPPH^{*} ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) - (1,1-difenil-2-picrilhidrazila); - Sigma-Aldrich (Miami-EUA);
- Quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - Sigma;
- β -caroteno ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$);
- Ácido linoleico ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$);
- BHT (2,6-Di-*terc*-butil-4-metil-fenol) ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$) – Sigma-Aldrich;
- Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) – Merck;
- Persulfato de potássio (Na_2SO_4) – Baker;
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3);
- Clorofórmio;
- Tween 80.

Testes de Quantificação de fenóis totais:

- Reagente de Folin Ciocateu;
- Carbonato de sódio (NaHCO_3);
- Ácido gálico $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$.

Teste de *Artemia salina*:

- DMSO - Dimetilsulfóxido ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) – Vetec;

Testes Hemolíticos:

- Cloreto de Sódio (NaCl);
- Cloreto de Cálcio (CaCl_2);
- Triton X-100 ($\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$).

3.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO:

3.3.1 Locais da Coleta

As amostras da planta foram coletadas no município de Borba-AM, localizado na 5.^a Sub-região do Rio Madeira, a 150 Km de Manaus em linha reta, nas seguintes localidades: Igarapé do Piaba (Figura 18a), comunidade Cinco Irmãos (Figura 18b), sítio São Bento, localizado no assentamento do INCRA (Figura 18c), e Igarapé do Querosene (Figura 18d).

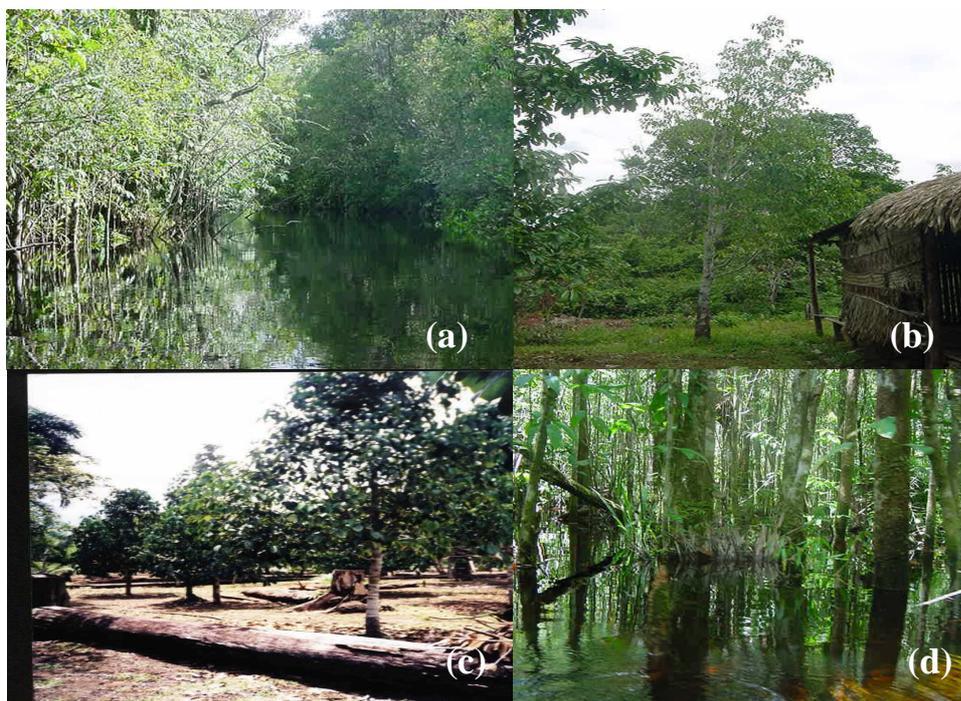


Figura 18: Locais da coleta do material botânico: (a) Igarapé do Piaba; (b) Comunidade Cinco Irmãos; (c) Sítio São Bento; (d) Igarapé do Querosene.

Fonte: Rosilane R. Graça

3.3.2 Preparo do Material

As partes botânicas obtidas foram sementes, folhas, flores, galhos finos e grossos, caule, foram realizadas coletas em diferentes datas. As folhas, galhos, sementes e tronco foram coletados em janeiro (2008); todos os materiais foram armazenados em sacos plásticos, previamente etiquetados. As flores foram coletadas em dias diferentes no mês de junho (2008), época da floração, armazenadas em caixas de isopor e transportadas de avião no mesmo dia para o Laboratório da Coordenação de Pesquisa de Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas - UEA.

Os outros materiais foram transportados de barco com o mesmo destino. As folhas, caule, galhos finos e grossos foram selecionados e secos ao ar livre em temperatura ambiente por um período de 2 a 3 dias e posteriormente moídos e armazenados em sacos de papel. As flores foram guardadas em caixa de isopor em *freezer* (-18°) até sua utilização.

3.3.3 Identificação

A planta já havia sido identificada, em 2003, pela Dra. Marlene Freitas da Silva (*in memoriam*), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Foram feitas identificações taxonômicas e de comparação com materiais bem identificados, pertencentes aos acervos dos herbários do INPA e complementadas com as descrições originais bibliográficas. As exsicatas (Figuras 19a e 19b) foram depositadas no herbário e na xiloteca da antiga UTAM, atualmente EST – Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, sob a numeração UTAM 4036.



Figura 19: Exsicatas das folhas e frutos da *L. puchury-major* : (a) “puxuri-embaúba” (b) “puxuri-roxo”.
Fonte: Rosilane R. Graça

3.3.4 Obtenção das Amostras

3.3.4.1 Obtenção dos Extratos Vegetais das Folhas em DCM e MeOH:

Para obtenção de cada extrato, foram utilizados 200g das folhas nativas secas e trituradas em moinho de facas, que foram deixadas sob maceração por três dias, primeiro com diclorometano na proporção de 2% (p/v) e filtrado, utilizando-se papel de filtro Whatman n.º 6; o resíduo foi reextraído com o mesmo volume de solvente, utilizando-se o metanol e seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para o primeiro extrato. Para a eliminação

dos solventes e para a obtenção dos extratos brutos, estes foram concentrados em rota evaporador sob pressão reduzida (45° - 50°). E armazenados no *freezer* até sua utilização (-10°). O procedimento de obtenção encontra-se delhado no fluxograma.

3.3.4.2 Obtenção do Óleo Essencial

Os óleos essenciais das folhas e flores foram obtidos por hidrodestilação, utilizando-se um extrator do tipo Clevenger acoplado a um balão de vidro de fundo redondo de 1000ml, ao qual se adicionaram 500g de folhas secas trituradas e/ou 10g de flores para o mesmo volume de água destilada, 500mL respectivamente, que foram mantidas a temperatura de 100°C, por um período de três horas e meia. O óleo obtido foi seco em Na₂SO₄ anidro (sulfato de sódio anidro) e armazenado em frascos de vidro “âmbar” sob refrigeração (-10°) para evitar perdas de constituintes voláteis e posteriormente submetido às análises.

O material resultante do arraste a vapor d’água, denominado hidrolato, que é a água que esteve em contato com o óleo, foi também armazenado em frascos de vidro “âmbar” sob refrigeração (-10°). Esses materiais se precipitaram e receberam a denominação de “cristais”, os quais foram também submetidos às análises.

3.3.4.3 Obtenção dos Extratos Aquosos

O processo de obtenção dos extratos aquosos das folhas, galhos finos, caules e sementes (triturados no moinho de facas) se deu por aspersão, utilizando-se o “spray drier” secador por aspersão (é um equipamento que admite a alimentação somente em estado fluido como: solução, suspensão ou pasta e converte em uma forma particulada seca pela aspersão do fluido em um agente de secagem aquecido (usualmente o ar)). A solução aquosa foi preparada com 75g da amostra triturada e 01 litro de água destilada, foram macerados por 15 minutos e então filtrados em papel de filtro Whatman n.º 6 e depois secos por aspersão. Os materiais obtidos foram pesados e armazenados no *freezer* até sua utilização (-10°).

3.3.4.4 Obtenção dos Chás

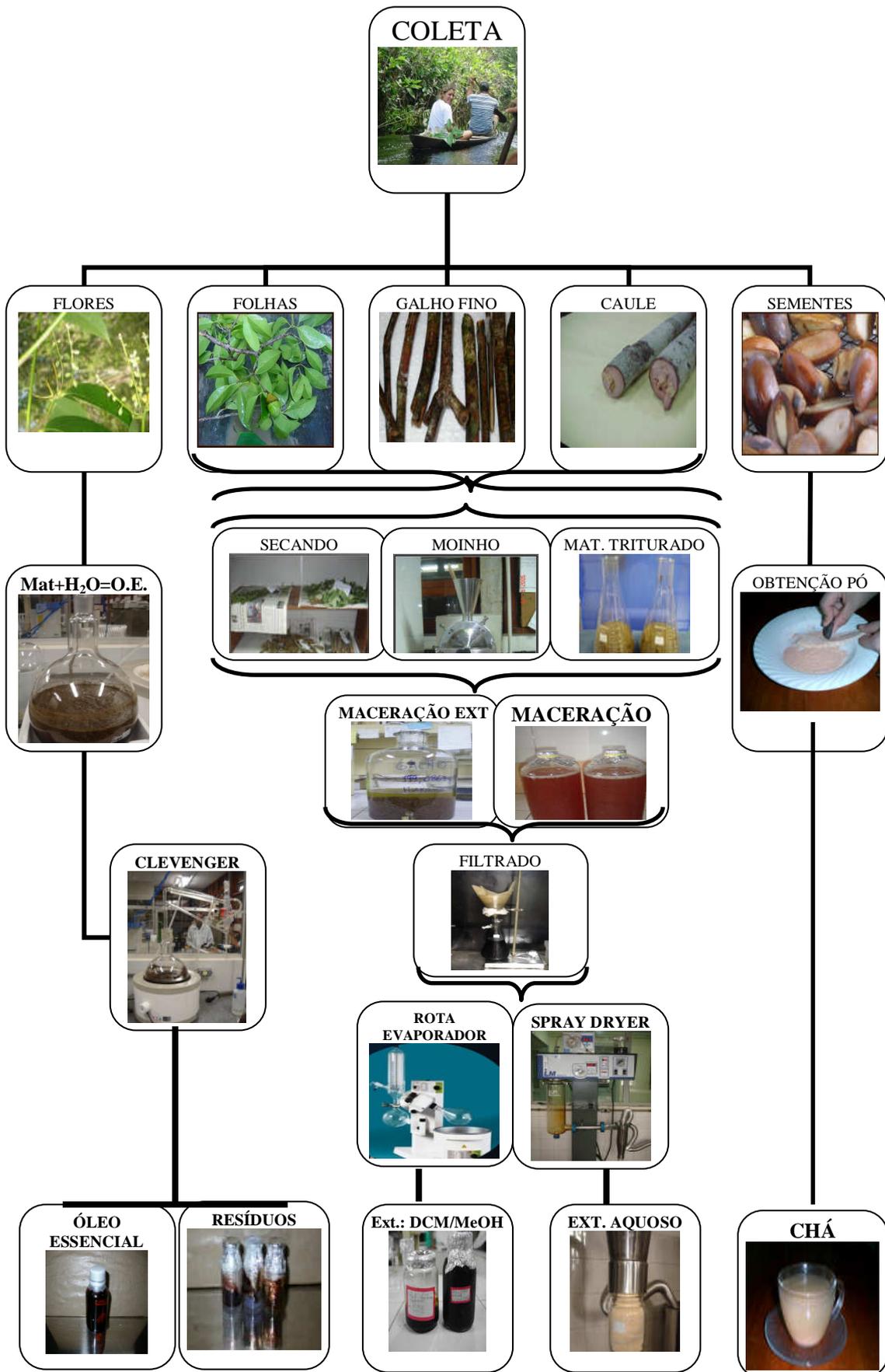
Foram preparados por infusão da mesma forma que se faz nas comunidades do município de Borba. As folhas, galhos finos e grossos foram triturados à mão e, a semente foi ralada na língua do pirarucu. Adicionou-se, em uma xícara, cerca de 5g do material e água

quente até cobrir; abafou-se com pirex por 10 a 15min. O procedimento de obtenção de cada amostra e sua identificação encontram-se delhados na tabela 7 e no fluxograma (Esquema 1).

Tabela 7
Partes estudadas da espécie *L. puchury-major*

Nº. amostra	Parte utilizada	Material	Solvente	Extração	Tempo	Evaporação de solventes
1	Flor- c	óleo essencial	H ₂ O destilada	arraste a vapor	3h30min	Aparelho do tipo Clevenge
2	Folha-n.					
3	Folha -n	extrato	diclorometano	maceração a frio	24h	Rota evaporador
4	Folha-n		metanol		48h	
5	Folha-n	extrato aquoso-1	H ₂ O destilada	Maceração a quente	15 minutos	Spray dryer
6	Folha-c					
7	Galhos finos-n					
8	Caule-n					
9	Semente-n					
10	Folha-n-1 (velhas)	chá	H ₂ O mineral	Fervida / Infusão	12 horas	Não foi evaporado
11	Folha-c-2 (novas)					
12	Folha-n-1trit.(velhas)					
13	Galhos finos-n					
14	Galhos grossos-n					
15	Semente-n			Infusão	12 horas	
16	FLOR-c	Resíduos "cristais"	hidrolato -arraste à vapor - Flor	armazenado em refrigerador (10°)	30-40 dias	material precipitado
17	Folha-n		hidrolato -arraste à vapor - folha			

Nota: n = nativa, c = cultivada.



Esquema 1: Fluxograma da obtenção da amostras da *L. puchury-major*.

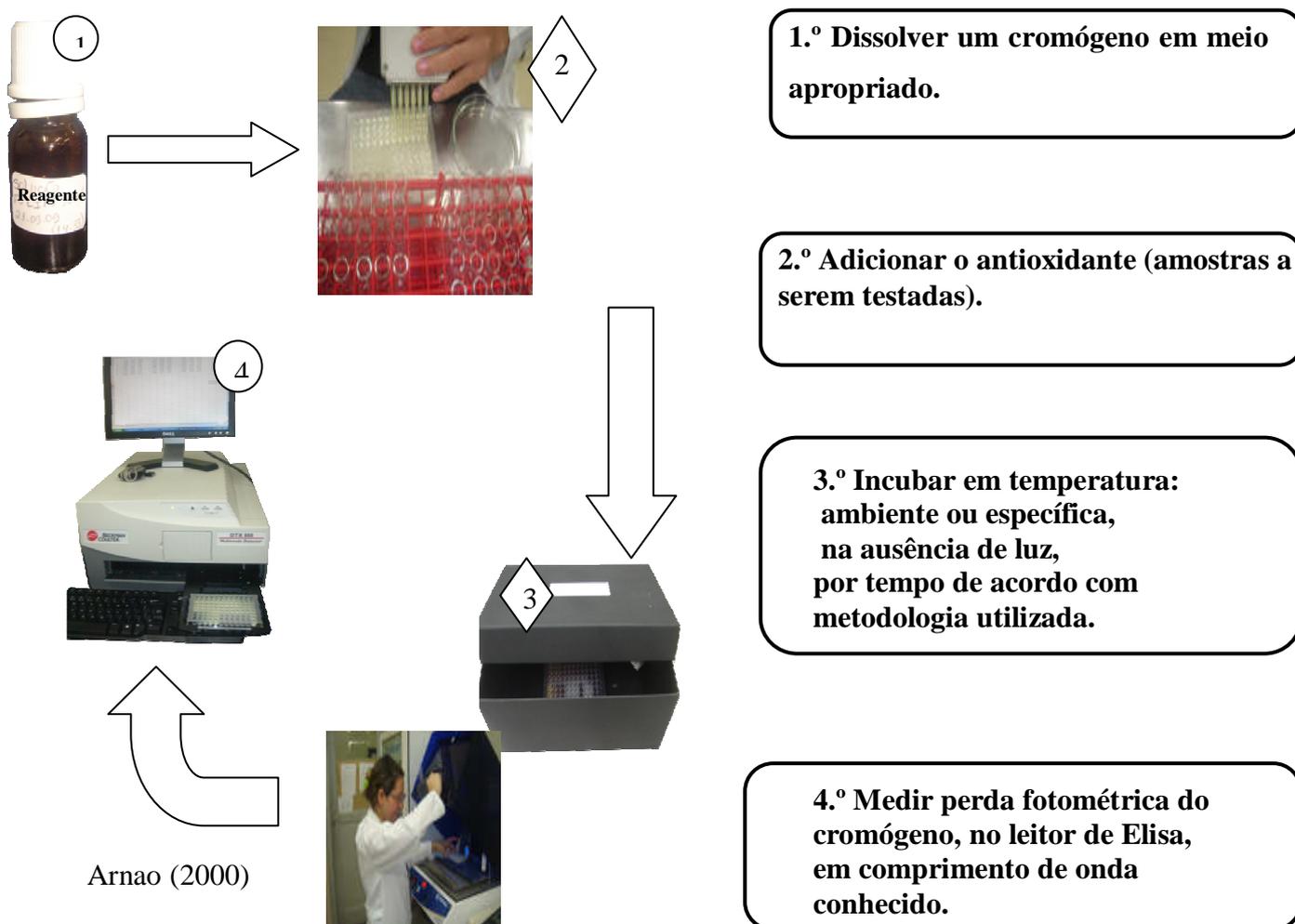
3.3.5 Cálculo do Rendimento das Amostras

O rendimento foi calculado na relação massa/massa pela medida da densidade, observando-se o volume obtido no próprio sistema de extração. Para a medida da massa, utilizou-se uma balança analítica (MELTER, modelo AE-240, com precisão de 10^{-4} unidades).

3.4 PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Todos os ensaios para avaliação da atividade antioxidante foram executados no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas, sob a supervisão do Professor Dr. Emerson Lima.

O modelo dos ensaios *in vitro* para caracterização das atividades antioxidantes, presentes nas amostras da espécie *L. puchury-major*, foram adaptados a microplacas para todas as metodologias (esquema 2):



Esquema 2: Procedimento dos ensaios para determinação da Atividade Antioxidante.

3.4.1 Preparo das soluções das amostras a serem testadas (1mg/mL):

Para a realização de todos os ensaios testados, utilizou-se a mesma concentração para todas as amostras e padrões 1mg/mL. Primeiramente, pesaram-se 10mg (0,010g) de cada amostra: extratos (DCM, MeOH e Aquosos), óleos essenciais e cristais (hidrolatos), e diluiu-se em 1mL (1000 μ L) do diluente (etanol, DMSO ou água deionizada); para melhor solubilização, homogeneizou-se em vortex, ultrassom ou banho-maria, obtendo-se primeiramente a concentração inicial de 10mg/mL. As soluções foram armazenadas em microtubos encapados com papel alumínio durante a realização dos experimentos. O preparo das soluções das amostras encontra-se detalhado na tabela 8.

Tabela 8
Preparo das soluções das amostras de *L. puchury-major*

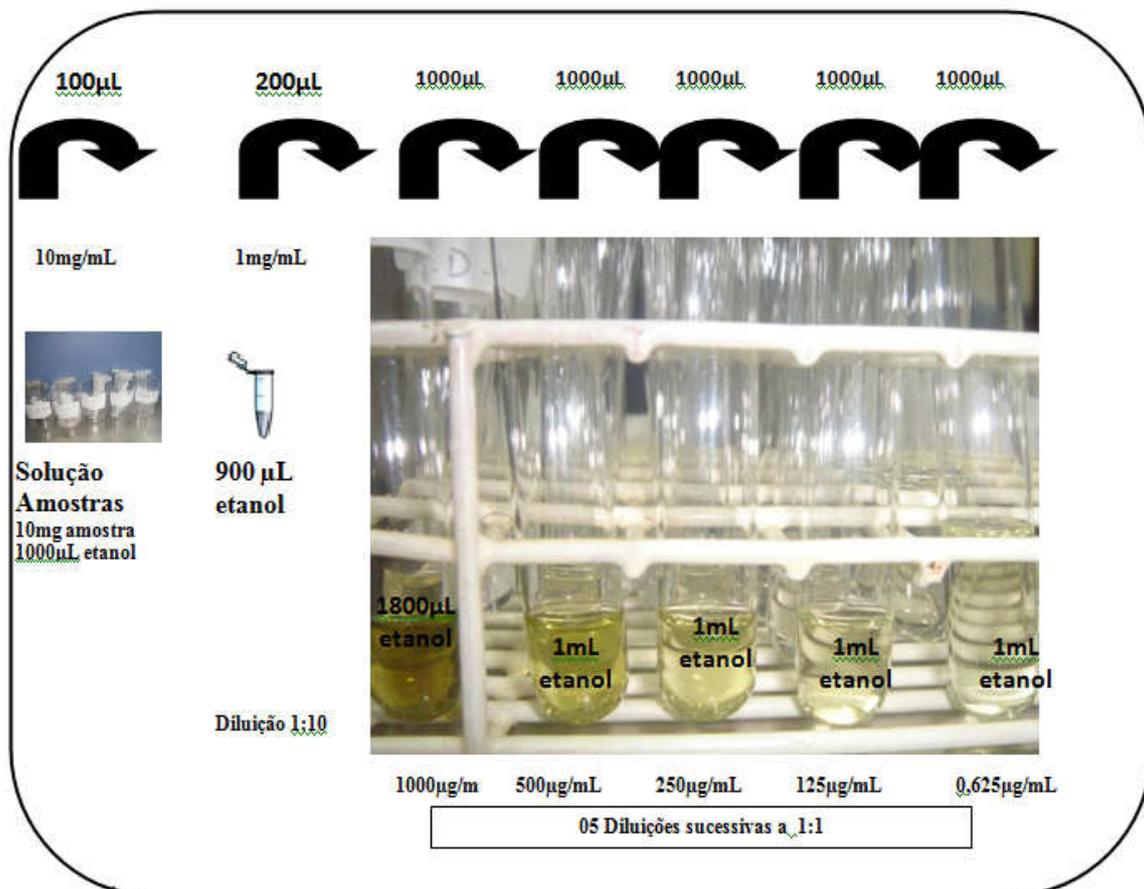
Partes botânicas estudadas (Qtd.)			Diluyente (Qtd.)		Homogeneização
Óleo Essencial	1-Flor-c	10 mg	Etanol / DMSO	1mL	vortex
	2-Folha-n	10 mg	Etanol / DMSO	1mL	vortex
Extrato diclorometano	3-Folha-n	10 mg	Etanol / DMSO	1mL	Vortex / ultrassom
Extrato em metanol	4-Folha-n	10 mg	Etanol / DMSO	1mL	Vortex / ultrassom
Extrato aquoso	5-Folha-n	10 mg	H ₂ O deionizada	1mL	vortex
	6-Folha-c	10 mg	H ₂ O deionizada	1mL	vortex
	7-Galhos finos-n	10 mg	H ₂ O deionizada	1mL	Vortex / ultrassom
	8-Caule-n	10 mg	H ₂ O deionizada / DMSO	1mL	Vortex / ultrassom / banho-maria
	9-Semente-n	10 mg	H ₂ O deionizada / DMSO	1mL	Vortex / ultrassom / banho-maria
Chá	10-Folha-n-1 (velha)	3 und. / 100mL	H ₂ O	1mL	-
	11-Folha-c-2 (nova)	3 und. / 100mL	H ₂ O	1mL	-
	12-Folha-n-1 trit. (velha)	1 colher (sopa) / 100mL	H ₂ O	1mL	-
	13-Galhos finos (nat.)	3 und. (5cm) / 100mL	H ₂ O	1mL	-
	14-Galhos grossos-n	3 und. (5cm) / 100mL	H ₂ O	1mL	-
	15-Semente-n	1 colher (sopa) / 100mL	H ₂ O	1mL	-
Hidrolato “cristais” (mat. precipitado)	16-Flor-c hidrolatos	10 mg	H ₂ O deionizada	1mL	vortex
	17-Folha-n hidrolatos	10 mg	H ₂ O deionizada	1mL	vortex

Nota: n = nativa, c = cultivada.

3.4.2 Preparação da Curva Dose-Resposta realizadas (em todas as metodologias)

Para todos os métodos foram realizados testes quantitativos e, com isso, foram feitas diluições das amostras e dos padrões para a obtenção da curva Dose-Resposta. Partindo da solução das amostras e dos padrões com concentração inicial de 10mg/mL, utilizaram-se

200 μ L desta solução concentrada e diluíram-se em 1800 μ L de etanol, obtendo-se a concentração de 1mg/mL, e a partir desta foram feitas quatro diluições sucessivas ou mais, se necessário, para obtenção da curva dose-resposta: adicionando-se com auxílio de uma pipeta automática, onde foram pipetados primeiramente 1000 μ L de etanol em todos os tubos de vidro e, em seguida, pipetaram-se 1000 μ L da solução diluída anteriormente, obtendo-se, assim, concentrações: 1000 μ g/mL; 500 μ g/mL; 250 μ g/mL e 125 μ g/mL. Os procedimentos das diluições feitas nos tubos de vidro encontram-se detalhados no esquema 3.

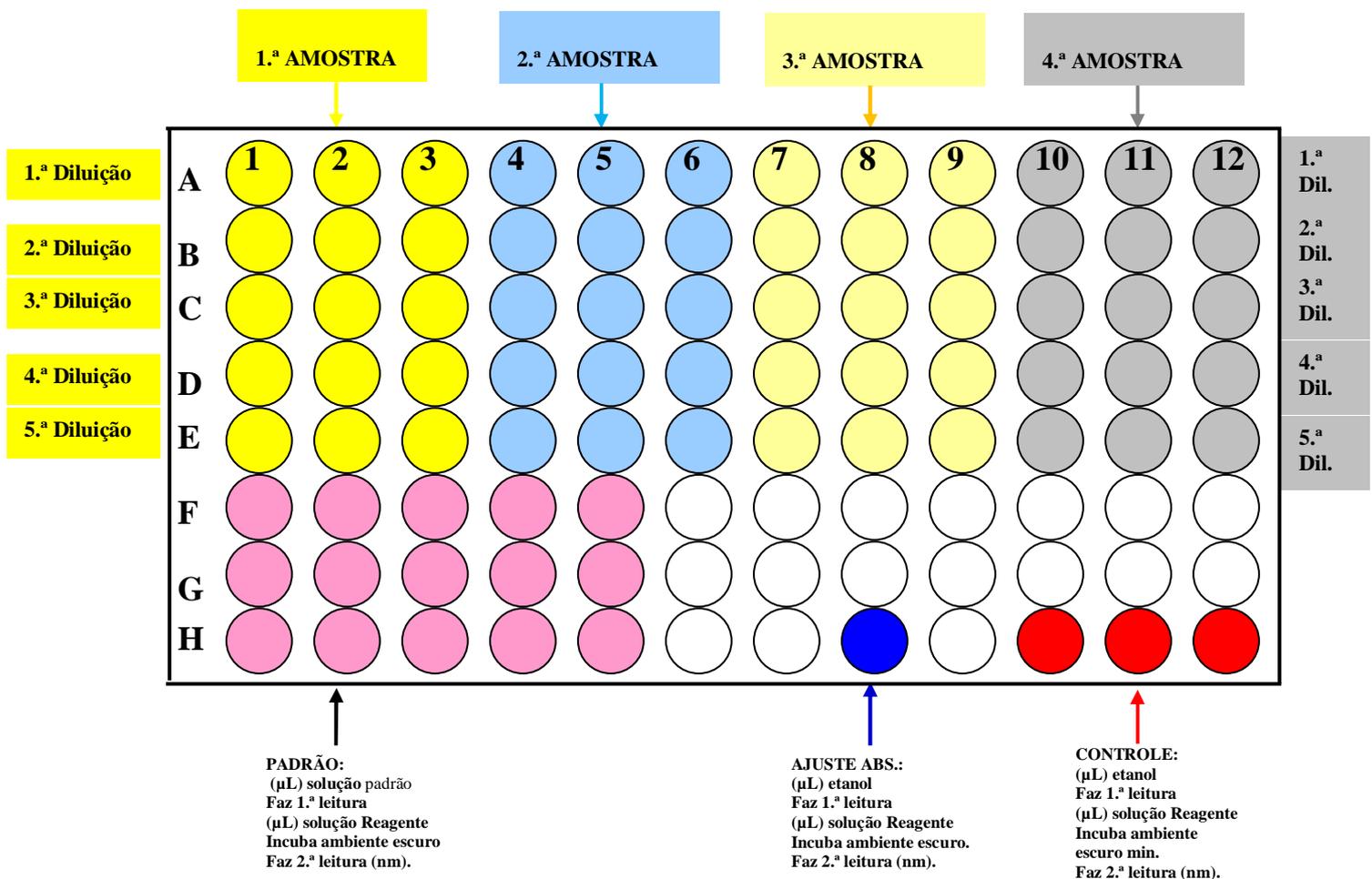


Esquema 3: Diluições das Amostras e dos Padrões

3.4.3 A Metodologia para Caracterização em Microplaca (em todas as metodologias antioxidantes)

Após as diluições feitas nos tubos de vidro, o próximo procedimento foi adicionar nas cavidades da microplaca, com o auxílio de pipeta multicanal, primeiramente: o eluente (etanol/DMSO/H₂O deionizada), as soluções das amostras e da solução padrão, com suas respectivas diluições sucessivas, obtendo-se, em cada cavidade, novas concentrações de 100;

50; 25; 12,5; 6,25 $\mu\text{g/mL}$. E, para o controle, utilizou-se o eluente utilizado na diluição das amostras. E, então, determinou-se a absorbância da primeira leitura feita no leitor de Elisa (Beckman Coulter, modelo DTX 800), que foi utilizado como o branco no teste. E, depois, adicionou-se a solução do reativo e, em seguida, incubou-se por tempo e por temperatura (ambiente ou específica) conforme metodologia utilizada; após o tempo reacional, fez-se a segunda leitura do decréscimo da absorção medido num comprimento de onda ($\lambda = \text{nm}$) conhecido para a metodologia utilizada. Todas as análises foram realizadas em triplicata (Esquema 4).



Esquema 4: Procedimento para uso da microplaca

3.4.4 Análise dos dados:

Foram compilados os resultados obtidos das leituras realizadas nos dois tempos de reação: inicial (só amostra) e final (amostra + reagente). A variação de absorbância (ΔABS) foi obtida pela seguinte equação:

ABS = ABS controle (ABS amostra - ABS branco)

Onde:

ABS controle = Variação de absorbância obtida do controle.

ABS amostra = Variação de absorbância obtida da amostra.

ABS branco = Variação de absorbância obtida do branco.

O cálculo de inibição da atividade antioxidante foi expresso como equivalentes g do padrão/g da amostra testada obtida no Excel da fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \times 100$$

3.4.4.1 Análises Estatísticas Utilizadas em Todos os Testes:

- Todos os resultados foram representados como média \pm desvio padrão;
- Os resultados obtidos foram analisados, utilizando o programa Microcal™ Origin® Versão 6.0 da Microcal Software Inc., e apresentados na forma gráfica por utilização do Programa Excel (Microsoft Word., St. Louis, MO, EUA);
- Os valores médios para concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e os valores de miliequivalência (mEq) foram obtidos mediante a tabulação dos resultados no programa Excel for Windows. A concentração inibitória 50% foi obtida por regressão linear simples utilizando o programa Microcal™ Origin® Versão 6.0 da Microcal Software, Northampton, Massachusetts, EUA;
- Os resultados dos ensaios químicos foram correlacionados por meio do teste de Pearson.
- A análise de significância: Teste-T;
- A análise de variância: Anova-one-way;
- A comparação entre as duas médias: Teste de Duncan.

3.5 METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE:

3.5.1 Determinação de Fenóis Totais - Método: Folin–Ciocalteu.

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras da espécie *Licaria puchury-major* foi realizada pelo método de Folin–Ciocalteu com modificações (SINGLETON e ROSSI, 1965; VELIOGLU et al., 1998).

Preparo da Solução do Reagente Folin Ciocateau:

Utilizou-se 1mL (1000 μ L) do reagente Folin, para 9mL (9000 μ L) de água deionizada, e armazenou-se em frasco âmbar, mantido em temperatura ambiente; a solução foi feita na hora da realização do teste.

Preparo da Solução do Padrão (Ácido Gálico) utilizado para a Curva:

Pesaram-se 10mg (0,010g) de ácido gálico e solubilizou-se em 1mL (1000 μ L) de etanol. Após solubilização completa, a solução foi armazenada em eppendorf. O ácido gálico foi utilizado como padrão positivo de comparação.

Solução Tampão de Carbonato de Sódio (NaHCO₃):

Pesou-se 0,400mg (0,4g) de carbonato de sódio e solubilizou-se em 100mL de água deionizada. Após solubilização completa, a solução foi armazenada em um recipiente de vidro comum.

O preparo do branco:

Consistiu em 50 μ L de água deionizada, 10 μ L da solução de ácido gálico e 240 μ L da solução de carbonato. A absorbância foi medida em 740nm após 15 minutos de reação. A curva dose-resposta obtida expressou a concentração final do ácido gálico em g.mL⁻¹ e a variação de absorbância (Δ ABS).

Realização do ensaio:

Cada cavidade da microplaca recebeu primeiramente 10 μ L da solução de cada amostra e/ou da solução padrão (quercetina), com suas respectivas diluições. Em seguida foram adicionados 50 μ L do reativo - solução de Folin. Incubou-se no escuro em temperatura ambiente por 8min; fez-se a leitura das asorbâncias em 740nm. E, após esse tempo de reação, adicionaram-se 240 μ L da solução de carbonato de sódio; aguardaram-se 3min e fez-se novamente a leitura das asorbâncias em 740nm. (RE et al., 1998).

3.5.1.1 Análise Qualitativa de Fenóis Totais - Método: Folin–Ciocalteu.

As amostras testadas foram analisadas por meio da redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras, com formação de um complexo azul, cuja intensidade foi aumentando linearmente a 740nm. Observou-se, após a adição do reativo Folin Ciocateau, a mudança da coloração até o aparecimento da cor azul, indicativo da determinação de possíveis compostos fenólicos, o que foi comparado com o padrão (MENSOR, 2001; VARGAS, 2008).

3.5.1.2 Análise quantitativa de Fenóis Totais - Método: Folin–Ciocalteu.

O teor de fenóis totais foi expresso por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão ácido gálico e expresso em miligrama (mg) de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama (g) de amostra. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $(C=Y) C=0,0143x - 0,0132$ ($C=6,472x + 0,019$), onde C é a concentração do ácido gálico, x é a absorbância a 740 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9984$. (SINGLETON e ROSSI, 1965; VELIOGLU et al., 1998). As leituras das absorbâncias foram analisadas conforme descrito no item 3.4.4.

O teor de polifenóis totais também foi apresentado em percentagem (%) de polifenóis presentes na amostra, obtido por meio da fórmula:

$$\% \text{ Polifenóis} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{padrão}}} \times 100$$

3.5.2 Teste de Varredura do Radical: (DPPH[•] e ABTS⁺)

3.5.2.1 Método: DPPH[•] (Reagente - 2,2-Difenil-1- (2,4,6-Trinitrofenil) Hidrazila

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH[•], segundo metodologia utilizada por Molyneux (2004), com modificações.

Solução do Reagente DPPH'

A preparação da solução consistiu na dissolução de 2mg (0,002g) do reagente DPPH' em 12mL de etanol, obtendo-se inicialmente uma solução de DPPH' em etanol a 2mg/mL. Foi feito o ajuste da absorbância em 492nm, com obtenção do valor da leitura mais próximo de 1,0.

Realização do ensaio:

Para realizar as medidas, foram adicionadas primeiramente, em cada cavidade da microplaca 170µL de etanol e 30µL das soluções das amostras e/ou padrão: quercetina, na concentração de 1mg/mL (que foi utilizado para a curva), com suas respectivas diluições. E para o controle, foram utilizados 200µL de etanol e 100µL do radical DPPH'. E então foi determinada a absorbância da primeira leitura. E, depois, adicionaram-se 100µL do reativo - solução de DPPH' com volume final de 300µL e, em seguida, incubou-se por 15min em temperatura ambiente no escuro e foi feita a segunda leitura, cujo decréscimo da absorção foi medido num comprimento de onda de $\lambda = 492\text{nm}$.

3.5.2.1.1 Análise Qualitativa na Determinação de Varredura de Radicais (DPPH')

Nas microplacas, acrescentaram-se as amostras e, em seguida, o reativo DPPH', o qual reagiu por quinze minutos. E, então, foi observada a mudança da coloração púrpura para amarela, indicativo de possível atividade de varredura de radical; a quercetina foi utilizada como padrão positivo de comparação (MENSOR, 2001).

3.5.2.1.2 Análise Quantitativa na Determinação de Varredura de Radicais (DPPH')

Para cada concentração das amostras testadas, foi descontado o branco. Os dados obtidos foram comparados com a atividade antioxidante obtida frente ao padrão (quercetina) para as mesmas concentrações. Os resultados foram expressos como equivalentes grama de quercetina por grama de amostra.

A concentração inibitória (CI_{50}), quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, foi determinada por meio da regressão linear dos valores obtidos, utilizando-se o programa Microsoft Office Excel 2007. Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média. Foram consideradas como atividade antioxidante as amostras com valor superior ou igual à mEq grama quercetina/grama da amostra. As leituras das absorbâncias foram analisadas conforme descrito no item 3.4.4.

3.5.2.2 Método: ABTS⁺ (2,2'-Azinobis (3-Etilfenil-Tiazolina-6-Sulfonato))

O método foi baseado na redução do ABTS⁺ - 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato), com modificações, na qual o cátion radical ABTS⁺ captura os hidrogênios mudando sua coloração azul para incolor, cuja intensidade aumenta linearmente a 620nm (RE et al. 1998).

Preparo da solução do Cátion Radical ABTS⁺ oxidado:

Primeiramente, preparou-se da solução de ABTS⁺ que consistiu na dissolução de um comprimido (10mg de ABTS⁺) em 5mL de água deionizada, resultando em uma solução de concentração a 3,64mM.

Em seguida, preparou-se a solução de Persulfato de Potássio (K⁺), da qual se dissolveu 0,067g de persulfato K⁺ em 50mL de água deionizada em um balão volumétrico, obtendo-se uma solução de persulfato K⁺ a 5mmol/L. E, então, procedeu-se à solução do Cátion Radical ABTS⁺ oxidado, que foi produzido por meio químico mediante a reação da solução de 3,64mM ABTS⁺ (solução aquosa) com 5mM persulfato de potássio na razão estequiométrica de 1:0,5.

Foram preparados 12mL de solução do cátion radical por meio da oxidação de 6mL da solução de ABTS⁺ com volume de 6mL da solução de persulfato de K⁺ 5mmol/L. A solução de ABTS⁺ foi armazenada em frasco âmbar e incubada a temperatura ambiente na ausência de luz, por 24 horas para a reação do radical e obtenção do ABTS⁺ Oxidado. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até obtenção do ajuste da absorbância da solução com leitura em torno de 1,0. (RE et al., 1999).

Realização do ensaio:

Para realizar as medidas, foram adicionadas primeiramente em cada cavidade da microplaca 250 μ L das soluções das amostras, padrão (quercetina) e controle (etanol) com suas respectivas diluições e, então, foi determinada a absorbância da primeira leitura, que foi utilizada como branco no teste. E, depois, adicionaram-se 100 μ L do reativo cátion radical ABTS⁺ oxidado num volume final de 350 μ L e, em seguida, foram incubados por 15min em temperatura ambiente no escuro e feita a segunda leitura, cujo decréscimo da absorção foi medido num comprimento de onda de $\lambda = 620\text{nm}$.

3.5.2.2.1 Análise Qualitativa na Determinação de Varredura de Radicais (ABTS⁺)

Após o período reacional de quinze minutos da adição do reativo ABTS⁺ sobre as amostras, foi observada a mudança da coloração azul para incolor, indicativo de possível atividade de varredura de radical; a quercetina foi utilizada como padrão positivo de comparação (RE et al. 1999).

3.5.2.2.1 Análise Quantitativa na Determinação de Varredura de Radicais (ABTS⁺)

As análises foram as mesmas adotadas no método (DPPH[·]), descritos no item 3.5.2.1.2.

3.5.3 Teste de Inibição de Reações de Oxidação**3.5.3.1 Método: Sistema β -caroteno/ácido linoleico - (LPO)**

O ensaio para determinar a atividade antioxidante *in vitro* foi determinado pelo método da inibição da reação de cooxidação do β -caroteno, provocada pela adição do ácido linoleico. Esse método foi desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), o qual está fundamentado em medidas espectrofotométricas de descoloração (oxidação) do β -caroteno induzidas pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Preparo da mistura reativa utilizada no teste β -Caroteno/ácido linoleico:

Primeiramente foi feito o preparo para a oxigenação da água a ser utilizada no ensaio. Utilizaram-se 25mL H₂O deionizada, que foi adicionada em um erlemayer de 125mL em agitador com velocidade média em 60rpm para promover a aeração. Em seguida, preparou-se a Solução β -caroteno, em que foi utilizado 0.002g β -caroteno e adicionou-se 1mL (1000 μ L) Clorofórmio - (0,2mg/mL em CHCl₃); agitou-se bem e posteriormente armazenou-se em vidro âmbar, utilizando-se apenas 150 μ L dessa solução para o preparo da emulsão que consistiu em adicionar em um erlemayer de 125 mL: 150 μ L da solução de β -caroteno, 50 μ L ácido linoleico (agente oxidante), 200 μ L Tween 80 (agente emulsificante) e 500 μ L Clorofórmio. Essa mistura foi incubada a 50°C, por 30min.

E, para a completa evaporação do clorofórmio, utilizou-se o balão de oxigênio, durante 05 a 10min. Quando a mistura se apresentou isenta do clorofórmio, acrescentaram-se 25mL de H₂O deionizada previamente saturada com oxigênio. O erlemayer foi encapado com papel alumínio e agitou-se novamente vigorosamente por 30 minutos. E, quando a mistura apresentou-se límpida, foi feita a leitura para o ajuste da absorbância adicionando-se em uma cavidade da microplaca 240 μ L da emulsão; a leitura foi feita no comprimento de onda de 492nm, a qual foi ajustada para 0.5 a 0.6.

Preparo da Solução Padrão - BHT (hidroxitolueno de butila) - (para a Curva do sistema β -caroteno/ácido linoleico - LPO)

Pesou-se 0,001g de BHT (padrão positivo) e, em seguida, solubilizou-se com 1mL (1000 μ L) de etanol, obtendo-se inicialmente uma solução padrão de 1mg/mL em etanol.

Realização do ensaio

Para realizar as medidas das absorbâncias, foram adicionados primeiramente em cada cavidade da microplaca 10 μ L do inibidor: amostra, padrão e controle (que consistiu de 250 μ L da emulsão e 10 μ L de etanol) com suas respectivas diluições. E, posteriormente, adicionaram-se 240 μ L da emulsão, num volume final de 250 μ L e, então, foi determinada a absorbância da primeira leitura no comprimento de onda de $\lambda = 492$ nm. Em seguida, a microplaca foi incubada a 50°C sob agitação numa velocidade média de 60 rpm. para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β -caroteno. A reação foi acompanhada por meio das

leituras das absorvâncias com leituras imediatas a cada intervalo de 15min, durante 120min., e sempre incubando a 50°C.

3.5.3.1.1 Análise Qualitativa na Determinação da Atividade Antioxidante - Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico - LPO.

Após a adição da solução reativa nas microplacas contendo o β -caroteno/ácido linoleico sobre as amostras, esperou-se a reação por quinze minutos. Avaliou-se a atividade de inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, por meio da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. A não descoloração do β -caroteno pela permanência da cor amarela indica possível atividade antioxidante; o BHT foi utilizado como padrão positivo de comparação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; MARCO, 1968; MILLER, 1971).

3.5.3.1.2 Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante - Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico.

A capacidade antioxidante foi expressa em percentual de inibição da oxidação por meio da queda da absorvância das amostras, que foi correlacionada com a queda do controle BHT, obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I), a qual deve ser menor que 0,2 para ser considerado que houve 100% de oxidação, após 120min de reação. As leituras das absorvâncias foram analisadas conforme descrito no item 3.4.4.

Eventualmente, se a absorvância do controle não for menor que 2, não terá havido 100% de oxidação. A eficiência do antioxidante foi também expressa por meio dos valores de F1 e F2, de acordo com Yanishlieva e Marinova (1995), calculados a partir da curva de oxidação (absorvância a 492nm). A eficiência em bloquear a reação em cadeia, por meio da interação com os radicais peróxidos, foi mensurada na primeira parte da curva (entre 15 e 45 min após o início da reação). A relação entre as tangentes das curvas da solução padrão e do controle expressa a eficiência do antioxidante (F1) (*Equação 1*):

$$F1 = \frac{\text{tg solução padrão}}{\text{tg controle}}$$

A possibilidade de o antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo foi medida durante a segunda parte da curva (entre 75 e 90min, após o início da

reação), por meio da relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução padrão e do controle (F2) (Equação 2):

$$F2 = \frac{\text{tg solução padrão}}{\text{tg controle}}$$

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA:

3.6.1 Ensaio Frente à *Artemia salina*

A avaliação da citotoxicidade da espécie *L. puchury-major* foi realizada empregando-se o ensaio de letalidade contra *Artemia salina* com modificações (DOLABELA, 1997).

Preparo das soluções:

Utilizaram-se 2mg de amostras para 2000 μ L do diluente, na concentração de 1mg/mL. empregaram-se apenas 20 μ L desta solução. Neste experimento, foram diluídos em DMSO: os óleos essenciais: das folhas e flores; DCM e sementes: extrato MeOH das folhas, extrato aquoso do caule. Foram diluídos em H₂O deionizada: os extratos aquosos das folhas (nativas e cultivadas), galhos finos, galhos grossos e sementes; hidrolatos: das flores e folhas como também os chás das folhas (nativas), galhos finos, galhos grossos e sementes.

A solução de controle consistiu em 200 μ L do diluente (DMSO ou H₂O deionizada).

Preparo da Solução Salina (Sintética):

Pesaram-se 17,5g de sal marinho não iodado 3% (p/v); em seguida, solubilizaram-se em 500mL de água deionizada, obtendo-se uma solução salina de 17,5g/mL. Primeiramente, fez-se a total diluição do sal e, depois, filtrou-se com algodão para garantir a qualidade da solução. E armazenou-se em refrigerador (podendo ser utilizada até 15 dias).

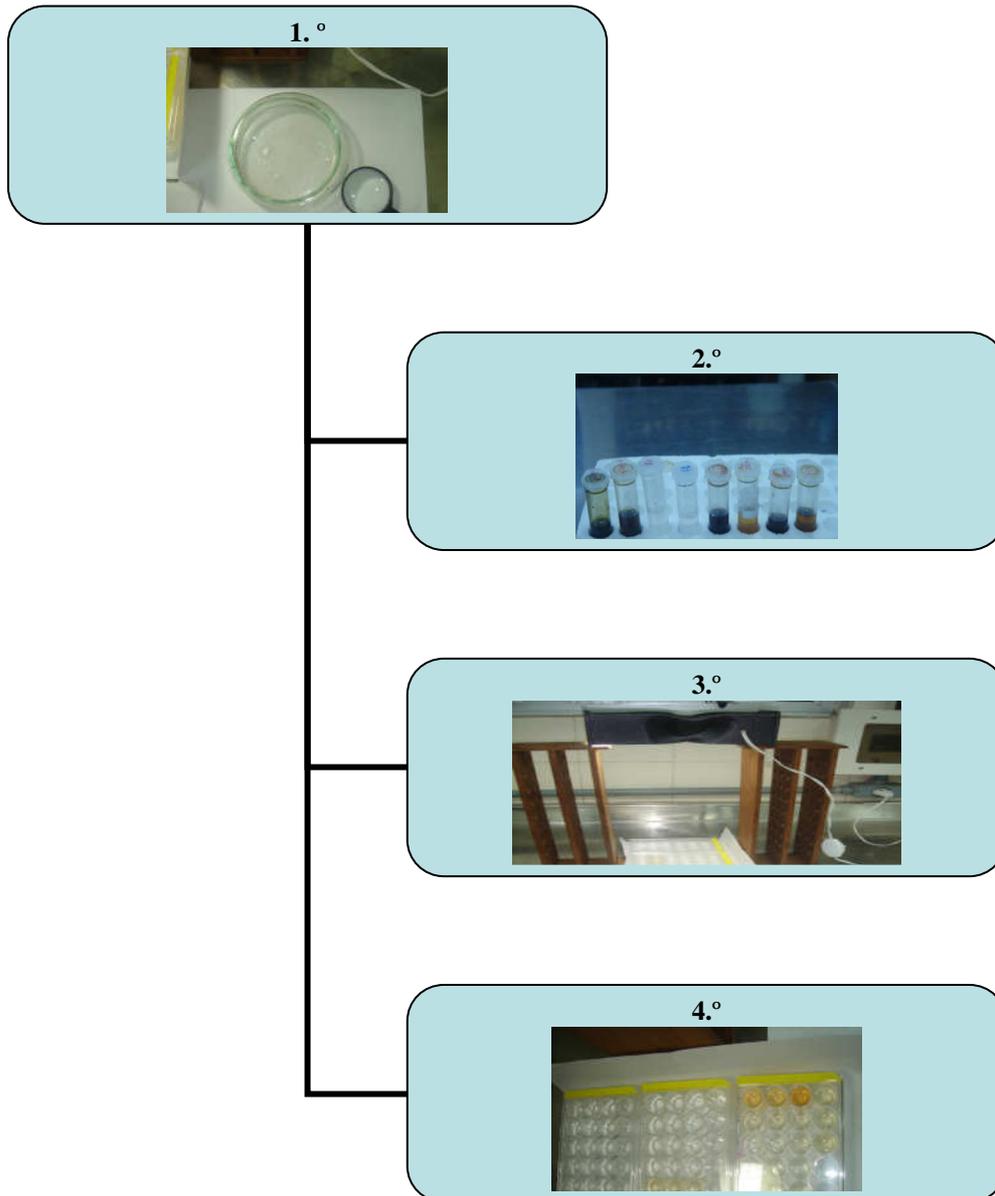
Procedimento para eclosão dos cistos de *Artemia salina*:

Utilizou-se uma placa de petri, onde foram adicionados a solução salina, até atingir a metade da placa, e em seguida adicionados aproximadamente 5mg de ovos encistados (temperatura ambiente), que foram incubados. A cultura foi mantida a temperatura ambiente variante entre 28 - 29°C, sob luz artificial com lâmpada fluorescente constante até o período

de eclosão das larvas (náuplio), o qual se completou após 48 horas. (MONGELLI, 1996; GONÇALVES, 2008).

Realização do ensaio:

Neste teste, utilizaram-se placas de poliestireno com 24 cavidades (4x6). Para a realização dos bioensaios, primeiramente, adicionou-se 1.800µL de solução salina em cada cavidade da placa e 180µL de solução salina (Maramar) com larvas de *A. salina* recém-eclodidas - contendo neste volume o total de 10 artemias vivas para cada cavidade da placa. E, em seguida, foram adicionadas 20µL das soluções das amostras a serem testadas, completando um volume final de 2000µL, ficando as amostras com concentração de 10µg/mL para cada cavidade. Um grupo de controle também foi preparado nas mesmas condições (contendo: solução salina + solução com 10 artemias + DMSO/H₂O deionizada) sem a presença de substâncias. Todos os testes foram feitos em triplicata, e os ensaios foram mantidos a temperatura ambiente (28 - 29°C), sob luz artificial constante por um período de 24 horas (esquema 5).



Esquema 5: Procedimento dos ensaios para determinação da Atividade Citotóxica frente à *A. Salina*.

Decorrido o tempo dos ensaios, foram realizadas leituras da contagem do número de larvas sobreviventes nos testes das amostras e no grupo de controle. E, então, determinou-se:

- A taxa de mortalidade: dividindo-se o número de artemias mortas pelo número total de indivíduos e multiplicando o resultado por 100;
- Para cada amostra ativa: foram repetidos os testes em triplicatas, reduzindo a concentração para 1,0/0,5/0,25mg/mL do extrato;
- A concentração Letal (CL_{50}), ou seja, a concentração que dizima metade de uma população: foi feita aumentando a concentração do extrato.

3.6.2 Teste Hemolítico

O método utilizado para avaliar a atividade hemolítica das amostras da *L. puchury-major* foi feito conforme descrito por Diniz (2006) e Who (1998) com algumas adaptações para realização em microplaca de 96 poços. Todos os procedimentos laboratoriais descritos neste trabalho (preparação dos extratos aquosos, coleta de sangue, teste de fragilidade osmótica de eritrócitos submetidos à hipotonicidade) foram executados no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas, sob a supervisão do Professor Dr. Emerson Lima.

Preparo das soluções:

Primeiramente foi preparada a solução salina, adicionando 8,5g de NaCl (Cloreto de Sódio) e 1,1g de CaCl₂ (Cloreto de Cálcio) q.s.p. em 1000mL de água deionizada, obtendo-se a concentração 0,9% de NaCl com 10mM de CaCl₂. Em seguida, foi preparada a solução eritrócita (S.E) a 2%, a partir do sangramento de camundongos (*Mus musculus Swiss*) anestesiados com éter etílico, quando foi introduzida uma seringa de 3mm com agulha 25×7mm, pelo processo intracardíaco, coletando-se o sangue que ficou mantido sob agitação constante em um béquer contendo a solução salina, com rendimento de 10mL de S.E. 2% para cada animal sangrado. O sangue foi lavado três vezes em solução salina e depois transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 1500rpm por 5 minutos; retirou-se o sobrenadante, que foi descartado. E os eritrócitos (pellet) foram novamente ressuspensos em solução salina a 2% (v/v). A solução hemolítica foi preparada utilizando o detergente Triton X-100 (0,5%).

A solução das amostras utilizadas neste ensaio foram: os óleos essenciais: das folhas e flores; extratos das folhas em DCM e MeOH; e os extratos aquosos das folhas (somente nativas), galhos finos, galhos grossos, caule e sementes. Todas as amostras foram preparadas nas concentrações 2mg/mL em DMSO.

Realização do ensaio da hemólise

Neste ensaio, utilizaram-se microplacas de poliestireno com 96 cavidades. Foi utilizada uma microplaca para duas amostras, não utilizando as cavidades do centro para obtenção de uma melhor centrifugação.

- Para a solução das amostras testadas, foram adicionadas primeiramente 180 μ L da solução salina para 20 μ L da solução das amostras e, partindo dessa concentração, utilizaram-se 200 μ L desta solução e, então, fizeram-se diluições seriadas em 100 μ L de solução salina para se obterem concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g.mL⁻¹.

- Para o controle positivo, utilizaram-se: 60 μ L de sol. salina para 40 μ L de Triton X-100 (0,5%).

- Para o controle negativo, utilizaram-se: 90 μ L de sol. salina para 10 μ L de DMSO. E, para o branco, apenas 100 μ L de sol. salina.

- Foram adicionados em todos os poços 100 μ L da solução eritrócita, que foi incubada por 1 hora sob agitação constante em temperatura ambiente e, posteriormente, a placa foi centrifugada a 1500rpm por 10min (Centrifuge 5804R), e o sobrenadante foi transferido para outra microplaca, então, foram determinadas as medidas hemolíticas no comprimento de onda de $\lambda = 450$ nm para acompanhamento da hb liberada, ou seja, do resultado da ruptura parcial ou total da membrana eritrocitária. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. O grau de hemólise foi avaliado, qualitativamente, pela tonalidade avermelhada (hemólise) no sobrenadante obtido após a centrifugação. O procedimento do ensaio para a determinação da atividade hemolítica encontra-se no esquema 6 e, para uso da microplaca, no esquema 7.



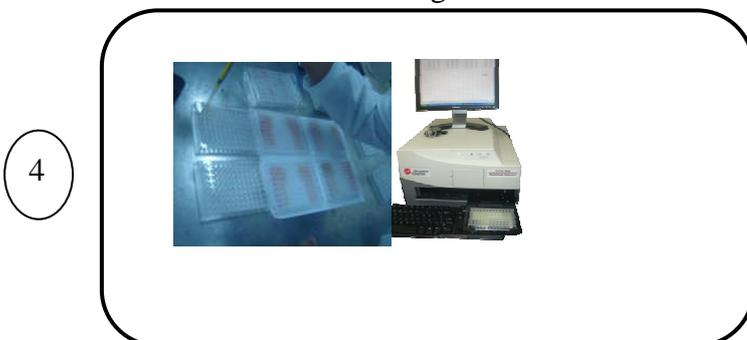
Obtenção da Solução Eritrócita (S.E.) 2%:



Soluções utilizadas no ensaio:

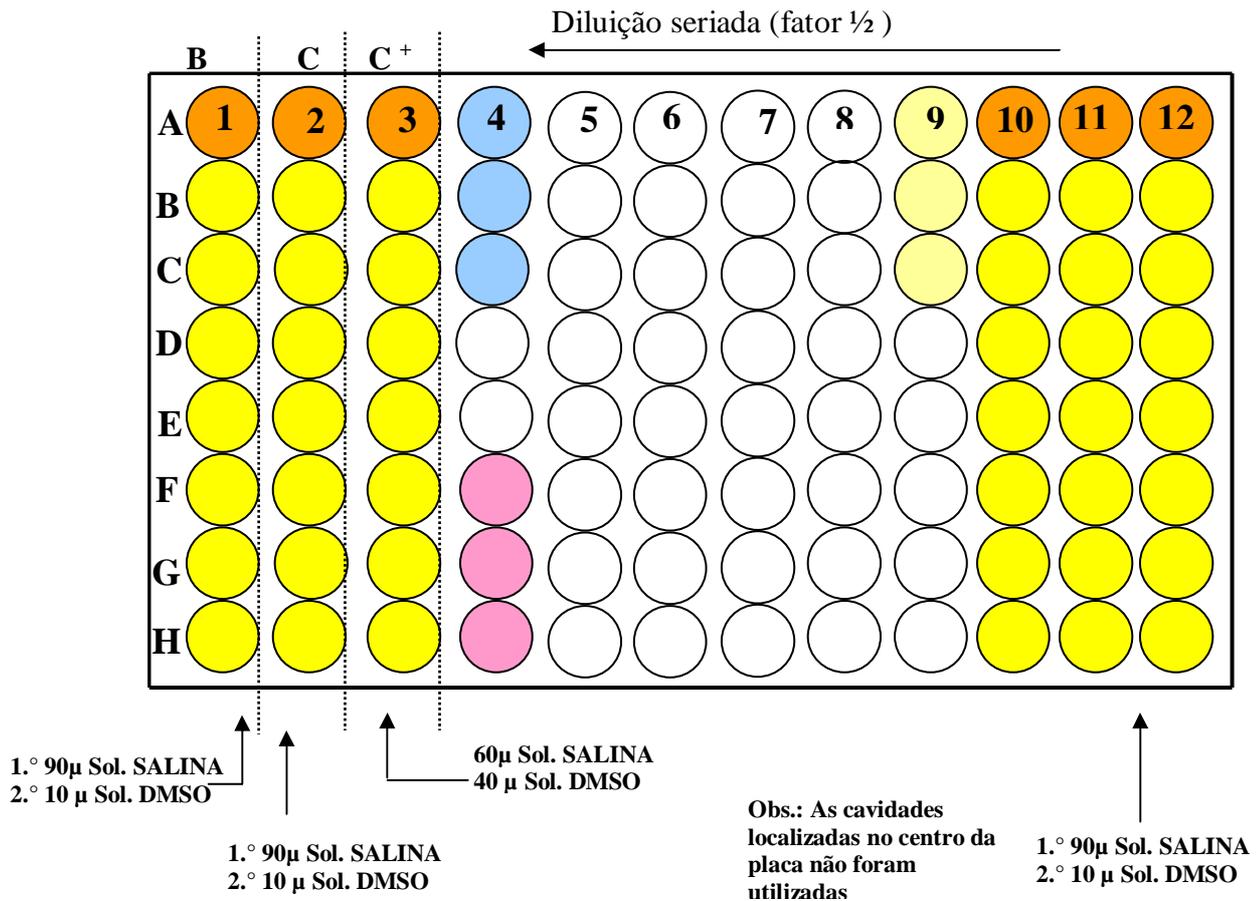


Adiciona sol. Eritrócita em todos os poços – Incuba: agitação constante em temperatura ambiente – Centrifuga



Retira-se e transfere-se o sobrenadante para outra microplaca e faz-se leitura Elisa (Beckman Coulter, modelo DTX 800), medida num comprimento de onda de $\lambda = 450\text{nm}$.

Esquema 6: Procedimento dos Ensaios para Determinação da Atividade Hemolítica.



Esquema 7: Procedimento para Avaliação do Potencial Hemolítico em Microplaca.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A metodologia utilizada nos testes microbiológicos realizados neste trabalho foi feita pelo método da difusão em cavidade com adaptações (CLEELAND e SQUIRES, 1991).

Testes, amostras e micro-organismos utilizados:

Teste qualitativo - as amostras testadas foram: os óleos essenciais da flor (amostra 1) e da folha (amostra 2), os extratos da folha em DCM (amostra 3) e MeOH (amostra 4), os extratos aquosos das folhas nativas (amostra 5), das folhas cultivadas (amostra 6), dos galhos finos (amostra 7), caule (amostra 8) e das sementes (amostra 9) e hidrolatos da flor (amostra 16) e folha (amostra 17) contra os micro-organismos: Bactéria Gram-positivas: *Staphylococcus*

aureus, *Bacillus cereus*. Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*. E a Levedura: *Candida albicans*.

Testes quantitativos - as amostras testadas foram os óleos essenciais da flor (amostra 1) e da folha (amostra 2) contra os micro-organismos: Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (CCT 1352), *Streptococcus oralis* (CBAM 290) e *Mycobacterium smegmatis* (PDUFPE 71). Os ensaios foram realizados no Laboratório (Coleção de Cultura DPUA / Departamento de Parasitologia / Instituto de Ciências de Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM).

Preparo das soluções das amostras testadas

Pesaram-se 3mg da amostra diluídas em DMSO (mg/mL) e, depois, filtraram-se em membrana millipore (0,22); acrescentou-se H₂O destilada e autoclavada, obtendo-se a concentração 2mg/mL.

Preparo do inóculo inicial

O inóculo inicial foi preparado na forma de uma suspensão dos micro-organismos em 5mL de solução salina estéril (0,9%) padronizada pela suspensão de sulfato de bário, tubo 0,5 da escala de Mac Farland e ajustada para 90%T (530nm), correspondendo a 10^6 UFC (células/ML). Após homogeneização das suspensões do micro-organismos, alíquotas de 100µL do inóculo foram espalhadas uniformemente com alça de Drigask estéril por toda a placa contendo o meio ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C por 10 minutos para secagem.

3.7.1 Método por difusão em cavidade

Os ensaios microbiológicos foram realizados por meio da técnica de difusão em meio sólido por cavidade-placa. Após a semeadura do inóculo nas placas de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton, foram feitas cavidades, medindo 7mm de diâmetro por 5mm de profundidade, onde foram depositados 40µL da solução das amostras. Foram feitos controles positivos para cada micro-organismos com os antibióticos cloranfenicol e ampicilina (para as bactérias) e nistatina (para a levedura) na concentração de 2,5µg/mL. E, para o controle negativo, foi utilizado o DMSO. Os ensaios foram incubados a 37 °C durante 24 e 48 horas.

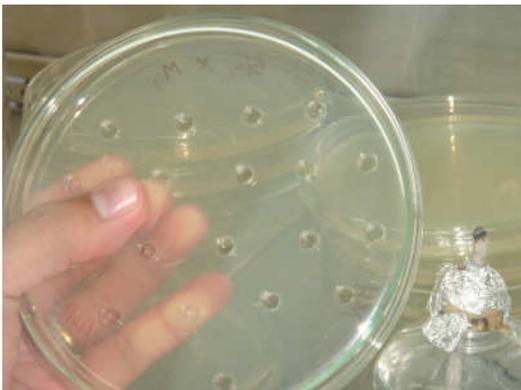
O procedimento para determinação da atividade antimicrobiana qualitativa foi feito pelo halo de inibição das amostras comparadas com o do padrão. E, para a quantitativa, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição, expressos em mm; os testes foram realizados em triplicata (Esquema 8) (CLEELAND e SQUIRES, 1991).

1



Placas de petri vertidas com meio ágar Mueller-Hinton, sendo em seguida feita sementeira do inóculo.

2



Após a sementeira do inóculo, foram feitas cavidades

3



Depósito das soluções das amostras diluídas nas cavidades. E, então, incubados durante 24 e 48 horas para medição do diâmetro dos halos de inibição, feitos em triplicata.

Esquema 8: Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em cavidade.

4 RESULTADOS

A tabela 9 mostra os rendimentos dos materiais (óleo essencial, extratos em DCM, MeOH, aquosos e hidrolatos) obtidos das diversas partes do vegetal. O maior rendimento foi do extrato DCM da folha seguido do extrato em metanol também da folha. Houve diferença entre o rendimento do extrato aquoso da folha de plantio natural e plantio artificial. Os menores rendimentos foram para os extratos aquosos provenientes de tecido xilemático (caule e galho).

Tabela 9
Rendimento das partes botânicas utilizadas nos ensaios

Material	Amostras	% Rendimento
Óleo essencial	1	2,8
	2	1,8
Ext. DCM	3	7,42
Ext. MeOH	4	8,7459
Extrato Aquoso	5	1,5197g
	6	7,3476
	7	0,3711
	8	0,7568
	9	1,0806
Hidrolatos	16	Não calculado
	17	Não calculado

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n, amostra 16 = cristais hidrolato-fl-c, amostra 17= cristais hidrolato-fo-n.

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *L. puchury-major*:

4.1.1 Determinação do Teor de Fenóis Totais

4.1.1.1 Teste Qualitativo de Fenóis Totais por meio do Método: Folin Ciacoteau

O teste qualitativo de fenóis totais foi determinado pelo teste colorimétrico, mediante a formação do complexo azul, o qual foi detectado nas amostras dos óleos essenciais das flores e folhas, além dos extratos em DCM e MeOH (amostras: 1, 2, 3 e 4) destacando-se a ocorrência da cor azul com mais intensidade para o óleo essencial das folhas (amostra 2) e para o extrato em DCM das folhas (amostra 3), quando comparado com o padrão utilizado

(ácido gálico). Por outro lado, em todas as amostras dos extratos aquosos (amostras: 5, 6, 7, 8, e 9 respectivamente), a formação do complexo azul indicou baixa a presença de fenóis totais.

No teste realizado com os chás das folhas nativas trituradas manualmente e no moinho de facas, galhos finos, galhos grossos e sementes, respectivamente, nas amostras 10, 12, 13, 14 e 15, observou-se a formação do complexo azul mais intenso nas amostras das folhas nativas trituradas (amostra 12) e das sementes (amostra 14). Interessantemente, não foi observada a formação do complexo azul nas amostras dos chás obtidos a partir das folhas trituradas manualmente. Nas amostras dos hidrolatos das folhas e das flores (amostras 16 e 17), não houve formação do complexo azul indicando a ausência de fenóis totais.

4.1.1.2 Teste Quantitativo de Fenóis Totais por meio do Método: Folin Ciacoteau

A análise quantitativa para determinação do teor de fenóis totais foi determinada com a interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com o padrão ácido gálico e expresso como mg de EAG (equivalente ácido gálico) por g da amostra. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C=0,0143x - 0,0132$, onde C é a concentração do ácido gálico, x é a absorbância a 740nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9984$, por meio através do gráfico 1 de regressão linear.

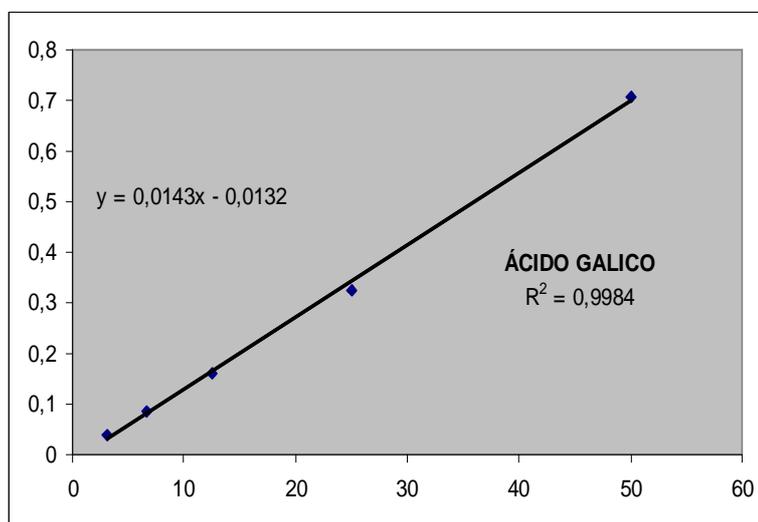


Gráfico 1: Curva de calibração do ácido gálico para o cálculo do teor de compostos fenóis totais em relação à concentração ($\mu\text{g/mL}$) das amostras.

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais, pelo método Folin Ciocalteu, expressos como mg EAG / g da amostra bruta, são apresentados na tabela 10, que mostra os teores fenóis das amostras provenientes de diferentes partes botânicas da *Licaria puchury-mayor*. O óleo essencial obtido das folhas (amostra 2) foi o que apresentou conteúdo maior ($19,07 \pm 1,24 \mu\text{g EAG / g}$ de amostra) de compostos redutores na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, seguido do extrato em DCM ($9,13 \pm 0,07 \mu\text{g EAG / g}$ de amostra) na mesma concentração. Os resultados dos teores de compostos fenólicos das amostras obtidas dos extratos aquosos foram menos eficientes para remoção dos compostos fenólicos nas diferentes partes da planta utilizada. A extração aquosa de amostra do caule ($2,46 \pm 0,06 \text{mg EAG / g}$ de amostra) foi a que apresentou o maior percentual de compostos fenólicos, valor bem abaixo daquele obtido do óleo essencial da folha.

No entanto os extratos com menores concentrações de fenóis foram aqueles obtidos dos extratos aquosos, do óleo essencial da flor (amostra 1) e do extrato em metanol (amostra 4). Ressalta-se que as amostras dos chás e dos hidrolatos não foram submetidas ao teste quantitativo.

Tabela 10
Determinação do teor de fenólicos totais das amostras de *L. puchury-major*

Quantificação de Fenóis Totais - Método Folin Ciocoteau			
AMOSTRAS Concentração 50µg/mL		Qualitativo	Quantitativo (mg EAG / g de amostra) + DP
Material	Nº amostras		
Óleo Essencial	1	+	3,01±0,01
	2		17,63±0,51
Ext. DCM	3	+	9,13±0,07
Ext. MeOH	4	+	5,74±0,56
	5		1,43±0,01
Extrato Aquoso	6	+	1,47±0,04
	7	+	1,52±0,06
	8	+	1,87±0,08
	9	+	1,52±0,01
	10	+	NR
Chá	11	NR	NR
	12	+	NR
	13	+	NR
	14	+	NR
Hidrolato	15	+	NR
	16	-	NR
	17	-	NR

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n amostra 10= chá-fo-n(1), Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos fino, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente, amostra 16 = cristais hidrolato-fl-c, amostra 17= cristais hidrolato-fo-n., (+) = Atividade positiva; (-) = Atividade negativa; (NR) = Não realizado; EAG = equivalente de ácido gálico, DP = desvio padrão.

4.1.2 Teste de Varredura de Radicais (DPPH[·] e ABTS⁺)

4.1.2.1 Teste de Varredura de Radicais por meio do Método: DPPH[·]

4.1.2.1.1 Teste Qualitativo de Varredura de Radicais através do Método: DPPH[·]

O ensaio qualitativo da atividade antioxidante pela adição do reagente DPPH[·] possibilitou a visualização colorimétrica das amostras obtidas das diferentes partes da espécie *L. puchury-major* como extratos em DCM, MeOH, aquosos, óleos essenciais, chás e hidrolatos que possuem atividade frente ao radical DPPH[·] quando comparados ao padrão quercetina. Nesse teste, observou-se a mudança de coloração, indicativo de haver atividade de varredura de radicais livres, nitidamente na amostra obtida do óleo essencial das folhas (amostras 2). Nas demais, constatou-se baixo indicativo de mudança de coloração quando comparado com o padrão (Figura 20).

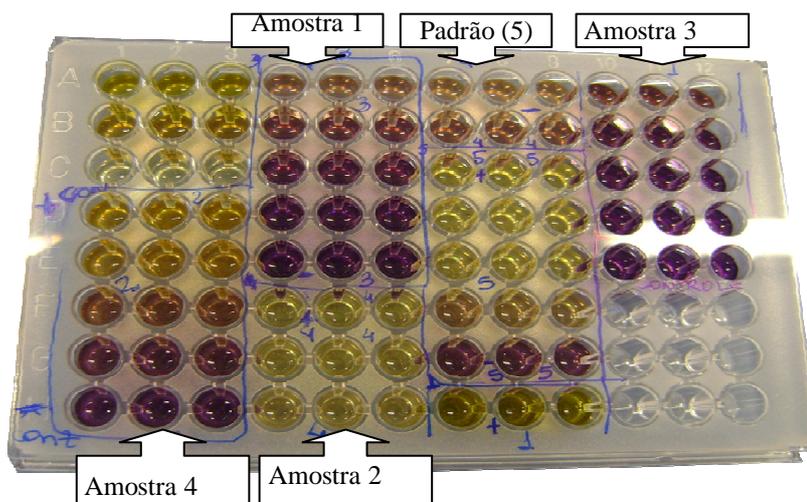


Figura 20: Teste qualitativo – Método DPPH – Ext.:DCM, MeOH, e O.E.– Amostras:1,2,3 e 5. Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n.

Na figura 21, são apresentados os resultados do teste colorimétrico para os extratos aquosos das folhas nativas (amostra 5) e cultivadas (amostra 6), galhos finos (amostra 7), caule (amostra 8) e sementes (amostra 9) em comparação com o padrão quercetina. A mudança de cor dos extratos, de violeta para o amarelo (cor do padrão), ocorreu com maior intensidade nas amostras do caule (amostra 8) e nas sementes (amostra 9), estas com maiores

evidências colorimétricas. As demais amostras também apresentaram mudança de cor, mas com menor intensidade, indicando possuírem uma razoável capacidade de varredura de radicais.

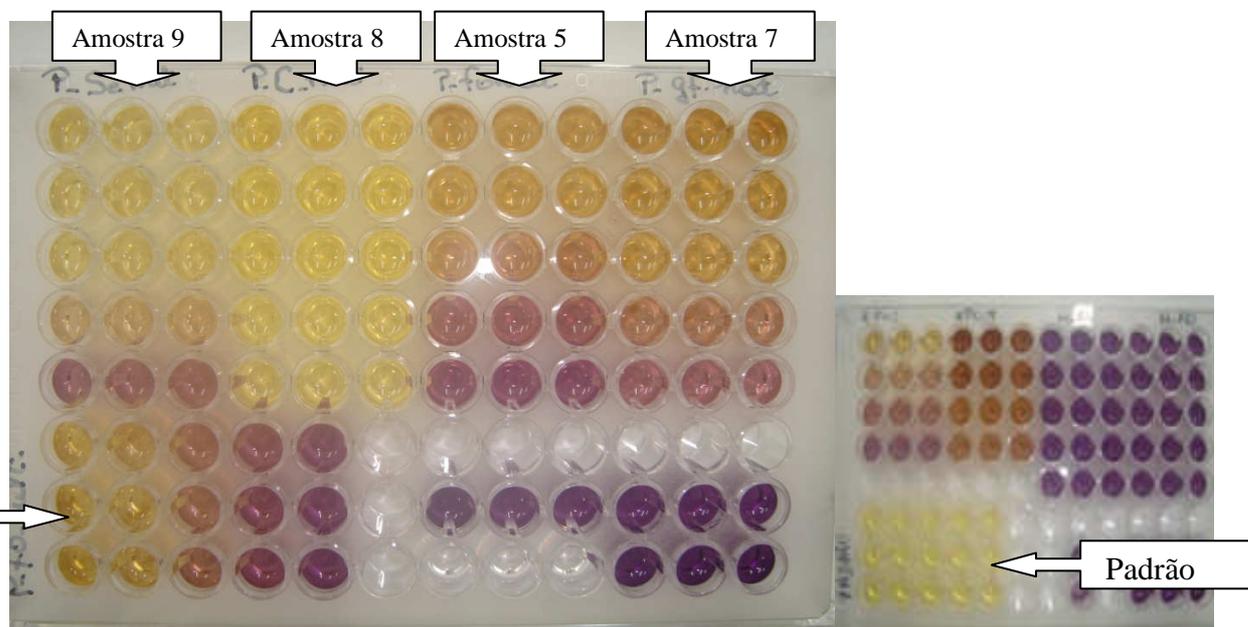


Figura 21: Teste qualitativo – método DPPH – Extratos aquosos das amostras: 5,6, 7, 8, 9.

Nota: amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n, padrão = quercetina.

O ensaio realizado com os chás foi somente qualitativo, uma vez que as amostras foram obtidas a partir do conhecimento empírico das comunidades do município de Borba-AM. Nesse sentido, não foi possível calcular a concentração pelo fato de representar com a maior veracidade possível o comunitário usuário. Portanto foi realizado apenas o teste colorimétrico para se determinar a capacidade de sequestro de radicais livres na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio presentes nas amostras dos chás.

Notou-se a mudança de coloração nas amostras dos chás com exceção daquele obtido das folhas nativas (amostra 10), que foram trituradas manualmente, quando comparadas com o padrão (quercetina) (Figura 22).

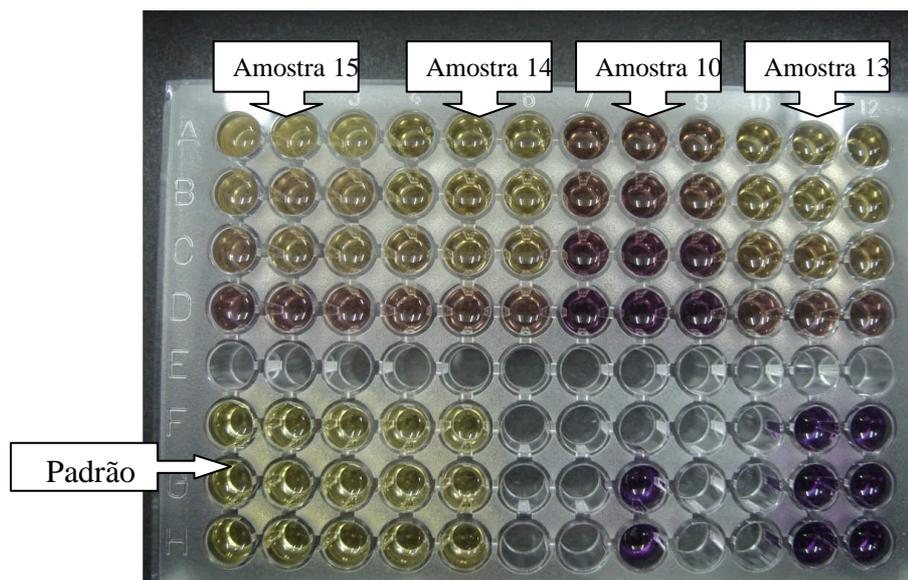


Figura 22: Teste qualitativo – Método: DPPH – Chás das amostras: 10,13,14,15.
 Nota: amostra 10= chá-fo-n(1), amostra 13= chá-galhos fino, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente.

O ensaio realizado com o chá feito das folhas trituradas no moinho (amostra 12) apresentou mudança notável de coloração; interessantemente foram coletadas na mesma época das amostras das folhas trituradas manualmente. Considerando-se a não obtenção da reação positiva dos testes realizados com a amostras 10 pelo fato de a coleta ser realizada há algum tempo, foi repetido o teste com folhas mais recentes. Nesse caso, contrariamente ao obtido com a amostra anterior, ocorreu a mudança de coloração (amostra 11), indicando que essa nova amostra possui atividade de varredura de radicais. E, quanto aos hidrolatos provenientes do óleo essencial da flor (amostra 16) e do óleo essencial das folhas (amostra 17), observou-se que não houve nenhuma mudança de coloração permanecendo da mesma cor violeta, indicando, com isso, a ausência de compostos com atividade antioxidante (Figura 23).

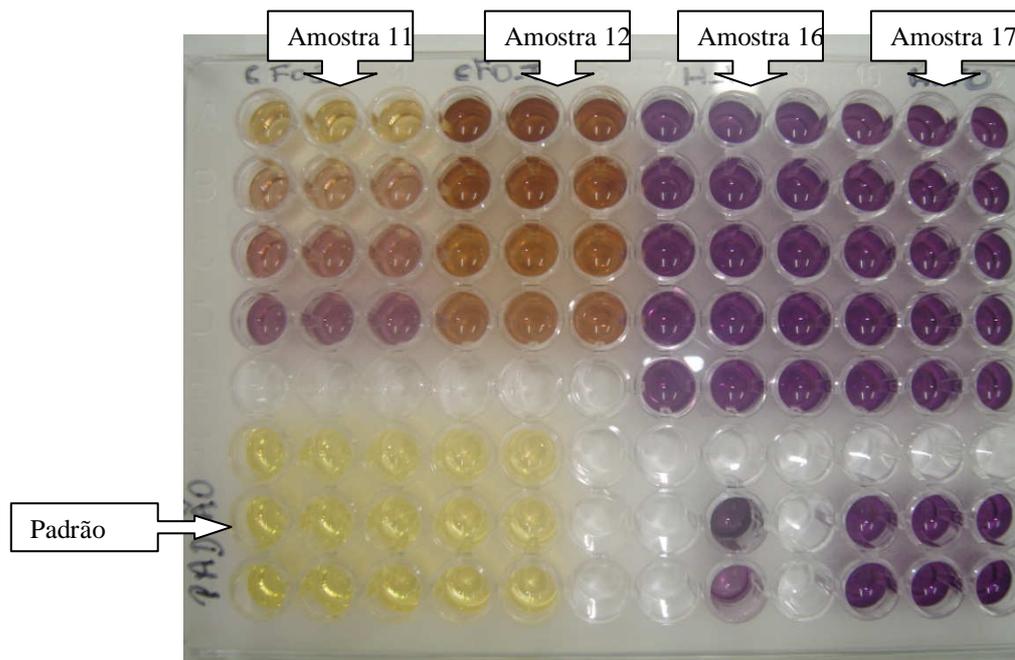


Figura 23: Teste qualitativo – Método: DPPH – Chás das amostras: 11,12,16,17.
Nota: Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 16 = cristais hidrolato-fl-c e amostra 17= cristais hidrolato-fo-n.

A tabela 11 mostra os valores da inibição dos chás, e observou que o chá feito das folhas trituradas no moinho (amostra 12) apresentou maior percentual de inibição apesar de terem sido coletadas já há algum tempo, seguido das amostras dos chás feitos com folhas coletadas mais recentemente (amostra 11).

Tabela 11

Atividade antioxidante da *L. puchury-major* pelo método de DPPH[•] expressos em (mEq) da quercetina por g das amostras dos chás

DPPH chás	
Nº Amostras	% Inibições $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$
Padrão: quercetina	85,59 \pm 1,61
10	33,23 \pm 3,74
11	42,27 \pm 8,03
12	61,17 \pm 5,20
13	24,13 \pm 5,46
14	41,68 \pm 5,26
15	39,47 \pm 5,61

Nota: amostra 10= chá-fo-n(1), Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos fino, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente.

A tabela 12 mostra o resultado de todas as amostras realizadas no método qualitativo de varredura de radicais - DPPH[•].

Tabela 12
Avaliação da Atividade Antioxidante da espécie *L. puchury-major* por meio do Teste Qualitativo de Varredura de Radicais - DPPH'

Teste Qualitativo de Varredura de Radicais por meio do Método: DPPH'		
AMOSTRAS Concentração 50µg/mL		Qualitativo
Material	Nº amostras	
Óleo Essencial	1	+
	2	+
Ext. DCM	3	+
Ext. MeOH	4	+
Extrato Aquoso	5	+
	6	+
	7	+
	8	+
	9	+
Chá	10	+
	11	+
	12	+
	13	+
	14	+
Hidrolato	15	+
	16	-
	17	-

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n, amostra 10= chá-fo-n(1), Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos fino, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente, amostra 16 = cristais hidrolato-fl-c, amostra 17= cristais hidrolato-fo-n. (+) = Atividade positiva; (-) = Atividade negativa.

4.1.2.1.2 *Teste Quantitativo de Varredura de Radicais por meio do Método: DPPH*

A atividade antioxidante foi calculada pela redução de 50% da concentração inicial de DPPH, por meio da CI_{50} em uma regressão linear das absorbâncias, de forma que, quanto menor o valor de CI_{50} , maior a atividade antioxidante. Os resultados foram comparados com o padrão quercetina (gráfico 1). O óleo essencial obtido das flores (amostra 1) não apresentou capacidade redutora (gráfico 2). Observou-se que o óleo essencial da folha (amostra 2) (gráfico 3) mostrou atividade sequestradora de radicais livres mediante a concentração inibitória baixa quando comparado com o padrão, demonstrando possuir substâncias capazes de realizar o sequestro de radicais livres com eficácia. O extrato de DCM (amostra 3 - gráfico 4) não se mostrou ativo frente ao radical livre DPPH. O extrato em MeOH das folhas (amostra 4 - gráfico 5) apresentou valor de CI_{50} maior que o padrão quercetina, indicando não possuir capacidade redutora.

Dentre as amostras dos extratos aquosos, folhas nativas e cultivadas, galhos, caules e sementes (nativas), respectivamente amostras: 5, 6, 7, 8 e 9, apenas o extrato aquoso do caule (gráfico 6) mostrou capacidade de sequestro de radicais livres. Nas demais, por não apresentarem capacidade de sequestro de radicais livres, não foi possível calcular a concentração inibitória pela redução de 50 % da concentração inicial de DPPH (CI_{50}).

De modo geral, os resultados mostraram que o óleo essencial da folha (amostra 2) apresentou maior teor de compostos antioxidantes e maior capacidade redutora em comparação às demais amostras. Foi verificado que os extratos em DCM, MeOH e aquosos possuem baixos teores de substâncias com atividade antioxidante indicando baixa capacidade de sequestro de radicais livres.

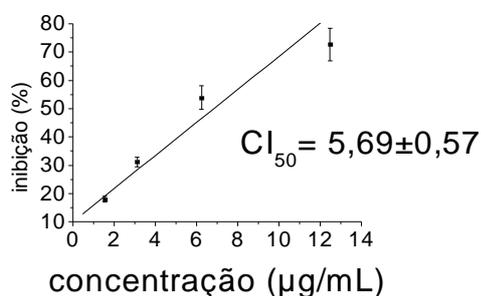


Gráfico 2: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do padrão: Quercetina por meio do método de varredura de radicais: DPPH.

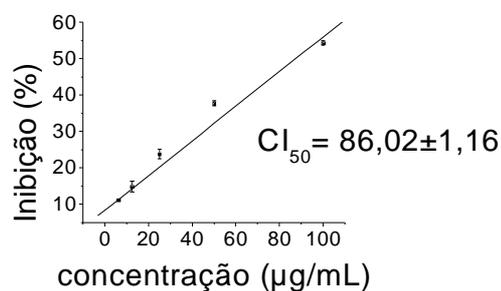


Gráfico 3: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do óleo essencial da flor (amostra 1) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: DPPH.

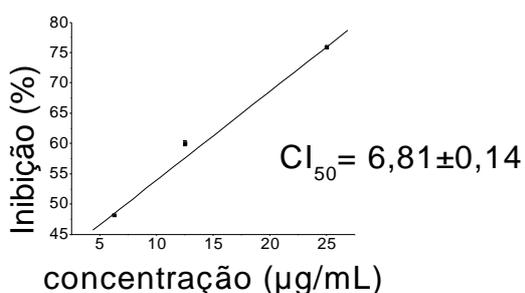


Gráfico 4: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do óleo essencial da folha (amostra 2) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: DPPH.

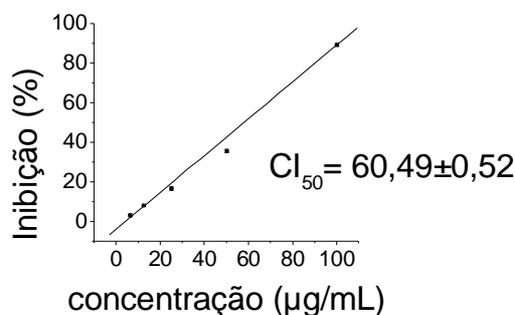


Gráfico 5: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato em DCM da folha (amostra 3) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: DPPH.

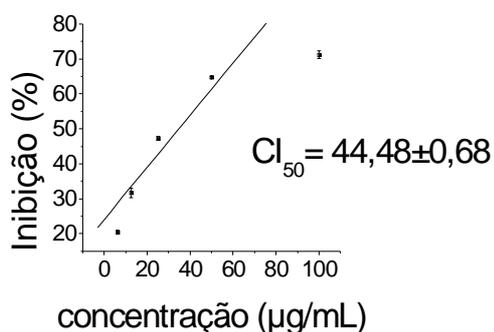


Gráfico 6: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato em MeOH da folha (amostra 4) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: DPPH.

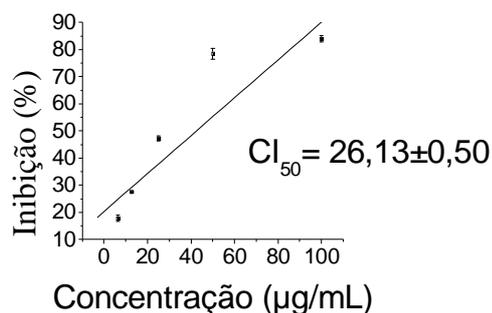


Gráfico 7: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato aquoso do caule (amostra 8) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: DPPH.

4.1.2.2 Teste de Varredura de Radicais por meio do Método: ABTS⁺

4.1.2.2.1 Teste Qualitativo de Varredura de Radicais por meio do Método: ABTS⁺

Nas amostras testadas, observou-se, por meio da mudança da coloração azul para incolor nas amostras de *L. puchury-major*, as que possuem possível atividade de varredura de radical, quando comparadas com padrão positivo quercetina.

No teste colorimétrico (Figura 24), ocorreu mudança em todas as concentrações testadas do óleo essencial da folha (amostra 2). Nas demais amostras, a mudança de coloração aconteceu em diferentes concentrações. No óleo essencial da flor (amostra 1), por exemplo, a atividade de varredura de radicais foi detectada na concentração mais baixa. Por outro lado, o extrato DCM (amostra 3) e MeOH (amostra 4) da folha mostraram atividade de varredura de radicais livres já em concentrações mais altas.

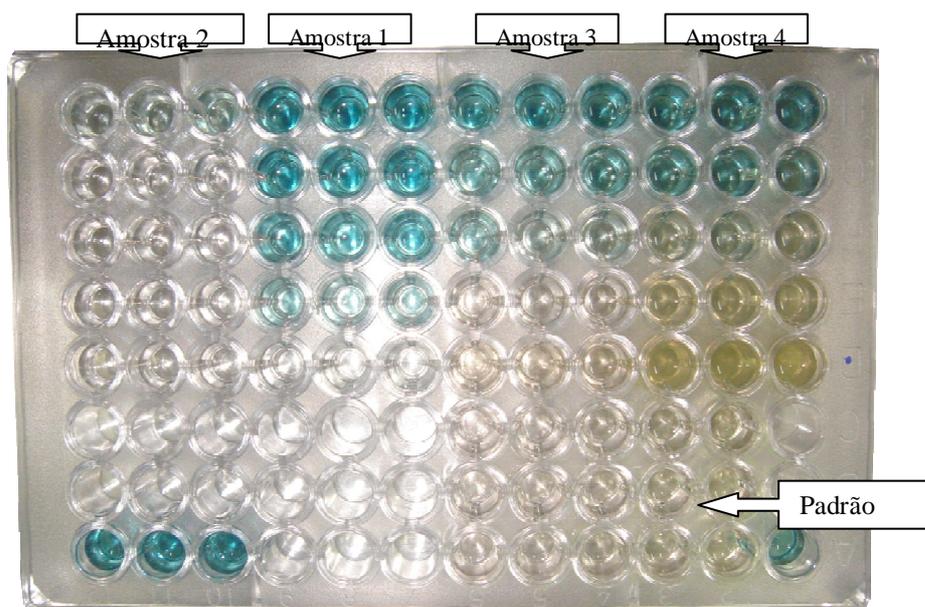


Figura 24: Teste qualitativo - Método: ABTS⁺ - Ext.:DCM, MeOH, e O.E.- Amostras:1,2,3 e 4.
Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n.

No teste colorimétrico para os extratos aquosos, observou-se a mudança da coloração azul para incolor nitidamente no extrato aquoso do caule (amostra 8) indicando forte atividade de varredura de radicais livres, enquanto que as demais amostras apresentaram leve mudança (Figura 25).

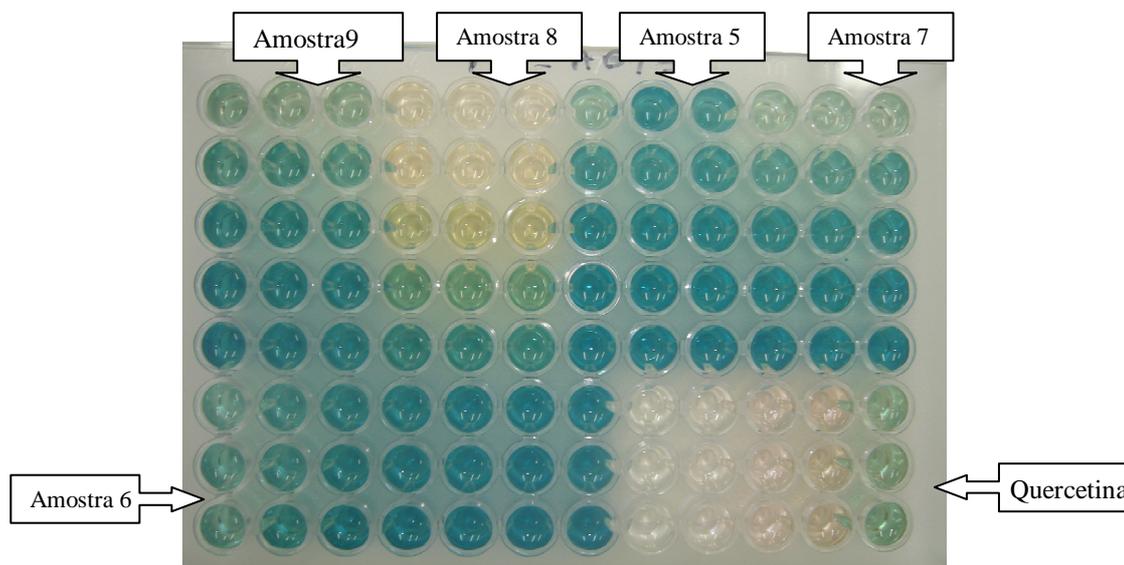


Figura 25: Teste qualitativo - Método $ABTS^+$ - Extrato aquosos das amostras: 5,6, 7, 8, 9.
Nota: amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7 = Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n.

Conforme comentado anteriormente para o teste de DPPH, os ensaios realizados com os chás foram somente qualitativos. Apenas foi observado o resultado colorimétrico para verificar se os chás possuem atividade de varredura de radical.

De maneira geral, todas as amostras do chás apresentaram atividade, uma vez que ocorreu a descoloração em todas as concentrações testadas (Figura 26). A tabela 13 mostra os valores de inibição das amostras dos chás em diferentes concentrações.

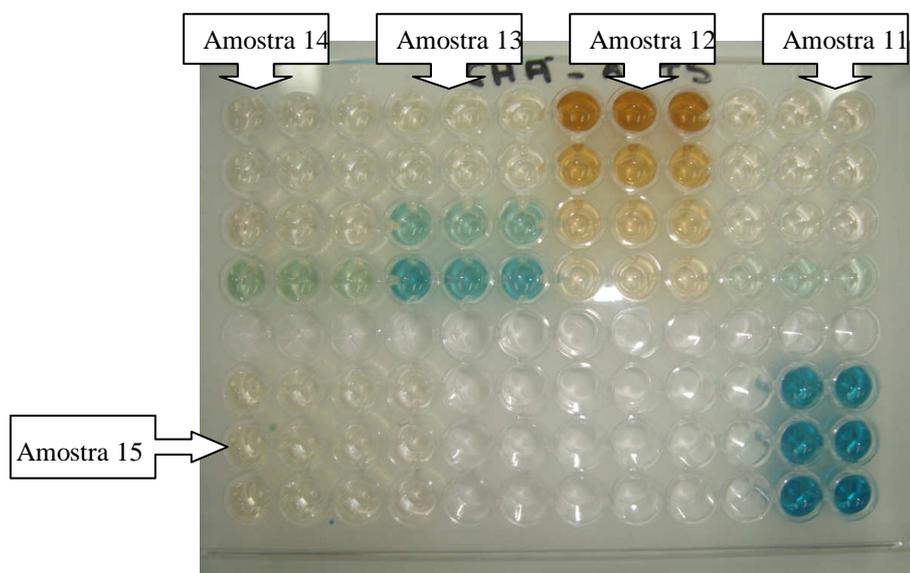


Figura 26: Teste qualitativo - método $ABTS^+$: Chá: 11,12,13,14,15.
Nota: Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos finos, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente.

Tabela 13
 Percentagem de inibição da atividade antioxidante da *L. puchury-major* pelo método ABTS⁺ expressos em (mEq) da quercetina por g das amostras dos chás

Método ABTS ⁺ chás	
Amostras	% Inibições
Quercetina	95,69±0,43
11	78,75±3,56
12	99,20±0,11
13	46,55±3,88
14	66,66±4,26
15	76,37±3,92

Nota: Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos finos, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente.

Em relação aos hidrolatos provenientes do óleo essencial da flor (amostras16) e do óleo essencial das folhas (amostras17), assim como ocorreu no teste DPPH, observou-se que não houve nenhuma mudança de coloração (figura 27), permanecendo da mesma cor do reagente 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) ou ABTS⁺. Portanto esses hidrolatos não mostraram nenhuma atividade de varredura de radicais. Ressalta-se que essas amostras apresentam agradável odor.

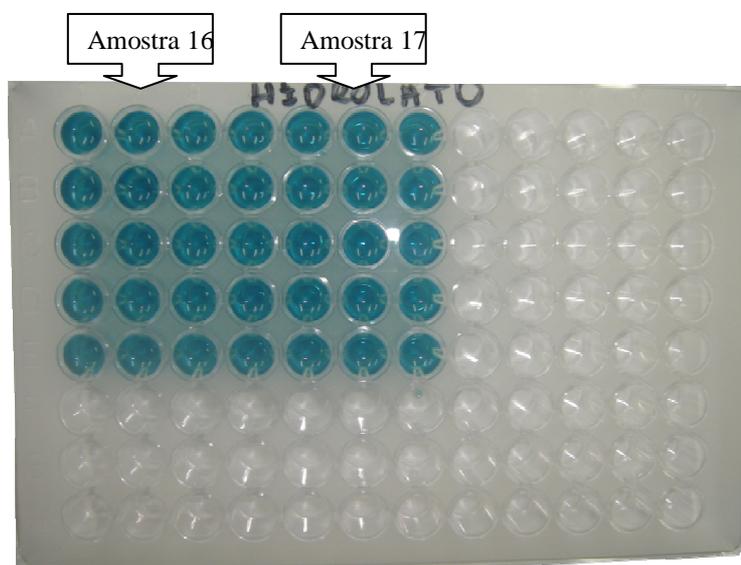


Figura 27: Teste qualitativo – Método: ABTS⁺ das amostras: 16, 17.

Nota: Chás - Amostra 16=cristais hidrolatos-fl-c e amostra 17=cristais hidrolato-fo-n.

A tabela 14 mostra o resultado de todas as amostras realizadas no método qualitativo de varredura de radicais - ABTS⁺.

Tabela 14
Avaliação da Atividade Antioxidante da espécie *L. puchury-major* por meio do Teste Qualitativo de Varredura de Radicais - ABTS⁺

<i>Teste Qualitativo de Varredura de Radicais por meio do Método: ABTS⁺</i>		
AMOSTRAS Concentração 50µg/mL		Qualitativo
Material	Nº amostras	
Óleo Essencial	1	+
	2	+
Ext. DCM	3	+
Ext. MeOH	4	+
Extrato Aquoso	5	+
	6	+
	7	+
	8	+
	9	+
Chá	10	+
	11	+
	12	+
	13	+
	14	+
	15	+
Hidrolato	16	-
	17	-

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n, amostra 10= chá-fo-n(1), Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos finos, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente, amostra 16 = cristais hidrolatos-fl-c, amostra 17= cristais hidrolatos-fo-n., (+) = Atividade positiva, (-) = Atividade negativa.

4.1.2.2.1 Teste Quantitativo de Varredura de Radicais por meio do Método: ABTS⁺

Os resultados da percentagem de inibição dos ensaios quantitativos foram obtidos por meio dos cálculos da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e comparados com o padrão quercetina (gráfico 8). O óleo essencial da flor (amostra 1 - gráfico 9) não apresentou atividade de sequestro de radicais livres quando comparado com o padrão. O óleo essencial da folha (amostra 2 - gráfico 10) mostrou maior percentual de inibição, ou seja, maior atividade de sequestro de radicais livres, a qual foi evidenciada em concentrações menores do que aquelas obtidas pelo padrão quercetina. Isso significa que, quanto menor for o valor, maior será atividade antioxidante. Os extratos em DCM (amostra 3 - gráfico 11) e MeOH (amostra 4 - gráfico 12) não apresentaram atividade de sequestro de radicais livres quando comparados com o padrão (quercetina).

No teste realizado com as amostras dos extratos aquosos das folhas nativas e cultivadas, galhos finos, caule e sementes (amostras 5, 6, 7, e 9), não houve atividade de sequestro de radicais livres (respectivamente, gráficos 13, 14, 15 e 17). Os resultados da percentagem de inibição que se mostrou mais ativa foi o extrato aquoso do caule (amostra 8), com valor abaixo do padrão quercetina (gráfico 16). Comprovou-se o resultado obtido no teste colorimétrico (quantitativo), no qual foi observada a nítida mudança da coloração azul para incolor no extrato do caule. As demais amostras apresentaram valores de CI₅₀ elevados, indicando possuírem baixa atividade de varredura de radicais livres.

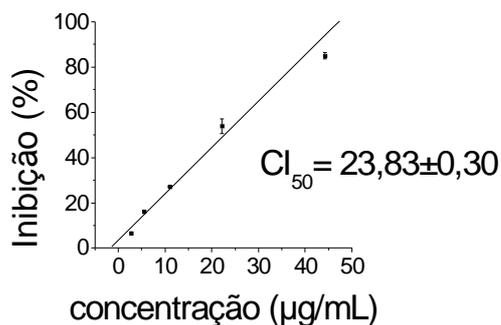


Gráfico 8: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do padrão: quercetina por meio do método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

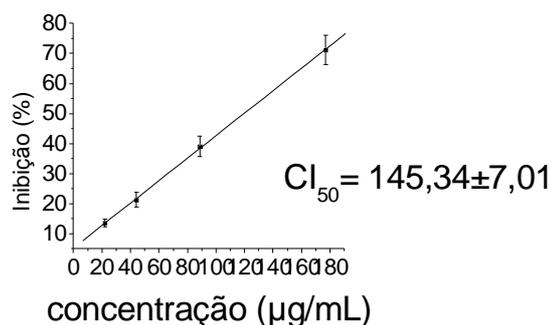


Gráfico 9: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do óleo essencial da flor (amostra 1) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

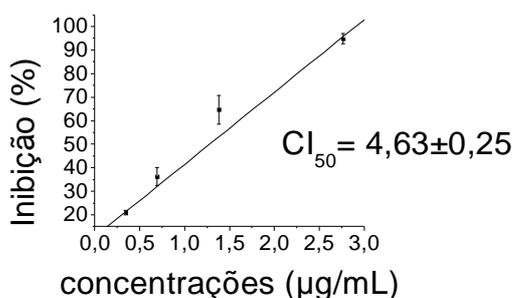


Gráfico 10: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do óleo essencial da folha (amostra 2) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

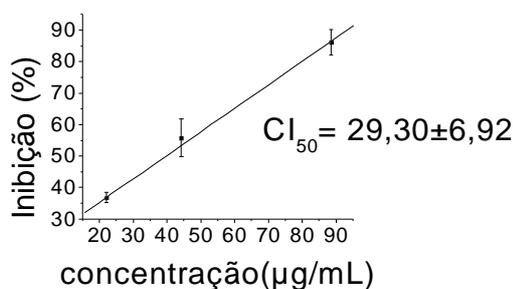


Gráfico 11: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato em DCM da folha (amostra 3) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

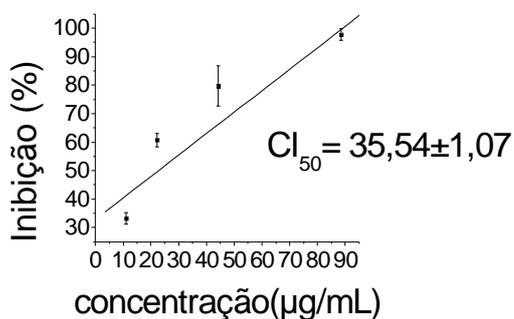


Gráfico 12: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato em MeOH da folha (amostra 4) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

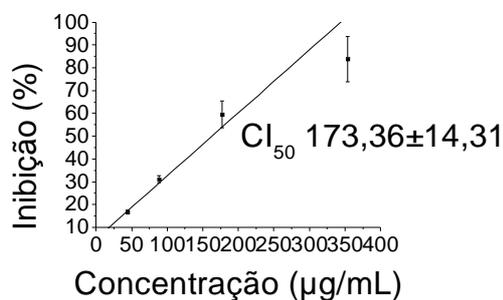


Gráfico 13: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato aquoso da folha-n (amostra 5) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

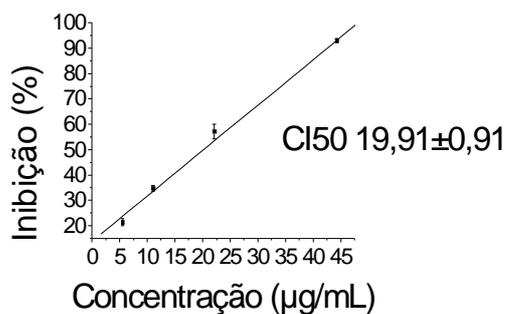


Gráfico 14: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato aquoso da folha-c (amostra 6) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

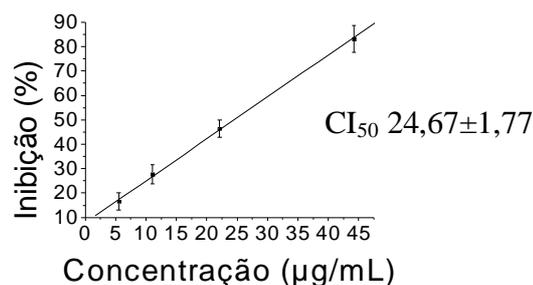


Gráfico 15: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato aquoso do galho fino-n (amostra 7) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

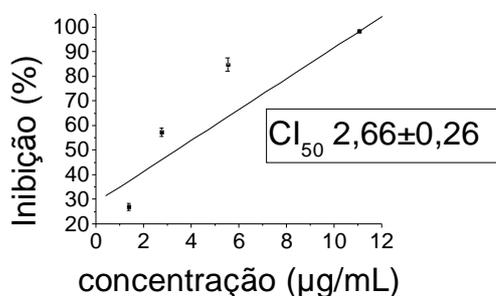


Gráfico 16: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato aquoso do caule (amostra 8) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

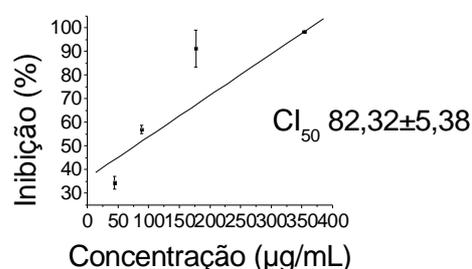


Gráfico 17: Curva da atividade antioxidante com CI_{50} do extrato aquoso da semente-n (amostra 9) da *L. puchury-major* no método de varredura de radicais: $ABTS^+$.

4.1.3 Teste de Inibição de Reações de Oxidação

4.1.3.1 Método: Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico - LPO

4.1.3.1.1 Teste Qualitativo por meio do Método Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico - LPO

A Tabela 15 mostra que não houve mudança da coloração amarela em nenhuma das amostras testadas, com exceção dos hidrolatos provenientes do óleo essencial da flor (amostras 16) e do óleo essencial das folhas (amostras 17), em que houve total descoloração do β -caroteno, indicando que os hidrolatos não possuem capacidade de inibir a oxidação (descoloração) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico e, portanto, não possuem atividade antioxidante.

Tabela 15
Avaliação da Atividade Antioxidante da espécie *L. puchury-major* por meio do Teste Qualitativo do Sistema β -Caroteno / Ác. Linoleico - LPO

Teste Qualitativo – Sistema β -Caroteno / Ác. Linoleico - LPO		
Material	Amostras	β -Caroteno / Ác. linoleico
Óleo Essencial	1	+
	2	+
Ext. DCM	3	+
Ext. MeOH	4	+
Extrato Aquoso	5	+
	6	+
	7	+
	8	+
	9	+
Chá	10	NR
	11	+
	12	+
	13	+
	14	+
	15	+
Hidrolato	16	-
	17	-

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n, amostra 10= chá-fo-n(1), Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos fino, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente, amostra 16 = cristais hidrolato-fl-c, amostra 17= cristais hidrolato-fo-n., (+) = Atividade positiva, (-) = Atividade negativa, (NR) = Não realizado.

Os ensaios realizados com os chás no sistema β -caroteno/ácido linoleico foram somente qualitativos pelo fato de não se saber a concentração. No entanto foi possível observar o decaimento da absorbância a 492nm (descoramento do β -caroteno) com o tempo de reação representado no gráfico 18.

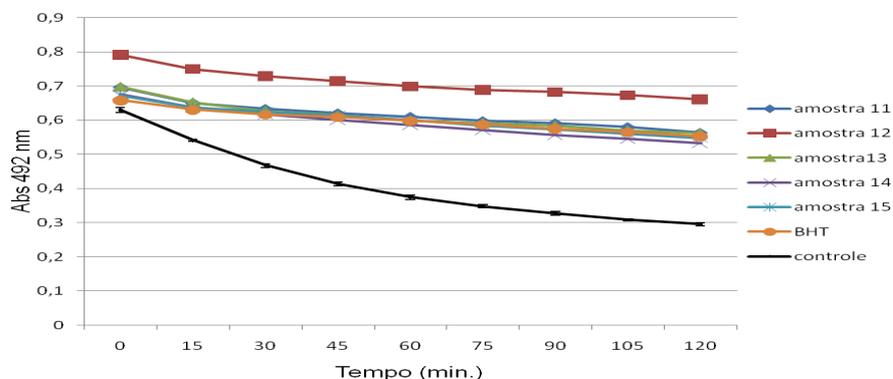


Gráfico 18: Decaimento da inibição da atividade antioxidante da *L. puchury-major* pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico expresso em (mEq) de BHT pelas amostras dos chás.
Nota: Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos fino, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente, Padrão: BHT

O gráfico 19 mostra a percentagem (%) de inibição da atividade antioxidante das amostras dos chás determinadas no Sistema β -caroteno/ácido linoléico, as quais foram comparados com o padrão BHT. Observou-se as amostras obtiveram resultados bem próximos com exceção da amostra 14.

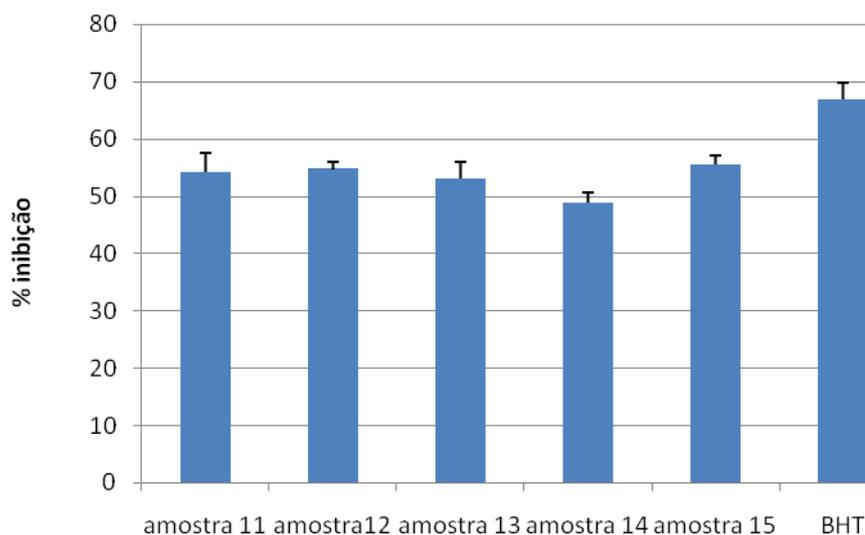


Gráfico 19: Inibição (%) da atividade antioxidante da *L. puchury-major*-Sistema β -caroteno/ácido linoleico expressos em (mEq) de BHT pelas amostras dos chás.
Nota: Amostra 11= chá-fo-c(2), amostra 12= chá-fotrit-n(1), amostra 13= chá-galhos fino, amostra 14 = chá-galhos grossos, amostra 15 = chá-semente, Padrão: BHT

4.1.3.1.2 Teste Quantitativo por meio do Método Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico - LPO

Os resultados foram expressos em percentual de inibição da oxidação por meio da queda da absorbância das amostras, que foi correlacionada com a queda do padrão BHT na concentração 100 μ g/mL. Notou-se que houve inibição da oxidação em todas as amostras testadas, conforme observado no teste colorimétrico. Mostraram-se mais elevadas as percentagens da inibição de oxidação (% I) do extrato aquoso do caule (amostra 8) e do extrato em DCM (amostra 3), seguidas das amostras do extrato em metanol (amostra 4) e do óleo essencial da folhas (amostra 2). No entanto as amostras que apresentaram menor percentual de inibição da oxidação foram os extratos aquosos da semente (amostra 9) e dos galhos finos (amostra 7). Observou-se que houve diferença nas amostras dos extratos aquosos das folhas nativas (amostra 5) e cultivadas (amostra 6). A tabela 16 apresenta os resultados expressos em percentual de inibição da oxidação.

Tabela 16
 Percentagem de inibição da atividade antioxidante da *L. puchury-major* por meio do Teste Quantitativo do Sistema β -caroteno/ácido linoleico expresso em (mEq) de BHT por g das Amostras

Sistema β -caroteno/ácido linoleicos		
Amostras	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição
BHT	100	78,81 \pm 2,24
1	100	45,74 \pm 1,44
2	100	53,88 \pm 1,93
3	100	61,05 \pm 2,54
4	100	54,55 \pm 2,36
5	100	37,37 \pm 1,06
6	100	44,59 \pm 5,11
7	100	32,00 \pm 11,77
8	100	60,82 \pm 5,53
9	100	28,21 \pm 7,07

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3 = ext.DCM-folha-n, amostra 4 = ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7 = Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n.

O gráfico 20 mostra o decaimento da absorbância a 492nm (descoloramento do β -caroteno) com o tempo de reação.

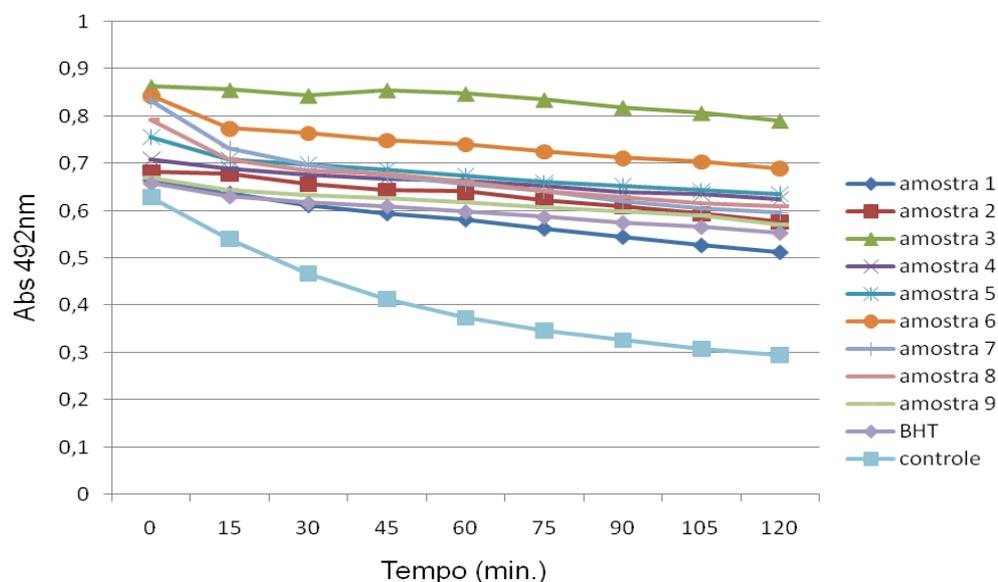


Gráfico 20: Decaimento da inibição da atividade antioxidante da *L. puchury-major* pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico expresso em (mEq) de BHT pelas amostras dos óleos essenciais, ext. DCM, MEoH e Aquosos.

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3 = ext.DCM-folha-n, amostra 4 = ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7 = Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n.

4.1.3.2 Avaliação da Eficiência do Estudo Cinético da Curva de Decaimento da Atividade Antioxidante

A avaliação da eficiência do antioxidante relacionada ao seu possível mecanismo de ação foi mostrada no estudo cinético da curva de decaimento da atividade antioxidante. A determinação do decaimento da absorbância a 470 nm (descoramento do β -caroteno) com o tempo de reação permitiu o cálculo de F1 e F2, os quais forneceram dados sobre a atividade antioxidante. Os resultados estão expressos na tabela 17.

Os resultados esclareceram que as amostras testadas podem inibir a oxidação tanto por mecanismos primários (caracterizados pela medida de F1) quanto secundários (medido por F2). Entretanto as amostras dos óleos essenciais (amostras 1 e 2) mostraram maior eficiência na primeira etapa da cinética de oxidação, i.e., no bloqueio de formação de peróxido (F1). O extrato aquoso DCM mostrou poder inibir a oxidação com a mesma eficiência tanto por mecanismos primários quanto por secundários. Da mesma maneira, isso ocorreu com as amostras dos extratos aquosos da semente-n (amostra 9) e do caule-n (amostra 8). Exceção ocorreu para a amostra dos extratos aquosos das folhas-n (amostra 5) os quais mostraram ser mais eficientes na primeira etapa da cinética da oxidação.

Tabela 17
Parâmetros Cinéticos do Potencial Antioxidante da Espécie *L. Puchury-Major* no Sistema B-Caroteno/Ácido Linoleico - LPO

Parâmetros Cinéticos - LPO		
AMOSTRAS	Fase 1	Fase 2
1	4,0	2,0
2	3,2	2,0
3	2,0	2,0
4	3,0	1,5
5	2,0	1,5
8	1,5	1,5
9	1,5	1,5

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3 = ext.DCM-folha-n, amostra 4 = ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n.

4.1.4 Comparação das Atividades Antioxidantes por meio das Diferentes Metodologias nas Diversas Partes Botânicas da espécie *Licaria puchury-major*

A Tabela 18 mostra os valores obtidos nos diferentes métodos quantitativos obtidos das diferentes partes botânicas da espécie *L. puchury-major*. Observou-se que o óleo essencial das folhas (amostra 2) apresentou melhor resultado na quantificação de fenólicos totais e no método de varreduras de radicais frente ao radical DPPH também apresentou melhor atividade. Frente ao cátion radical ABTS⁺ as amostras que apresentaram maior atividade foram o extrato aquoso do caule (amostra 8) e o óleo essencial das folhas. No sistema β -Caroteno/ácido linoleico - LPO, as amostras que apresentaram maior atividade de inibição de oxidação foram o extrato em DCM das folhas, o extrato aquoso do caule, o extrato em MeOH da folha e o óleo essencial das folhas. Verificou-se que o óleo essencial das flores e o extrato aquoso das folhas cultivadas apresentaram atividade apenas neste método.

Tabela 18
Análise Comparativa por meio dos Métodos Quantitativos Testados

TESTES QUANTITATIVOS					
Material	Amostras	FENÓIS	DPPH [•] (CI ₅₀) µg/mL + DP	ABTS ⁺	LPO
Óleo Essencial	1	3,01±0,01	86,02±1,16	145,34±7,01	45,74±1,44
	2	17,63±0,51	6,81±0,14	4,63±0,25	53,88±1,93
Ext. DCM	3	9,13±0,07	60,49±0,52	29,30±6,92	61,05±2,54
Ext. MeOH	4	5,74±0,56	44,48±0,68	35,54±1,07	54,55±2,36
Extrato Aquoso	5	1,43±0,01	B	173,36±14,31	37,37±1,06
	6	1,47±0,04	B	19,91±0,91	44,59±5,11
	7	1,52±0,06	B	24,67±1,77	32,00±11,77
	8	1,87±0,08	26,13±0,50	2,66±0,26	60,82±5,53
	9	1,52±0,01	B	82,32±5,38	28,21±7,07
Chás	NR				
Hidrolato	16	NA	NA	NA	NA
	17	NA	NA	NA	NA

Nota: Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3 = ext.DCM-folha-n, amostra 4 = ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7 = Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n., amostra 16 = cristais hidrolato-fl-c, amostra 17= cristais hidrolato-fo-n., (NR) = Não realizado, (B) = Baixa atividade.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA ESPÉCIE *L. Puchury-Major*:

4.2.1 Frente à *A. salina*:

A citotoxicidade das amostras foi identificada por meio do cálculo da concentração letal necessária para dizimar metade de uma população (CL_{50}), a qual foi testada na concentração $2000\mu\text{g/mL}$, que determinou o efeito tóxico das diferentes partes botânicas da espécie *L. puchury-major*. Não foram evidenciados efeitos citotóxicos nas amostras dos extratos aquosos das folhas nativas (amostra 5) e cultivadas (amostra 6), galhos finos (amostra 7), caule (amostra 8) e sementes (amostra 9), como também nas amostras dos hidrolatos das flores e folhas (amostras 16 e 17), por meio do cálculo da CL_{50} nas concentrações $2000\mu\text{g/mL}$ e $4000\mu\text{g/mL}$; houve índice de 100% de sobrevivência em ambas concentrações. Ressalta-se que o controle (DMSO) também apresentou índice de sobrevivência de 100% em todos os tratamentos. No entanto se observaram efeitos citotóxicos na concentração de $2000\mu\text{g/mL}$ nas amostras dos óleos essenciais das flores e folhas e dos extratos em DCM e MeOH (amostras 1, 2, 3 e 4, respectivamente) apresentando índice de 100% de mortalidade. Essas amostras foram também submetidas a ensaios em concentrações menores, dentre as quais foi observado na concentração $1000\mu\text{g/mL}$ que óleo essencial da flor (amostra 1) foi a única amostra que apresentou 100% de mortalidade. Nas concentrações 500 e $250\mu\text{g/mL}$, não foram observados efeitos citotóxicos significativos. A tabela 19 mostra os valores da CL_{50} das amostras testadas.

Tabela 19
Avaliação da Atividade Citotóxica frente à *Artemia salina*

Toxicidade em <i>Artemia salina</i>		
	AMOSTRAS	Concentração Letal (CL_{50})
Óleo Essencial	1	< $2000\mu\text{g/mL}$
	2	< $2000\mu\text{g/mL}$
Ext. DCM	3	< $2000\mu\text{g/mL}$
Ext. MeOH	4	< $2000\mu\text{g/mL}$
Extrato Aquoso	5	> $2000\mu\text{g/mL}$
	6	> $2000\mu\text{g/mL}$
	7	> $2000\mu\text{g/mL}$
	8	> $2000\mu\text{g/mL}$
	9	> $2000\mu\text{g/mL}$
	16	> $2000\mu\text{g/mL}$
	17	> $2000\mu\text{g/mL}$

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3 = ext.DCM-folha-n, amostra 4 = ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 6 = Ext.aq.folha-c, amostra 7 = Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n., amostra 16 = cristais hidrolato-fl-c, amostra 17= cristais hidrolato-fo-n.

Para as amostras dos chás não foi determinada a citotoxicidade mediante o cálculo da Concentração Letal (CL_{50}), pelo fato de não se saber a concentração, visto que os chás foram preparados conforme são utilizados pelas comunidades de Borba-AM. No entanto foi apenas determinada a porcentagem de sobrevivência da *A. salina*.

4.2.2 Frente ao Teste Hemolítico:

No teste qualitativo (colorimétrico) foi possível observar a Hb difundida com o meio em baixas concentrações para os óleos essenciais das flores e folhas, extrato em DCM, seguidos dos extratos em MeOH das folhas nativas e dos extratos aquosos dos galhos finos e das sementes na mesma concentração. O extrato das folhas nativas foi o único que apresentou hemólise em concentração diferente. Observou-se a Hb não se difundiu com o meio em nenhuma das concentrações do extrato aquoso do caule (Figura 28).

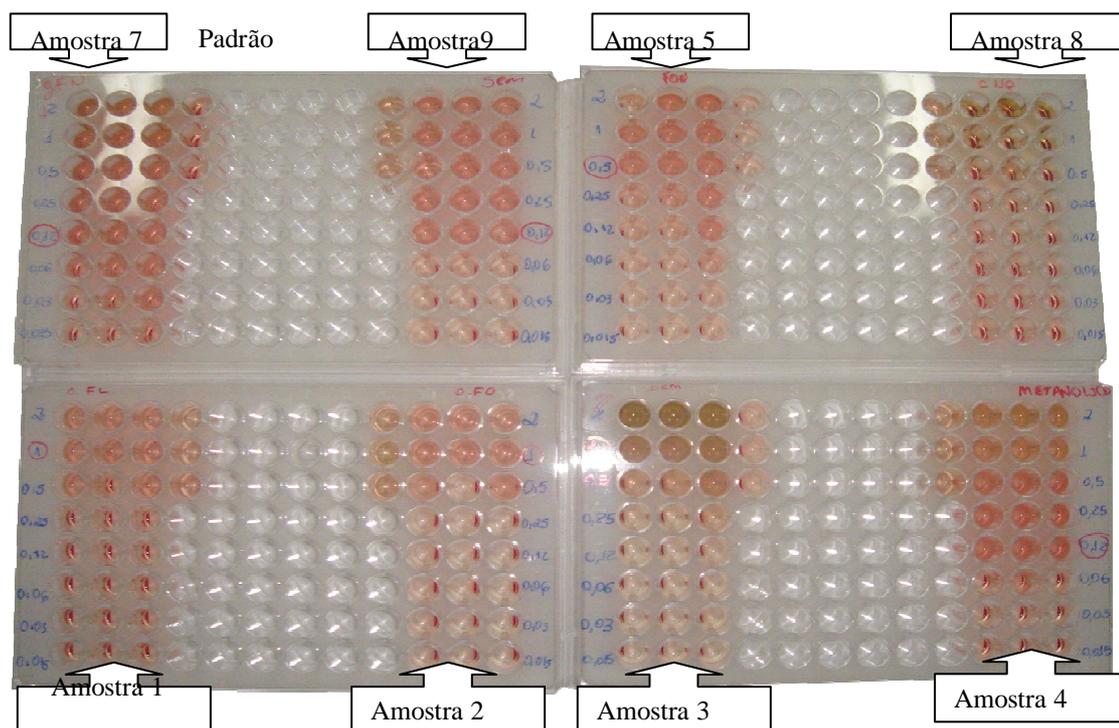


Figura 28: Resultado qualitativo (colorimétrico) do teste hemolítico dos Extr.: Dcm, MeOH, H₂O e O.E. – Amostras:1,2,3,4,5,7,8,9.

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n.

A tabela 20 mostra os resultados do teste hemolítico nas diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$), de modo que a Hb difundida para o meio indica ocorrência de hemólise. As amostras que apresentaram hemólises na concentração $1\mu\text{g/mL}$ foram as dos óleos essenciais (amostras 1 e 2) e do extrato em DCM da folha (amostra 3) indicando, neste teste, haver baixa citotoxicidade, seguido do extrato aquoso das folhas nativas (amostra 5). Esse indicativo ocorreu na concentração de $0,5\mu\text{g/mL}$. Por sua vez, no extrato em MeOH (amostra 4) e nos extratos aquosos dos galhos finos (amostra 7) e nas sementes (amostra 9), a hemólise foi observada numa concentração bem menor de $0,12\mu\text{g/mL}$. Todas as amostras foram comparadas com o padrão Tritom, que indicou hemólise em todas as concentrações. Na amostra do extrato aquoso proveniente do caule (amostra 8), não ocorreu hemólise em nenhuma das concentrações testadas, indicando não possuir efeito citotóxico, considerando-se o melhor resultado.

Tabela 20
Avaliação da Atividade Citotóxica Frente ao Teste Hemolítico nas Amostras da Espécie
Licaria puchury

Teste Hemolítico – Qualitativo		
AMOSTRAS	Concentração $\mu\text{g/mL}$	Hemólise
Padrão: Tritom	2	+
	1	+
	0,5	+
	0,25	+
	0,12	+
	0,06	+
	0,03	+
	0,015	+
Amostra 1	2	+
	1	+
	0,5	-
	0,25	-
	0,12	-
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-
Amostra 2	2	+
	1	+
	0,5	-
	0,25	-
	0,12	-
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-

Cont. Teste Hemolítico – Qualitativo		
AMOSTRAS	Concentração µg/mL	Hemólise
Amostra 3	2	+
	1	+
	0,5	-
	0,25	-
	0,12	-
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-
Amostra 4	2	+
	1	+
	0,5	+
	0,25	+
	0,12	+
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-
Amostra 5	2	+
	1	+
	0,5	+
	0,25	-
	0,12	-
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-
Amostra 7	2	+
	1	+
	0,5	+
	0,25	+
	0,12	+
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-
Amostra 8	2	-
	1	-
	0,5	-
	0,25	-
	0,12	-
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-
Amostra 9	2	+
	1	+
	0,5	+
	0,25	+
	0,12	+
	0,06	-
	0,03	-
	0,015	-

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 5 = Ext.aq.folha-n, amostra 7= Ext.aq.galho fino-n, amostra 8 = Ext.aq.caule-n, amostra 9 = Ext.aq.semente-n, n=nativa, c=cultivada, (+) = sim hemólise, (-) = não hemólise.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIICROBIANA

4.3.1 Teste Qualitativo (Verificação do Halo)

No teste qualitativo foram comparados os halos de inibição dos padrões com os das amostras testadas. O clorafenicol foi utilizado como controle positivo da bactéria *B. cereus*; e a ampicilina, para bactéria *S. aureus*. Das amostras testadas as que mostraram atividade contra essas bactérias foram os óleos essenciais da flor (amostra 1) e da folha (amostra 2), os extratos da folha em DCM (amostra 3) e os extratos aquosos do caule (amostra 8). Para a Levedura *Cândida albicans*, comparou-se com a nistatina, e as amostras que apresentaram atividade contra esse micro-organismo foram os extratos da folha em DCM (amostra 3), os extratos aquosos do caule (amostra 8) e das sementes (amostra 9 na foto equivale ao n.º 10). As demais amostras testadas não apresentaram atividades. E nenhuma das amostras mostrou-se ativa contra a Bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. (Figura 29).



Figura 29: Resultado do teste com micro-organismos: (a) *Bacillus cereus*; (b) *Staphylococcus aureus*; (c) *Candida Albicans*.

4.3.2 Teste Quantitativo (Medição do Halo)

A tabela 21 mostra o resultado do teste quantitativo do óleo essencial da flor (amostra 1), o qual apresentou halo de inibição contra a bactéria *S. aureus* e do óleo essencial da folha (amostra 2) contra a bactéria *S. oralis* condizentemente com o padrão, mostrando-se ativas contra essas bactérias. Por sua vez, contra a bactéria *M. smegimates*, essas amostras não apresentaram atividade.

Tabela 21
Atividade Antimicrobiana das Amostras da *Licaria Puchury* contra os Micro-organismos Testados

Micro-organismos testados	Amostras	Medidas do Halo de Inibição (cm)			Atividade + ou -	Halo Padrão (cm) Clorafenicol
		1	2	3		
<i>S. aureus</i>	1	3,0	3,5	3,7	+	3,5
<i>S. oralis</i>	2	3,0	3,0	?	+	3,5
<i>M. smegimates</i>	1 e 2	-	-	-	-	1,5

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n., (+) = Atividade positiva, (-) = Atividade negativa,

4.4 COMPARAÇÃO NOS DIFERENTES ENSAIOS TESTADOS

A tabela 22 mostra os melhores resultados obtidos nos ensaios antioxidantes, citotóxicos e antimicrobianos testados com as diferentes amostras das partes botânicas da espécie *Licaria puchury-major*. Importante citar que as amostras dos chás das folhas trituradas (moinho), galhos finos e sementes tiveram notável atividade em todos os métodos antioxidantes quantitativos, e não apresentaram citotoxicidade frente ao teste de *A. salina*, pelo fato de não se saber a concentração, então, por não serem testados em todas as metodologias, não constam na tabela.

Tabela 22
Melhores resultados nos diferentes ensaios biológicos testados com amostras da espécie *Licaria puchury-major*

Amostras	Atividades									
	Antioxidantes				Citotóxico		Antimicrobiano			
	Fenóis	DPPH	ABTS	LPO	<i>A. Salina</i> (µg/mL)	Hemólise	<i>S. Aureus</i>	<i>S. oralis</i>	<i>B. Cereus</i>	<i>C. Albicans</i>
2	17,63±0,51	6,81±14	4,63±0,2	53,88±1,93		1µg/mL	+	3,0cm	+	
8			2,66±0,2	60,82±5,53	>2000	0	+	+	+	+
3				61,05±2,54		1µg/mL	+	+	+	+
4				54,55±2,36						
1							3,5cm			
Padrão		8,21±0,2	8,21±0,2	78,81		0,015 µg/mL	3,5cm	3,5cm		

Nota: amostra 1 = O.E.flor-c, amostra 2 = O.E.folha-n, amostra 3= ext.DCM-folha-n, amostra 4=ext.MeOH-folha-n., amostra 8 = Ext.aq.caule-n., (+) = Atividade positiva.

5 DISCUSSÃO

As plantas podem apresentar diversas atividades, como antioxidante, citotóxica, antimicrobiana, entre outras, que podem estar relacionadas a uma única substância ou a várias atuando em sinergia. Nesse sentido, é importante relatar quais são as principais substâncias presentes nas diferentes partes botânicas da *L. puchury-major*. Ressalta-se que, de todas as amostras testadas neste trabalho, a única estudada quimicamente foi o óleo essencial das folhas.

A literatura descreve os estudos químicos realizados com as diferentes partes botânicas da *L. puchury-major* e as substâncias encontradas conforme descritos por Silva e colaboradores (1973): no óleo essencial das folhas: eucaliptol (1,8-cineol) (47,6%), safrol (21,7%), α -terpinol (11,7%) e eugenol (1,7%). No óleo essencial dos galhos finos: eugenol (61,0%), safrol (20,1%) e eucaliptol (1,8-cineol) (10,8%). No óleo essencial das sementes de acordo com os vários autores: safrol (36%), eucaliptol (1,8-cineol) (21,12%), limoneno (12,20%), α -terpinol (10,71%), eugenol (11,4 - 4,10%), metileugenol (3,60%) (CARLINI et al. 1983; FIRMA ROURE-BERTRAND, 1920; GOTTLIEB 1956; MAIA 1985; 1986; SILVA et al., 1973). Nos hidrolatos provenientes dos óleos essenciais das sementes: safrol e eugenol (CARLINI et al. 1983; 1986). No extrato hexânico das sementes: eucaliptol (1,8-cineol), safrol e eugenol (HIMEJIMA et al., 1992). Nos extratos benzênico e etanólico da madeira provenientes dos galhos grossos: aldeído 3,4-metilenodioxicinâmico, álcool 3,4-metilenodioxicinâmico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído e mais três substâncias não identificadas (MAIA, 1973). No extrato benzênico das cascas da madeira provenientes dos galhos grossos: sitosterol + stigmasterol, safrol, eugenol, 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (liquexantona), 1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona (fisciona), como também dos líquens (presentes na casca). O autor cita que a liquexantona e a fisciona são metabólitos do líquen *Graphina confluens* (LAUX et al., 1974). Nos líquens impregnados na casca: 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (liquexantona) e 1-8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona (fisciona). Neste trabalho foi realizado estudo com madeira nativa do tecido xilemático (caule), diferente do citado.

Nas partes botânicas da *L. puchury-major* há também presença de diversas substâncias minoritárias que não foram citadas. Dentre os vários monoterpenos presentes, encontram-se: linalol, cânfora, mentol, eucaliptol (1,8-cineol), cineol, limoneno como também compostos

fenólicos: eugenol e iso-eugenol, o que de certo modo corrobora com os resultados obtidos. Segundo Rigano (2010), as misturas “naturais” (ou seja, vegetais) de antioxidantes são sempre mais ativas do que uma única molécula na mesma concentração provavelmente devido ao efeito conjunto de muitas moléculas antioxidantes atuando concomitantemente, ou por causa do potencial da reação redox localizada.

A atividade antioxidante de plantas parece estar correlacionada com a quantidade de compostos fenólicos. Desse modo, é importante quantificar o teor de fenólicos totais que, dentre os diversos compostos químicos ligados a atividade antioxidante, são os mais representativos (CHEUNG et al., 2003). Nesse sentido, realizaram-se ensaios para determinação de fenólicos totais com as amostras das diversas partes botânicas da espécie *L. puchury-major*, utilizando o método de Folin-Ciocalteu, considerado por muitos autores como importante em função da sua disponibilidade comercial e padronização (LIMA et al., 2004; 2006; SILVA et al., 2007; VERZA et al., 2007). Numa avaliação preliminar da presença de polifenóis, foi realizado teste qualitativo colorimétrico no qual foi observada, a redução do reagente pelos compostos fenólicos presentes nas amostras com a formação de um complexo azul indicativo da ocorrência de possíveis compostos fenólicos cuja intensidade aumenta linearmente a 740nm (MENSOR, 2001). O teste colorimétrico evidenciou ocorrência de compostos fenólicos nos óleos essenciais das flores e das folhas, extratos DCM, MeOH e nos chás de folhas e sementes. De certo modo, essa avaliação foi ratificada pelo teste quantitativo, no qual ocorreu a maior porcentagem no óleo essencial da folha (17,63mg/EAG), seguido dos extratos das folhas em DCM (9,13mg/EAG) e MeOH (5,74mg/EAG) e no óleo essencial da flor (3,01mg/EAG), nesta sequência.

Todos os resultados obtidos na determinação do teor de fenólicos totais mostraram-se baixos em relação aos citados na literatura, como também quando comparados aos demais testes realizados para avaliação da atividade antioxidante, nos quais houve discrepâncias fazendo-se necessária a repetição do ensaio. Em relação ao resultado que apresentou maior teor de fenóis (óleo essencial das folhas), infere-se que isso pode ser devido à sinergia do monoterpene eucaliptol (1,8-cineol) presente nas amostras com outras substâncias. Na literatura trabalhos relatam que a presença de monoterpenos apresenta atividade antioxidante comprovada como também atividades provedoras de termotolerância e fotoproteção devido à capacidade de captarem radicais de oxigênio oriundos do processo fotossintético conforme comentam esses autores (PEÑUELAS; LLUSIÀ, 2002; PEÑUELAS; MUNNÉ-BOSCH, 2005).

O DPPH é um radical cromóforo que simula as espécies reativas de oxigênio; assim ele pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável. De acordo com Blois (1958), esse radical possui uma coloração violeta intensa e, quando adicionado a substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, muda sua coloração violeta para o amarelo-ouro, que caracteriza a presença de compostos com atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; HUANG. et al., 2005).

Quanto aos resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante, no método de sequestro de radicais livres (DPPH), foi observada a mudança da coloração violeta para amarelo em quase todas as amostras, porém só é considerado ativo se ocorrer em baixas concentrações. As amostras que mais evidenciaram atividades foram o óleo essencial das folhas, o extrato aquoso do caule e o chá das folhas trituradas. Esses resultados foram constatados pelo teste quantitativo, em que essas amostras apresentaram concentrações inibitórias baixas quando comparadas com o padrão quercetina ($CI_{50} = 5,69\mu\text{g/mL}$), para o óleo essencial da folha ($CI_{50} = 6,81\mu\text{g/mL}$) e para o extrato aquoso do caule ($CI_{50} = 26,13\mu\text{g/mL}$); para os chás, não foram realizados testes quantitativos. Comparando os resultados dos óleos essenciais das flores ($CI_{50} = 86,02\mu\text{g/mL}$) com os das folhas ($CI_{50} = 6,81\mu\text{g/mL}$), observou-se que o valor da CI_{50} (determinado por regressão linear) para o óleo da flor foi maior que da amostra da folha, significando baixa atividade antioxidante da flor. Alcântara (2009; 2010) testou o óleo essencial de 14 lauráceas, da mesma família da *L. puchury-major*, e observou, nas análises quantitativas, que as concentrações ativas foram altas, acima de $1000\mu\text{g/mL}$, com exceção para o óleo essencial de *A. rosaeodora*, superior a $700\mu\text{g/mL}$. Cansian e colaboradores (2010) testaram o óleo essencial de *C. camphora* (também uma Lauraceae) utilizando essa mesma metodologia e constataram que essa espécie possui baixa atividade frente ao radical livre DPPH. É importante relatar que tanto os óleos da *A. rosaeodora* como os da *C. camphora* tem como componente majoritário o linalol. E o do óleo essencial das folhas de *L. puchury* é o eucaliptol (1,8-cineol).

Lee e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antioxidante dos componentes voláteis do manjeriço (*B. ocimum*) e das folhas de tomilho (*T. vulgaris*) e verificaram que as substâncias que apresentaram melhor atividade antioxidante nessas espécies foram o eugenol, o timol, o carvacrol e o alilfenol. A mesma observação foi relatada por Pereira e Maia (2007), que citam os óleos com maiores concentrações em compostos aromáticos fenólicos, como o alilbenzeno eugenol, que apresentam maior capacidade antioxidante pela presença de hidroxila doadora de elétron ou hidrogênio. No entanto esses resultados contradizem o que foi observado nesta pesquisa, pois a amostra que apresentou melhor atividade antioxidante foi o óleo

essencial das folhas de *L. puchury-major*, que possui como substância majoritária o eucaliptol (1,8-cineol) (47,6%) e minoritária o eugenol (1,7%), ressaltando-se que esse é o menor valor de eugenol encontrado entre as diversas partes da espécie *L. puchury-major*, de acordo com os estudos químicos realizados (citados anteriormente), verificou-se a presença de eugenol em todas as partes estudadas variando a quantidade conforme a parte do vegetal. Como a presença dessa substância é mais alta no óleo essencial dos galhos finos de eugenol (61,0%), comparou-se com o extrato aquoso extraído dos galhos finos, o qual não apresentou atividade antioxidante, não sendo possível sequer calcular a concentração inibitória, visto que não alcançou 50% de inibição. O resultado obtido com a *L. puchury-major* sugere que o óleo deva agir em sinergismo e que os compostos majoritários não são os únicos responsáveis pela atividade visto que a conclusão contradiz também quando comparada com o estudo realizado por Malinowski (2010), que estudou o óleo essencial do *E. globulus* ssp. *bicostata*, o qual possui o eucaliptol (1,8-cineol) como constituinte majoritário, e descreveu que essa substância não possui atividade redutora após observar que, mesmo em concentrações muito altas (6mg/ml), não demonstrou capacidade relativa considerável em sequestrar/reduzir o radical DPPH. E citou que o mesmo resultado negativo foi verificado em trabalho realizado por AMAKURA et al. (2009), que observou CI_{50} acima de 100mg/ml para o óleo de *E. globulus*, assim como quando testou o componente majoritário do óleo, o 1,8-cineol, observando a CI_{50} acima de 100 μ mol/l (AMAKURA et al., 2002). A partir desses resultados, esses os autores concluíram que o componente eucaliptol (1,8-cineol) não apresenta atividade antioxidante relevante, e a sua ação depende da concentração em que se encontra no óleo, sendo influenciado pela origem do material, pelos métodos de preparação e pelo solvente utilizado.

Outro método de varredura de radical para avaliar a atividade antioxidante é o do 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) ou ABTS⁺, que é baseado na redução do reagente (RE et al., 1998). Por meio do ensaio qualitativo, foi avaliada a capacidade sequestrante do cátion radical ABTS⁺ capturar os hidrogênios mudando sua coloração de azul para incolor (ARNAO et al., 2001). Observou-se essa mudança nas amostras do óleo essencial das folhas, no extrato aquoso do caule e em todas as amostras dos chás, indicativo de possuírem atividade de varredura de radicais livres, que foi comprovada na análise quantitativa com os valores expressos da concentração inibitória (CI_{50}) baixa para o extrato aquoso do caule (CI_{50} = 2,66 μ g/mL) e para o óleo essencial da folha (CI_{50} = 4,63 μ g/mL) para os chás não foram realizados testes quantitativos. Assim como ocorreu para o método DPPH[•], a CI_{50} , no método ABTS⁺, também para o óleo essencial da flor foi maior que o óleo essencial da folha, indicando novamente uma baixa atividade antioxidante para o óleo essencial da flor.

A determinação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico é avaliada a partir de uma amostra com possível capacidade antioxidante de inibir o processo de oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico, pela não descoloração do β -caroteno pela permanência da cor amarela indica possível atividade antioxidante (MARCO, 1968; MILLER, 1971; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

No ensaio qualitativo por meio do teste colorimétrico, foi possível observar a leve descoloração (oxidação) do β -caroteno, nas amostras dos extratos aquosos, com exceção da amostra 8 (caule), que foi bem nítida, enquanto que amostras dos hidrolatos apresentaram total descoloração. Nas amostras dos óleos essenciais, extratos em DCM e MeOH e dos chás, não foram observadas mudanças de coloração indicando possuírem capacidade de inibir a oxidação. Esses resultados foram comparados com o teste quantitativo mostrando as inibições da oxidação das amostras dos óleos essenciais das folhas ($53,88 \pm 1,93 \mu\text{g/mL}$) e dos extratos em MeOH ($54,55 \pm 2,36 \mu\text{g/mL}$) e do extrato em DCM ($61,05 \pm 2,54 \mu\text{g/mL}$), que obteve resultado mais próximo ao padrão BHT ($78,81 \pm 2,24 \mu\text{g/mL}$), além do óleo essencial das flores ($45,74 \pm 1,44 \mu\text{g/mL}$) bem inferior.

Garcez e colaboradores (2009) realizaram testes antioxidante por meio de duas metodologias: a varredura de radicais DPPH e o de inibição de oxidação (sistema β -caroteno/ácido lineico-LPO), com várias substâncias isoladas da casca do caule de uma Lauraceae conhecida popularmente por “canela preta”. Observaram que, nos testes frente ao radical DPPH, somente as substâncias possuidoras de hidroxilas fenólicas apresentaram atividade, verificando a importância da presença de hidroxilas fenólicas como sequestradoras de radicais. No entanto, quando as mesmas substâncias foram testadas no sistema β -caroteno/ácido lineico, verificou-se que as substâncias que apresentaram melhor atividade de inibição não possuíam hidroxila fenólica, constatando-se por meio deste estudo comparativo que a presença de hidroxilas fenólicas não é a única característica estrutural necessária para prevenir ou impedir a oxidação do β -caroteno. Nos testes realizados com a *L. puchury-major*, foi também possível fazer essa observação em várias amostras como do óleo essencial da flor, do extrato em DCM e MeOH, que não apresentaram atividade nas demais metodologias, porém apresentaram atividade no sistema β -caroteno/ácido. Nesse sentido, é imprescindível fazer a identificação para descobrir uma das possíveis causas da atividade de inibição da oxidação.

Higdon e Frei (2003) comentam que os chás ingeridos na forma de infusão contribuem para a extração dos compostos fenólicos, os quais são benéficos à saúde pela sua ação antioxidante (BUNKOVA et al., 2005; MENDEL e YODIM, 2004). Em todas as

metodologias qualitativas para determinação de antioxidantes, todas as amostras dos chás apresentaram atividade, no entanto se faz necessário teste quantitativo para verificar a concentração que apresenta atividade, visto que várias partes de *L. puchury* são utilizadas como chás pelas comunidades no município de Borba, para fins medicinais ou simplesmente por possuírem sabor agradável. Simões e colaboradores (2003) descreveram que os óleos essenciais apresentam misturas complexas de compostos voláteis e possuem baixa estabilidade na presença de ar, luz, umidade, metais e, principalmente, o calor, dissipando-se facilmente principalmente em altas temperaturas. Partindo desse princípio em relação aos testes realizados com os chás, extratos aquosos e hidrolatos, os quais foram submetidos a temperatura de 100°C, acredita-se que as substâncias voláteis não se fazem mais presentes, ou estão em baixas concentrações, como, por exemplo, o safrol, que é uma substância tóxica, podendo ser atribuído ao resultado dos testes citotóxicos frente ao microcrustáceo *A. salina*, e nenhuma dessas amostras apresentou citotoxicidade. Por sua vez, os óleos essenciais das flores e folhas e extratos em DCM e MeOH das folhas apresentaram toxicidade na concentração (1mg/mL), dentre os quais o mais tóxico foi o extrato DCM das folhas.

No teste hemolítico para verificação da citotoxicidade, a ação hemolítica na estabilidade da membrana sobre os eritrócitos dos camundongos testados em diferentes concentrações das amostras de *L. puchury-major* pode estar relacionada com a ação dos constituintes presentes. A amostra dos extratos aquosos do caule foi o que apresentou melhor resultado, pois não houve rompimento dos eritrócitos em nenhuma das concentrações. Provavelmente tal resultado pode ser atribuído à presença de alguma substância, agindo só ou em sinergia. É importante lembrar que não se conhecem as substâncias presentes no caule, visto que ainda não foi realizado estudo químico. Chaudhuri e colaboradores (2007), citados por Alicio (2008), descrevem que plantas que possuem flavonoides em sua composição, os quais são incorporados nas membranas de “ghosts” de eritrócitos (eritrócitos vazios), seriam a causa da proteção dos eritrócitos contra lise hipotônica. Ou seja, a membrana dos eritrócitos torna-se mais ordenada e íntegra na presença de flavonoides. No entanto se faz necessário o estudo químico para verificação do resultado obtido.

As amostras dos óleos essenciais das flores e folhas e os extratos em DCM das folhas apresentaram hemólise na concentração 1µg/mL, não sendo considerados citotóxicos.

Por outro lado, as amostras que apresentaram maior citotoxicidade nesse teste foram os extratos aquosos dos galhos finos e as sementes e em MeOH das folhas na concentração 0,12µg/mL. Nos óleos essenciais provenientes dos galhos finos, a substância majoritária é o eugenol; e nos óleos essenciais da semente as substâncias majoritárias são safrol, 1,8-cineol,

limoneno e α -terpinol. O extrato aquoso de folhas nativas apresentou hemólise na concentração 0,5 μ g/mL. Os parâmetros adotados na análise foram observados pelas alterações da fragilidade osmótica, por meio da deposição das hemácias no fundo das cavidades da placa de Elisa. O mesmo parâmetro foi adotado por Ascari (2007), em estudos realizados com os extratos aquosos das folhas *Baccharis uncinella*, o qual analisou as interações destes com células eritrócitas humanas dos tipos sanguíneos O⁺, O⁻, A⁺, B⁺, verificou que o extrato desta planta apresentou atividade não lítica, isto é, não causou o aumento da permeabilidade da membrana eritrócita que permitisse o extravasamento do conteúdo intracelular para nenhum tipo sanguíneo.

Comparando as atividades citotóxicas dos óleos essenciais das flores e folhas, nas metodologias empregadas, verificou-se que os dois óleos apresentaram citotoxicidade alta frente ao microcrústaceo *A. salina*, nas concentrações (1,0 e 2,0mg/mL); e baixa frente aos eritrócitos de camundongos (1 μ g/mL), comparando-se os resultados concernentes aos óleos essenciais com o estudo realizado por Silva e colaboradores (2009), os quais analisaram a atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas de *canella* pertencentes à mesma família e espécie da *L. puchury-major*, quando utilizaram as mesmas metodologias: frente ao microcrústaceo *A. salina* e ao teste hemolítico sobre eritrócitos de camundongos, verificou-se também que o óleo essencial das folhas de *L. canella* exibiu alta atividade contra *A. salina* e baixa frente eritrócitos de humanos.

De acordo com a medição dos halos de inibição, constatou-se atividade antimicrobiana no óleo essencial da flor (amostra 1), que apresentou inibição (média:3,5cm) contra a bactéria *S. aureus*; e no óleo essencial da folha (amostra 2), que apresentou contra a bactéria *S. oralis* (média:3,0cm). No teste qualitativo feito preliminarmente os dois óleos apresentaram inibição quando testados contra a bactéria *S. aureus*, porém, quando feito em triplicata com medição do halo, somente o óleo da folha mostrou resultado coerente. Nesse sentido, é imprescindível a comprovação da atividade das outras amostras testadas que apresentaram inibição do crescimento contra a bactéria *S. aureus*; mostraram-se ativos os extratos da folha em DCM (amostra 3) e o extrato aquoso do caule (amostra 8); e contra a levedura *Candida albicans* os extratos da folha em DCM (amostra 3), os extratos aquosos do caule (amostra 8) e das sementes (amostra 9) apresentaram ser ativos. De todas as amostras testadas nenhuma mostrou halo de inibição contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e Gram-positiva *M. smegimates*.

Comparando os resultados obtidos com os descritos na literatura, nota-se que o único estudo antimicrobiano realizado com a *L. puchury-major* foi o realizado por Himejima e

Kubo (1992), feito com a fração destilada do extrato n-hexânico das sementes. Eles defendem ter obtido atividade antimicrobiana contra vários micro-organismos patogênicos. Neste estudo foi testado o extrato aquoso das sementes em bruto, o qual mostrou atividade apenas contra a Levedura *Candida albicans*. Esses dados podem explicar o porquê da não atividade biológica contra as outras bactérias, sugerindo a repetição dos ensaios com as amostras fracionadas. Segundo ainda esses autores relatam, que os constituintes químicos da *L. puchury-major* receberam pouca investigação; é necessária a presença de estudos posteriores para identificação da atividade antimicrobiana dessa espécie vegetal. Estudos relatam atividade antimicrobiana comprovada de algumas substâncias presentes na espécie *L. puchury-major*, conforme trabalho de KELNER e KOBER, citado por Lobato et al. (1989), no qual esses autores investigaram a ação bactericida de 175 óleos essenciais e verificaram que os grupos de substâncias responsáveis pelas atividades antibacterianas foram os álcoois monoterpênicos linalol, geraniol e α -terpineol, além de óxidos como ascaridol e 1,8 cineol. Os fenóis timol e carvacrol e os alilfenóis eugenol e safrol, apresentaram também elevada atividade antimicrobiana. Em relação ao safrol, LOBATO et al. (1989) avaliaram a atividade bacteriana com 14 óleos essenciais contra nove diferentes tipos de bactérias e observaram que, dentre os óleos que apresentaram atividade, um foi proveniente da espécie de Piperaceae, *Piper hispidinervium*, cujo principal componente é o safrol, o qual foi detectado também após o fracionamento.

Cansian e colaboradores (2010) testaram o óleo essencial das folhas *C. camphora* (Lauraceae), utilizando as mesmas bactérias, obtendo também resultado negativo contra a bactéria *E. coli*. Conforme descrito na literatura, vários autores reportam uma menor eficiência dos óleos essenciais sobre bactérias Gram-negativas, atribuindo, em parte, à maior complexidade da dupla parede celular.

Catão e colaboradores (2010) testaram uma substância isolada da *Aniba riparia* somente contra a bactéria Gram-positiva frente às linhagens de *S. aureus*, obtendo também atividade positiva. Eles acrescentaram que essa Lauraceae é uma árvore típica da Região Amazônica e que estudos realizados com os extratos dos frutos e dos cálices persistentes possuem atividade antibiótica comprovada contra as bactérias *B. cereus*, *S. aureus* e contra a Levedura *C. albicans*.

Devido à escassa literatura concernente a este tema, acreditamos na necessidade de mais investigação.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos com este trabalho permitem concluir que a *L. puchury-major* apresentou as atividades:

- Antioxidante: no óleo essencial das folhas, nos extratos aquosos do caule e no extrato em DCM das folhas. No teste qualitativo, nas amostras das folhas trituradas (moinho), galhos finos e sementes;

- Citotóxica frente à *A. salina*: todas as amostras dos extratos aquosos e dos hidrolatos, não apresentaram citotoxicidade.

- Citotóxica frente ao teste hemolítico: O extrato aquoso do caule apresentou melhor resultado seguido pelos óleos essenciais das flores e folhas e do extrato em DCM;

- Antimicrobiana: óleos essenciais das flores e folhas, extratos das folhas em DCM e o aquoso da semente contra as bactérias *B. cereus* e *S. aureus*. E contra a levedura *C.albicans*, nos extratos de DCM e aquosos do caule e semente.

Analisando no sentido de aplicabilidade da biotecnologia, conclui-se que o óleo essencial das folhas apresentou melhor resultado e coincidentemente foi a única amostra testada da qual já foi feito estudo químico e da qual já se conhecem as substâncias presentes. Outra vantagem pode ser utilizada de maneira sustentável pelo fato de não precisar podar as árvores, como é o caso da obtenção do caule, que, apesar de ter apresentado bons resultados, possui aplicabilidade inviável, pois comprometeria a espécie. Estudo sazonal da espécie se faz necessário, para verificação do rendimento de seus constituintes; outras vantagens são atribuídas à espécie como fácil adaptação ao plantio e possuir odor agradável.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos podem abrir perspectivas na aplicabilidade biotecnológica de um antioxidante natural. Para isso, faz-se necessária a continuidade da pesquisa para a identificação dos constituintes químicos, testes *in vivo* como cultura de células, terogenicidade, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ABOUT, P. I. Comfrey: assessing the low-dose health risk. **The Medical Journal of Austrália**, v. 149, 1988.
- ABE, Lucile Tiemi. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* da região de Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 787-92, abr./jul. 2007.
- ADAM, D., Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1-5, 2002.
- AGARWAL, S.; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canadian Medical Association Journal**, v. 6, n. 163, p. 739-44, 2000.
- ALCÂNTARA, Joelma Moreira. **Bioprospecção de espécies amazônicas da família lauraceae com potencial aromático e medicinal**. 2009. 138p. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- ALCÂNTARA, Joelma Moreira. et al., Composição química de óleos essenciais de espécies de *aniba* e *licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Quim. Nova**, Manaus, v. 33, n. 1, p. 141-5, nov. 2010.
- ALÍCIO, C. L. Fragilidade osmótica de eritrócitos humanos expostos à extrato bruto aquoso de *Baccharis Sp.* **Artigo eletrônico**. Disponível em: <<http://www.artigonal.com>>. Acesso em: 28 dezembro de 2008.
- AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 90, n. 17, p. 7915-22, 1993.
- AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILLET, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, U.S.A., v. 92, p. 5258-65, 1995.
- AMAKURA, Y.; UMINO, Y.; TSUJI, S.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TONOGAI, Y. Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. **Food Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 47-56, 2002.
- AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M.; SUGIMOTO, N.; YAMAZAKI, T.; YOSHIDA, T. Marker constituents of the natural antioxidant *Eucalyptus* leaf extract for the evaluation of food additives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1060-65, 2009.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103-8, 1996.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-98, 2002.

ARTS M, J.T.J, et al.; Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical toxicology**, v. 42, p. 45-9, 2004.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, n. 11, p. 419-21, 2000.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; COSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chem**, v. 73, p. 239-44, 2000.

ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chem**, v. 73, p. 239-44, 2001.

ASCARI, Jociane. **Estudo Químico e Bioatividades de *Baccharis uncinella* DC.** 2007. 75p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

ASOLINI, Fabia Cristina; TEDESCO, Adriana Maria; CARPES, Solange Terezinha. Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic Compounds from Extracts of Plants Used as Tea. **Brazilian Journal of food technology**, Paraná, v. 9, n. 3, p. 209-15, 2006.

ASTOLFI, V., et al. Determinação de atividades biológicas do óleo essencial do ho-sho (*cinnamomum camphora* nees & eberm). In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu. **Anais**. Erechim: URUAUMRS, 2007.

BACALLAO, L.L.G. et al. Plantas com propriedades antioxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas**, v. 20, n. 3, p. 231-35, 2001.

BALUNAS, M. J. et al. Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. **Chemistry e Biodiversity**, v. 3, p. 897-915, 2006.

BARBOUR, E. K., et al. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 93, p. 1-7, 2004.

BARNETT, Y. A.; KING, C. M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 338, n. 1/6, p. 115-28, 1995.

BARROS, C. F. et al., Madeiras da Mata Atlântica, Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, v. 1, ed. 1, p. 86, 1997.

BARROSO, G. M. et al. **Frutos e Sementes: Morfologia aplicada à Sistemática de Dicotiledôneas.** Viçosa: UFV, 1999.

BECKER, K. et al. A glutathione reductase-like flavoenzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structural considerations based on the DNA sequence. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, p. 67-72, 1996.

BELTRÃO, J.F. A arte de curar em tempo de cólera... ou o uso da homeopatia durante o flagelo — Grão-Pará, século XIX. **Revista da Sociedade Brasileira de História da Ciência**, v. 18, p. 17-38, 1997.

BELTRÃO, J.F. **Cólera, flagelo da Belém do Grão-Pará**. Tese de doutoramento, Campinas, Departamento de História do Instituto de Filosofia e Ciências Humanas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). 1999.

BELTRÃO, J. F. A arte de curar dos profissionais de saúde popular em tempo de cólera: Grão-Pará do século XIX. **História, Ciências, Saúde — Manguinhos**, v. VI (suplemento), p. 833-66, set., 2000.

BENZIE, F. F. I. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Science Nut.**, v. 47, p. 233-61, 1996.

BERG, M. E.; VAN DEN. **Contribuição ao conhecimento da flora medicinal do Maranhão**. Na 1 sip. Trop. Úmido, Maranhão. EMBRAPA/CPATU,2, 1986.

BERG, M. E.; VAN DEN. **Plantas medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. CNPq. Trop. Úmido/ MPEG.Belém-PA, 1993.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-30, maio/ago. 1999.

BLANCO, B. et al. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação o hemolítica. **Acta Scientia e Veterinariae**, v. 48, p. 34-45, 2006.

BLOIS, M. S. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-79, 1958.

BONASTRE. “The Volatile Oils” II. **Berl. Jahrb. d. Pharm.**, New York, v. 37, n. 160, 1825.

BORGUINI, Renata Galhardo. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. 2006. 174p. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, nº 1, p. 25-30, 1995.

BUNKOVA, R. et al. Antimutagenic Properties of Green Tea. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, p. 25–9, 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review, **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 3, p. 223-53, 2004.

- CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: HOFFMAN, D. et al. Handbook in cytotoxicology. **Oxford: Blackwell Scientific Publication**, v. 1. p. 1-5, 1993.
- CANSIAN, R. L. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciênc. E Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 378-84, 2010.
- CARLINI, E. A.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. C. Psychopharmacological effects of the essential oil fraction and of the hydrolate obtained from the seeds of *Licaria puchury-major*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 225-6, 1983.
- CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.**Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.
- CARVALHO, M. S., et al. Estudo preliminar da fitotoxicidade de *myracrodruon urundeuva* fr. allemao (anacardiaceae). In: IX Congresso de Ecologia do Brasil, 2009, São Lourenço. **Anais.** São Lourenço – MG, 2009.
- CATÃO, R. M. R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre a eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **RBAC**, v. 42, n. 9, p. 9-14, 2010.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.
- CEPLEANU, F. et al. Screening of tropical medicinal plants for mollucidal, larvicidal, fungicidal and cytotoxic activities and brine shrimp toxicity. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 32, n. 3, p.294-307, 1994.
- CHAN, P. K.; OHARA, G. P.; HAYESA, W. **Principles and methods for acutr and subchronic toxicity**, 1982.
- CHI, L. M.; WU, W.G. Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1062, p. 46-50, 1991.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A., Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CHEUNG L.M., CHEUNG PCK, OOI VEC. Antioxidante activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chem.**, v. 80, n. 2, p. 249-55, 2003.
- CHIANG, H. C. et al. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. **Jour Enzym Inhib.**, v. 8, p. 61-71, 1994.
- CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-68, 2002.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. **Evaluation of new antimicrobials in vivo and in experimental animal infections. Antibiotics in Laboratory Medicine.** 3.ed., Baltimore: William e Wilkins, p.739-86, 1991.

COOPER, Kenneth Hardy. **Revolução Antioxidante.** 3.ed. Rio de Janeiro: Record, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CRONQUIST, A. **Integrated System of Classification of Flowering Plants.** New York: Columbia University Press., 1981.

DAVID, J.P. et al. **Antioxidantes de fontes naturais. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios.** Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

DE JESUS, Denise Neves Celestino. **Avaliação dos efeitos da adição do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), na dieta, sobre a fisiologia e a produtividade de codornas japonesas (*coturnix coturnix japonic*).** 2007. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DINIZ, L. R. L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke sobre a função renal.** 2006. p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), 2006.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-T. Cruzeiros de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas.** 1997. 128p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1997.

BORGUINI, Renata Galhardo. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional.** 2006. 174p. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DUARTE ALMEIDA, Joaquim Maurício. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-52, abr./jun., 2006.

EVANS, J. C., KODALI, D. R., ADDIS, P. B. Optimal tocopherol concentration to inhibit soybean oil oxidation. **J Am Oil Chem Soc.**, v. 79, p. 47-51, 2002.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice.** Londres: Chapman and Hall, p. 247, 1994.

FRAISSE, L. **Etude du rôle des mitochondries dans la production d'espèces oxygénées réactives en situation de stress oxydatif.** 1993. p. Tese (Doutorado em), INSA, Toulouse, France, 1993.

FRANCO, Ana L. P., et al. avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *aloesia gratissima* (gillies & hook) tronco. (alfazema), *ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo) e *curcuma longa* l. (açafraão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, Ref. ISSA 1808-0804, v. 4, n. 2, p. 208-20, 2007.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **Advances in Enzymology and related áreas of molecular biology**. v. 41, p. 35-48, 1974.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 7761-64, 1989.

GALEMBECK, E.; ALONSO, A.; MEIRELLES, N. C. Effects of polyoxiethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by polyoxi (ethylene (n) nonylphenol) non ionic surfactants. **Chemical Biological Interactions**, v. 113, p. 91-103, 1998.

GARCÍA-ALONSO, Maria. et al. Evaluation of the antioxdant properties of fruits. **Food Chemistry**, Spain, v. 84, p. 13-18, feb. 2004.

GASPAR, J. et al., Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 51-5, 1993.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, Oxford, v. 7, n. 1-2, p. 113-74, 1998.

GILDEMEISTER, E.; HOFFMANN, F. **The volatile oils**. John Wiley and sons, New York, p. 487, v. 2, 1916.

GONÇALVES, Renata Texeira. **Avaliação do potencial antioxidante e citotóxico em extratos vegetais de espécies de Cecropiaceae, Fabaceae e Moraceae**. 2008. p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2008.

GOTTLIEB, O. R. Estudo do óleo essencial da fava do puxuri. **Boletim do Instituto de Química Agrícola**, Rio de Janeiro, n. 43, p. 14-23, 1956.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Fatores que interferem no teor de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.

GRAÇA, Rosilane Ramos. **Puxuri uma potencialidade do município de Borba**. 2003. 48p. Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do curso (Bacharelado em Tecnologia da Indústria da Madeira) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2003.

GUO, C. et al., Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1719-26, 2003.

GUO, S. et al. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS–NO pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, p. 682-95, 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, v. 344, p.721-24, 1994.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-17, 1995.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 16, n. 1, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B. Antioxidants: The Basics-What they are and how to evaluate them. **Pharmacology**, Academic Press, v. 38, p. 3-20, 1997.

HALL III CA, Cuppett SL. Structure-Activities of Natural Antioxidants. In: Aruoma OI, Cuppett SL., editors. **Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concepts**. Illinois: AOCS PRESS; p. 141-72, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology & Medicine**. 2.ed. New York : Oxford University Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology & Medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Clarendon: Oxford, 2000.

HANASAKI, Y. et al. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 16, n. 6, p. 845-50, 1994.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HEINONEN, O.P. et al. Prostate câncer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in controlled trial. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 90, n. 6, p. 440-6, 1998.

HERMES-LIMA. M. **in functional metabolism: Regulation and adaptation**. Storey K.B.(editor). John Wiley and Sons, New Jersey (2004).

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43 (1): p. 89-143, 2003.

HIMEJIMA, Masaki; KUBO, Isao. Antimicrobial Agents From *Licaria Puchuri-Major* and Their Synergistic Effect With Polygodial. **Journal of Natural Products**, California, v. 55, n. 5, p. 620-625, may., 1992.

HIROSE, M.; HAGIWARA, A.; HASUI; INOVE, K.; ITO, N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induton of forestomach lesions in rats. **Cancer Lett.**, Shannon, v. 30, n. 2, p. 169-74, 1986.

HUANG, Dejian; BOXIN; PRIOR, Ronald L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem.** Singapore, v. 53, n. 6, p. 1841-56, mai. 2005.

- JANKUN, J. et al. Why drinking tea could prevent cancer. **Nature**, p. 387-561, 1999.
- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruit and vegetables - the millennium`s health. **Int J food Sci Technol.**, v. 36, p. 703-25, 2001.
- KAUR, C.; KAPOOR H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Int J food Sci Technol.**, v. 37, p. 153-61, 2002.
- KORKINA, L. G.; AFANAS ES, I. B. Antioxidant and Chelating Properties of Flavonoids. **Pharmacology**. Academic Press., v. 38, p. 151-63, 1997.
- KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-32, 2005.
- KUO, K. L. et al. Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-her, and green tea leaves in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 480-9, 2005.
- LAUX, Délcio Orni. “**Estudo Químico de Plantas Amazônicas: *Coupeia bracteosa*, *Licaria puchury-major*, *Bauhinia splendens*”**. 1974. 97p. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1974.
- LEE, G. R., et al. **Wintrobe: Hematologia clínica**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998.
- LEE, K. W. et al. Vitamins, phytochemicals, diets, and their implementation in câncer chemopreventions. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 44, p. 437-52, 2004.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 1986.
- LÊ COINTE, P. **Árvores e Plantas Úteis (indígenas e aclimatadas). Amazônia Brasileira-III**. 2.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1947.
- LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; SILVA, G.S.B.; LIMA, D.E.S.; Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata L.*). **Revista de Nutrição**, v. 17, nº 1, p. 53-57, 2004.
- LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVÊA, C. M.C.P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, nº 4, p.531-536, 2006.
- LIMA, J. M. et al. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta daninha**, Viçosa, v. 27, n. 1, 2009.
- LOBATO, A. M.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. F. S.; MAIA, J. G. S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 19, p. 355-63, 1989.
- MACHLIN, L.J. Introduction. *Annals of the New York Academy Sciences*, New York, v. 669, n. 4, p. 1-6, 1992.

- MAIA, José Guilherme Soares. **Estudo químico de plantas amazônicas: Eugenia biflora, Myrcia citrifolia, Licaria puchury-major, Licaria macrophylla, Licaria aurea.** 1973. 143p. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1973.
- MAIA, J.G.S.; RAMOS, L.S.; LUZ, A.I.R. Estudo essencial do puxuri por cromatografia de gás / espectrometria de massa (CG/EM). **Acta Amazônia**, v. 15, n. 1-2, p. 179-82, 1985.
- MAIA, J. G. S. et al. **Plantas aromáticas da Amazônia e seus óleos essenciais.** Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 173, 2001.
- MALINOWSKI, Letícia Rocha Loures. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de eucalyptus globulus labill. subespécie bicostata (maiden et al.) j. b. kirkpat., myrtaceae.** 2010. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- MALHEIROS, S. V. P.; DE PAULA, E.; MEIRELLES, N. C. Contribution of trifluoperazine / lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1373, p. 332-40, 1998.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Society**, v. 45, p. 594-98, 1968.
- MARINOVA, E. M.; YANISHILIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanisms of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chem.**, Washington, v. 81, n. 2, p. 189-97, 2003.
- MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, Viçosa, v. 8, n. 1, p. 195-206, jan./dez., 2001.
- MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; PROVAN, G. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **J. Sci Food Agric.**, v. 82, n. 3, p. 323-30, 2002.
- MATSUO, M.; KANEKO, T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, 2000. **Anais**. editor. Free radicals in exercise and aging. Champaign: Human Kinetics, p. 73-115, 2000.
- MATTA, A. A. **Flora médica brasileira.** Manaus: Secção de Obras da Imprensa Oficial, p. 318, 1913.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Rev. eletrônica: Food Chem.**, Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 23 dezembro de 2009.
- MAURICIO, A. Q. **Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético.** 2006. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- MELO, M. S. O. **Antioxidantes Naturais da castanha do Brasil (*Bertholetia excelsa*), da**

castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e fruto do dendezeiro (*Elais guineensis*, *Jacq.*). 1989. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

MELO, P.S. et al. Comparison of the gastroprotective effect of a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara* with its synthetic derivatives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2, p. 169-74, 2003.

MELLO, A. C.; CARLINI, E. A. Behavioral observations on compounds found in nutmeg. **Psychopharmacologia**, v. 31, p. 349-363, 1973.

MENDEL, S.; YOUDIM, M. B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 304-17, 2004.

MENDONÇA, M. S. Anatomia foliar de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v. 10, n. 2, p. 8-25, 2008.

MENSOR, L.L., Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, v.15, n.2, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N., et al. A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v. 45 p. 31-4, 1982.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **J. Am. Oil Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOLINEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **J Sci Technol**, v. 26, n. 2, p. 211-19, 2004.

MONGELLI, E. Screening of Argentine Medicinal Plants using the Brine Shrimp Microwell Cytotoxicity Assay. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 249-5, 1996.

MONTHANA R. A. A., LINDEQUIST U 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **J Ethnopharmacol**, v. 96, p. 177-81.

MORS, Walter Baptist; RIZZINI, Carlos Toledo. **Useful plants of Brazil**. São Francisco: Holden-Day, p. 65, 1966.

MULLER, A. Journ. F. Prakt. Chem. 58, 463, 1853.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-71, 2001.

MUKHERJEE, J. et al. Effects of dietary consumption of black tea infusion alone and in combination with known clastogens on mouse bone marrow chromosomes *in vivo*. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 657-61, 1997.

MURRAY, D.M. et al. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative

products of lipids in CCl₄ poisoning. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 38, n. 6, p. 711-18, 2005b.

NATARAJAN, Kavithalakshmi S. et al. Antioxidant activity of a salt-spice-herbal mixture against free radical induction. **Journal of Ethnopharmacology**, India, p. 1-8, sep., 2005.

NOOROZI, M. et al. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, n. 6, p. 1210-18, 1998.

NUNES, E. et al. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. Trabalho de Revisão. Faculdade Estácio de Sá, Campo Grande – MS, Brasil, 2007.

NUNES, G.P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev Bras. Farmacognosia**, Mato Grosso do Sul, v. 13, p. 83-92, 2003.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. Linking photorespiration, monoterpenes and hermotolerance in *Quercus*. **New Phytologist**, v. 155, p. 227-38, 2002.

PEÑUELAS, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 166-9, 2005.

PINHEIRO, R. I. C. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, 2004.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 67, n. 5, p. 289-97, 1997.

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11-12, p. 1173-81, 1999.

PUGLIESE, P. Antioxidantes, Envelhecimento e a Pele. **Revista de Cosmiatria & Medicina Estética**, São Paulo. p. 25-27, 1998.

RAMALHO, Valéria C.; JORGE, Neuza. Atividade antioxidante do tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 15-20, abr., 2006.

RAMOS, A. et al. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 241-46, 2003.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-37, 1998.

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia Amazônica**. Manaus: SEBRAE -INPA, 2002.

RICE-EVANS, C.A. et al. The relative anti-oxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, Chur, v. 22, p. 375-88, 1995.

RICE-EVANS, C. A. et al. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci**, v. 2, n. 4, p. 152-9, 1997.

RIGANO, L.; DISTATE, F. Antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Cosmetics & Toiletries Brasil**, ISPE – Institute of Skin and Product Evaluation, Milão – Itália. v. 22, n. 2, mar/abr., 2010.

RILEY, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 65, n. 1, p. 27-33, 1994.

ROBES. “The Volatile Oils” II. **Berl. Jahrb. d. Pharm.**, New York, p. 5-6, 1800.

ROCQUE, Carlos. **Grande Enciclopédia da Amazônia**. Belém: Amazônia, v. 4, 1968.

ROE, D.A. Effects of drugs on vitamins needs. In: Of the New York Academy Sciences, 1992, New York. **Annals**. New York, v. 669, p. 156-63, 1992.

ROURE-BERTRAND. Roure-Bertrand Fils Bulletin. **In: Chem. Abs.**, Paris, 1920.

ROSAS, M. **Plantas medicinais e ervas feiticieras da Amazônia Atlântis**. p. 154, 1978.

SAKANAKA, S. et al. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 53, p. 2307-11, 1989.

SANTOS, S. C. et al. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L. fractions against *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 7, n. 1, p. 30-3, 2004.

SANTOS, S.C. et al. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Rev Bras Farmacogn**. v. 16, p. 552-6, 2006.

SEABRA, A. P., GUIMARÃES, E. C., MORS, W. B. Estudo do óleo essencial de “puxuri” por cromatografia gás-líquido. In: Associação Brasileira de Química. **Anais**. v. 26, p. 73-78, 1967.

SEEMAN, P., SHAÁFI, R. I., GALEY, W. R., SOLOMON, A. K. The effect of anesthetics (Chlorpromazine, ethanol) on erythrocyte permeability to water. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 2, p. 365-68, 1970.

SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. **Pharmacological Reviews**, v. 24, p. 583-655, 1972.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **Review. European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.

SILVA, M. LEÃO da, MAIA, J. G. SOARES, REZENDE, C. M. ANDRADE DA MATA, GOTTLIEB, O. R. Arylpropanoids from *Licaria puchury-major*. **Phytochemical**, New York, v. 12, n. 2, p. 471-2, feb., 1973.

SILVA, Marlene F.; LISBOA, Pedro Luiz Braga & LISBOA; LOBATO, Regina C. **Nomes Vulgares de Plantas Amazônica**. Belém: INPA. 1977.

SILVA, M. et al. **Química de los triterpenos**. Washington: D. C. Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, p. 327-31, 1992.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, E. T. A. Analgesic and antiinflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 89, n. 2, p. 277-83, 2003a.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; ANDRADE, N. J.; ASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. J. Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 6, n. 1, p. 63-70, 2003b.

SILVA, C.G. et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 229–33, 2005.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidants activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food chemistry**, v. 101, nº 3, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, J. R. de A. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, 2009.

SINGH, R. P. J.; CHIDAMBAR, MURTHY, K. N.; JAVAPRAKASHA, G. K. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 1, p. 81-6, 2002.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. PortoAlegre/Florianópolis, UFRS/UFSC, p. 14, 328-405, 1999.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

SINGLETON V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-58, 1965.

SIQUEIRA, J. M. et. al. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-87, 2001.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-55, 2007a.

SOUZA, Tatiana M. et al. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este

extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 71-5, Jan./Mar. 2007b.

SOUZA, J.N.S. et al. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 331-9, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONOWA, M. M.; KONIG, W. A. Constituents of the essential oil of *Cyperus alopecuroides*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 4, p. 321-5, 2001.

SOUZA-FILHO. et al. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazônica**. v. 39, n. 2, p. 389- 96, 2009.

STAHL W.; SIES H. Antioxidant activity of carotenoids. **Mol Aspects Med.**, v. 24, p. 345-51, 2003.

SUBRAMANIAN, M. et al. Diminution of singlet oxygen- -induced damage by curcumin and related antioxidants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 311, n. 2, p. 249-55, 1994.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.**, v. 10, p. 63-8, 1959.

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae)**. 2002. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

TRABER, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. Mineral and Electrolyte Metabolism, **Basel**, v. 23, n. 3-6, p. 135-39, 1997.

TSIGARIDA, E. et al. Behaviour of *Listeria monocytogens* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence orégano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 901-2, 2000.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p. 1-7, 2006.

VARGAS, Fabiao de S. **Estudo comparativo entre técnicas para avaliação de atividades antioxidantes de espécies de plantas da Amazônia**. 2008. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

- VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of agriculture and food chemistry**, n. 46, p. 4113-7, 1998.
- VERZA, S. G. et al. Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-20, 2007.
- VILLANO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH• free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-5, 2007.
- VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
- ZAMBONI, S. Óleos Essenciais. **Revista Brasileira de Química**. XCV, v. 11, n. 575, p. 106-110, 1983.
- WATERS, M.D. et al. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 109-29, 1996.
- WHO. Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization (WHO), Geneva, p. 41-3, 1998.
- YANG, D. et al. Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nuficera Gaertn*) rhizome. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, n. 16, v. 1, p. 158-63, 2007.