



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS DA AMAZÔNIA - PPGMBT**

**LUANA TRAVASSOS BATISTA**

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E OBTENÇÃO DE UM FITOCOSMÉTICO DO ÓLEO  
ESSENCIAL E DE EXTRATOS DE *Aniba parviflora* (Meisn) Mez. (LAURACEAE)**

**Manaus – AM  
2014**

**LUANA TRAVASSOS BATISTA**

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E OBTENÇÃO DE UM FITOCOSMÉTICO DO ÓLEO  
ESSENCIAL E DE EXTRATOS DE *Aniba parviflora* (Meisn) Mez. (LAURACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Melchionna Albuquerque**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior**

**Manaus – AM**  
**2014**

**LUANA TRAVASSOS BATISTA**

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E OBTENÇÃO DE UM FITOCOSMÉTICO DO ÓLEO  
ESSENCIAL E DE EXTRATOS DE *Aniba parviflora* (LAURACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Cecilia Verônica Nunez  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

---

Roberto Barbosa de Castilho  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

**Manaus, março de 2014.**

Ficha Catalográfica

Batista, Luana

Atividade biológica e obtenção de um fitocosmético do óleo essencial e de extratos de *Aniba parviflora* (Meisn) Mez. (Lauraceae)/ Luana Travassos Batista. - Manaus: UEA, 2014.

120 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) —  
Universidade do Estado do Amazonas, 2014.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Melchionna Albuquerque

Co-Orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior

## **DEDICATÓRIA**

**“Dedico este trabalho à minha família, pelo amor incondicional.”**

E apliquei o meu coração a esquadrinhar,  
e a informar-me com sabedoria de tudo  
quanto sucede debaixo do céu; esta  
enfadonha ocupação deu Deus aos filhos  
dos homens, para nela os exercitar.

Eclesiastes 1:13

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu amor e fidelidade, por me dar saúde, ânimo, uma boa família e bons amigos;

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Melchionna Albuquerque, pelos ensinamentos, confiança e oportunidade;

Ao meu co-orientador, professor Dr. Sergio Duvoisin Junior pelos ensinamentos no decorrer da concretização deste trabalho;

Aos meus pais, Francisco e Rosinéia, às minhas irmãs Ana, Rosália e Karol, meus sobrinhos Gabriel e Luíza, e demais familiares que de alguma forma me conduziram até aqui, pela presença imprescindível em todos os momentos de minha vida, com muito amor;

Aos parceiros de laboratório, Jéssica, Andréa, Renah, Rafael e Messe, por toda ajuda direta ou indireta para a realização deste trabalho. Em especial ao Geverson, gostaria de agradecer todo o apoio, incentivo e amizade.

Às minhas amigas/colegas de mestrado Gabrielly, Juliana, Daiana, Flávia, Weena, Laila e Joelma, fico muito feliz por nossa amizade ter se fortalecido nestes dois anos;

À Jana, meu ombro amigo, agradeço seu incentivo, sua amizade e tudo o que fez por mim... Eu só tenho a agradecer.

Aos meus queridos amigos de infância e da graduação, que levo sempre em meu peito, pela amizade, incentivo e conversas de adulto (risos), sempre foram o apoio que precisava.

À Elenn Suzane e Adriana Rosa, pela colaboração neste trabalho.

À professora Marne Carvalho pela colaboração nos testes em cultura de células.

À professora Karen Costa pela colaboração nos ensaios antibacterianos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia pelos ensinamentos repassados.

À Universidade do Estado do Amazonas pelo espaço cedido e aos colegas da Universidade que colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, por proporcionar essa possibilidade de crescimento profissional.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À CAPES, FAPEAM e CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma me ajudaram nesses dois anos, para a realização deste trabalho, que colaboraram para o meu crescimento intelectual, pessoal, espiritual e profissional. Que Deus os abençoe ricamente.

Muito obrigada!



## RESUMO

*Aniba parviflora* é uma planta nativa da região Amazônica, pertencente à família Lauraceae, e que a exemplo das outras espécies da família e do gênero, é uma planta aromática, produtora de óleo essencial, mas com poucas propriedades biológicas descritas na literatura. Uma vez que as plantas são fontes de compostos químicos bioativos, há uma grande procura pelas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia por novas fontes de substâncias de interesse comercial. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar atividades biológicas e o potencial citotóxico do óleo essencial, extratos e partições de *A. parviflora*, a fim de empregá-los na formulação de um fitocosmético, favorecendo assim, o conhecimento das propriedades biológicas de uma planta nativa da região Amazônica e a exploração de seus recursos naturais de forma sustentável. A extração do óleo essencial foi realizada através da hidrodestilação por arraste a vapor utilizando aparelho tipo Clevenger, os extratos preparados por maceração a frio utilizando etanol como solvente, e as partições obtidas por partição líquido-líquido utilizando inicialmente uma mistura de etanol e água, e em seguida os solventes *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila, sendo utilizados folhas e galhos de *A. parviflora*. As propriedades biológicas investigadas foram: antimicrobiana, por meio dos métodos difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM); antioxidante, pelo método de sequestro do radical livre DPPH· (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) com o monitoramento do decréscimo da absorvância; e citotoxicidade em cultura de células. Apenas os óleos essenciais de *A. parviflora* mostraram-se ativos contra duas cepas testadas (*S. aureus* e *E. faecalis*) com halos inferiores a 11 mm para ambas as bactérias, tendo CIM apenas nas maiores concentrações (4,0 e 2,0 mg/mL). Quanto à atividade antioxidante, somente os extratos brutos e as partições líquido-líquido foram ativos, sendo os melhores resultados encontrados nos extratos brutos e nas partições acetato de etila e hidroalcoólica, apresentando potencial antioxidante em média de 3 a 4,5 vezes menos eficientes que o antioxidante padrão ácido ascórbico. Os óleos essenciais, extratos e partições de *A. parviflora* não apresentaram citotoxicidade em cultura de células na concentração de 50 mg/mL. Os ensaios químicos qualitativos e quantitativos das amostras bioativas de *A. parviflora* demonstraram em sua composição química a presença de taninos, flavonóides, saponinas e terpenos. Entre os terpenos encontrados destacam-se o linalol, composto com muitas atividades biológicas interessantes já descritas, que foi encontrado como componente majoritário dos óleos essenciais, e outros, como o espatulenol e o cariofileno. A partir dos resultados encontrados, foi proposta a formulação de um produto cosmético (emulsão para o corpo), empregando o óleo essencial e uma partição glicólica (obtida a partir da partição hidroalcoólica diluída em propilenoglicol) de *A. parviflora*, sendo este submetido a ensaios preliminares de estabilidade. Por meio de um planejamento experimental fracionado foram propostas oito formulações do tipo emulsão óleo/água, variando a concentração dos componentes: base, extrato glicólico, glicerina e óleo vegetal, a fim de avaliar a influência destes fatores sobre as propriedades físico-químicas e organolépticas do fitocosmético. Os resultados demonstraram que a base foi o fator que mais influenciou as propriedades da emulsão, e que apenas as formulações mantidas no escuro e à temperatura ambiente permaneceram estáveis no teste preliminar de estabilidade. Portanto, com este trabalho foi possível concluir que *A. parviflora* possui potencial para ser explorada pela indústria cosmeceútica, sendo que outras atividades biológicas devem ser investigadas.

Palavras-chave: Antioxidante; Antimicrobiano; Citotoxicidade; Cosmético.

## ABSTRACT

*Aniba parviflora* is a native plant from the Amazon region, and belongs to the Lauraceae family. Like other species of this family and gender, it is an aromatic plant, producer of essential oils, but with few biological properties described on the literature. Once the plants are sources of bioactive chemicals, there's a huge demand by cosmetics, pharmaceutical and food industries for new sources of compounds with commercial appeal. Thus, this study aimed to evaluate biological activities and the cytotoxic potential of essential oil and extracts from *A. parviflora* in order to employ it in the formulation of a phytocosmetic, therefore favoring the knowledge of biological properties of a native plant from the Amazon region and the exploitation of its natural resources in a sustainable approach. The essential oil extraction was performed through hydrodistillation using Clevenger apparatus. The extracts were prepared by cold maceration using ethanol as solvent, and the partitions were obtained through liquid-liquid partition, first using a water and ethanol mixture, followed by *n*-hexane, dichloromethane and ethyl acetate. It was used leaves and thin stems of *A. parviflora*. The investigated biological properties were antimicrobial, by using agar diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods; antioxidant, by free radical DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging, measuring the absorbance decrease; and cytotoxicity, using cell cultures. Only the essential oils from *A. parviflora* shown to be active against two of the tested bacteria strains (*S. aureus* e *E. faecalis*) with inhibition halos presenting diameters below 11 mm. The MIC was found only at the higher concentrations tested (4.0 and 2.0 mg/mL). Regarding antioxidant activity, only the extracts and its liquid-liquid partitions were active, with the best results found for crude extracts, ethyl acetate and hydroalcoholic partitions, presenting antioxidant potential 3 to 4 times less efficient than the standard acid ascorbic. Essential oils, extracts and its partitions from *A. parviflora* showed no cytotoxicity on cell cultures at 50 mg/mL. The qualitative and quantitative analysis of the bioactive samples from *A. parviflora* showed in their chemical composition the presence of tannins, flavonoids, saponins and terpenes. Among the terpenoids it was found linalool, compound with many interesting activities previously described, which was found as the main component of the essential oils. Others bioactive compounds, such as espatunelol and caryophyllene were also found. Considering these finding results, it was proposed a cosmetic formulation (body emulsion), using the essential oil and a glycolic extract of *A. parviflora*, which was subjected to preliminary tests of stability. Through a fractionated experimental design it was proposed eight formulations of oil/water emulsions by varying the concentration of the components: base, glycolic extract (obtained from the hydroalcoholic partition diluted in propylene glycol), glycerin and vegetable oil, in order to assess the influence of these factors on the physical-chemical and organoleptic properties of the phytocosmetic. Results showed that the base was the factor which most influenced the emulsion properties, and that only the formulations kept in the dark at room temperature remained stable at the preliminary stability tests. Therefore, with this work it was possible to conclude that *A. parviflora* has the potential to be exploited by the cosmeceutical industry, and other biological activities should be investigated.

Keywords: Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxicity; Cosmetic.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores e níveis (em gramas) utilizados no planejamento experimental fracionado $2^{4-1}$ .....	48
Tabela 2 - Distribuição aleatória dos níveis dos fatores estudados no planejamento experimental $2^{4-1}$ .....	48
Tabela 3 - Matérias-primas utilizadas no planejamento experimental das formulações cosméticas de <i>A. parviflora</i> , suas funções e quantidades.....	49
Tabela 4 - Coeficientes utilizados no cálculo para a determinação da viscosidade de acordo com a velocidade e o rotor utilizado no viscosímetro rotativo.....	53
Tabela 5 - Composição química do óleo essencial de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	56
Tabela 6 - Composição química do óleo essencial de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	58
Tabela 7 - Composição química do extrato etanólico de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	61
Tabela 8 - Composição química do extrato etanólico de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	63
Tabela 9 - Composição química da fase <i>n</i> -hexânica de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	65
Tabela 10 - Composição química da fase <i>n</i> -hexânica de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	66
Tabela 11 - Composição química da fase diclorometano de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	68
Tabela 12 - Composição química da fase diclorometano de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	69
Tabela 13 - Composição química da fase acetato de etila de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	71
Tabela 14 - Composição química da fase acetato de etila de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	72
Tabela 15 - Composição química da fase hidroalcoólica de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	74
Tabela 16 - Composição química da fase hidroalcoólica de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	74
Tabela 17 - Resultados dos testes de triagem fitoquímica para óleos essenciais, extratos e partições de folhas e galhos de <i>A. parviflora</i> .....	76
Tabela 18 - Halos de inibição resultantes da atividade antimicrobiana dos extratos, partições e do óleo essencial de folhas e galhos de <i>A. parviflora</i> .....	80
Tabela 19 - Atividade antioxidante dos óleos essenciais de folhas e galhos de <i>A. parviflora</i> em função da concentração e do tempo de reação expressos em média $\pm$ desvio padrão da média.....	84
Tabela 20 - Resultados da avaliação de citotoxicidade dos óleos essenciais, extratos e partições de <i>A. parviflora</i> , expressos em percentagem de inibição à 50 mg/mL.....	88
Tabela 21 - Propriedades organolépticas das formulações cosméticas de <i>A. parviflora</i> .....	90
Tabela 22 - Resultados dos parâmetros de avaliação do teste de estabilidade das formulações cosméticas de <i>A. parviflora</i> .....	97

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota biossintética dos principais metabólitos secundários de plantas.....	20
Figura 2 - <i>Aniba parviflora</i> : (a) espécime; (b) folhas e galhos e inflorescência; (c) frutos.....	26
Figura 3 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos sobre células bacterianas (a) e fúngicas (b).....	29
Figura 4 - Mapa de Santarém-PA e circunvizinhança do ponto de coleta de <i>A. parviflora</i> .....	36
Figura 5 - Aparelhos tipo Clevenger utilizados para extração do óleo essencial de <i>A. parviflora</i> .....	37
Figura 6 - Reação do método de sequestro do radical livre DPPH na presença de um antioxidante.....	42
Figura 7 - Metodologia para avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH.....	43
Figura 8 - Picnômetro de vidro utilizado para determinação da densidade relativa das formulações.....	51
Figura 9 - Copo Ford (a) e viscosímetro rotativo analógico (b) utilizados para a determinação da viscosidade das formulações.....	51
Figura 10 - Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	57
Figura 11 - Cromatograma do óleo essencial de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	59
Figura 12 - Cromatograma do extrato etanólico de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	62
Figura 13 - Cromatograma do extrato etanólico de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	64
Figura 14 - Cromatograma da fase <i>n</i> -hexânica de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	65
Figura 15 - Cromatograma da fase <i>n</i> -hexânica de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	67
Figura 16 - Cromatograma da fase diclorometano de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	69
Figura 17 - Cromatograma da fase diclorometano de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	70
Figura 18 - Cromatograma da fase acetato de etila de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	71
Figura 19 - Cromatograma da fase acetato de etila de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	72
Figura 20 - Cromatograma da fase hidroalcoólica de folhas de <i>A. parviflora</i> .....	74
Figura 21 - Cromatograma da fase hidroalcoólica de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	75
Figura 22 - Resultado do teste para esteróides e triterpenos nos extratos brutos de folhas e galhos de <i>A. parviflora</i> .....	76
Figura 23 - Resultados dos testes para flavonóides em <i>A. parviflora</i> : (a) extratos de folhas e (b) extrato de galhos.....	77
Figura 24 - Resultado do teste para saponinas nos extratos brutos de folhas e galhos de <i>A. parviflora</i> .....	77
Figura 25 - Resultados do teste para fenóis e taninos nos extratos etanólicos de folhas e galhos de <i>A. parviflora</i> , depois da reação com FeCl <sub>3</sub> .....	78

Figura 26 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de folhas de <i>A. parviflora</i> . Em (a): halo de inibição promovido pelo OE sobre <i>S. aureus</i> , controles positivo e negativo. Em (b): halo de inibição promovido pelo OE sobre <i>E. faecalis</i> , controles positivo e negativo.....	79
Figura 27 - Determinação da CIM por ensaio de microdiluição para diferentes concentrações de OE sobre <i>S. aureus</i> (a) e <i>E. faecalis</i> (b).....	82
Figura 28 - Atividade antioxidante do extrato bruto de folhas de <i>A. parviflora</i> em função do aumento da concentração da amostra.....	84
Figura 29 - Concentração Eficiente (CE <sub>50</sub> ) do extrato bruto e das partições de folhas de <i>A. parviflora</i> e do antioxidante padrão.....	85
Figura 30 - Atividade antioxidante do extrato bruto de galhos de <i>A. parviflora</i> em função do aumento da concentração da amostra.....	86
Figura 31 - Concentração Eficiente (CE <sub>50</sub> ) do extrato bruto e partições de galhos de <i>A. parviflora</i> .....	86
Figura 32 - Formulações cosméticas após centrifugação: formulações 1, 3, 5 e 7 com separação de fases e formulações 2, 4 6 e 8 sem sinais de instabilidade.....	91
Figura 33 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2 <sup>4+1</sup> obtido para o pH (a linha vertical define 5% de significância estatística).....	92
Figura 34 - Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial fracionado 2 <sup>4+1</sup> obtido para a condutividade (a linha vertical define 5% de significância estatística).....	93
Figura 35 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário 2 <sup>4+1</sup> obtido para viscosidade dinâmica (a linha vertical define 5% de significância estatística).....	94
Figura 36 - Superfície de contorno para a resposta densidade, variando os fatores Base e Glicerina (estatisticamente significativo).....	95
Figura 37 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário 2 <sup>4+1</sup> obtido para a densidade (a linha vertical define 5% de significância estatística).....	96
Figura 38 - Superfície de contorno para a resposta densidade, variando os fatores Base e Glicerina (estatisticamente significativo).....	96
Figura 39 - Formulação F2 submetida ao teste de estresse térmico (a); Formulação F8 submetida ao estresse térmico (b).....	98
Figura 40 - Formulações F2, F4, F6 e F8 com variação de coloração após serem submetidas ao ciclo gela-degela.....	99
Figura 41 - Formulações F2, F4, F6 e F8 apresentando endurecimento da superfície após serem submetidas ao estresse térmico.....	100

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AA%	Atividade Antioxidante em Porcentagem
Abs	Absorbância
ATCC	American Type Culture Collection
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMH	Ágar Mueller Hinton
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
BHT	Butil-hidróxi-tolueno
CCCD	Coleção de Cultura CEFAR Diagnóstica
CE <sub>50</sub>	Concentração Eficiente a 50%
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal a 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Caldo Nutriente
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBF	Extrato Bruto Etanólico das Folhas
EBG	Extrato Bruto Etanólico dos Galhos
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
NIST	National Institute of Standards and Technology
OE	Óleo Essencial
pH	Potencial Hidrogeniônico
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequenas Empresas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UEA	Universidade do Estado do Amazonas

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 COSMÉTICOS .....	18
2.1.1 Óleos Essenciais .....	19
2.1.2 Extratos Vegetais .....	22
2.2 FAMÍLIA LAURACEAE .....	23
2.2.1 Gênero <i>Aniba</i> .....	24
2.2.2 <i>Aniba parviflora</i> (Meisn) Mez. ....	25
2.3 PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS PARA CONTROLE MICROBIANO .....	28
2.4 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES .....	32
2.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE .....	34
3.1 OBJETIVO GERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	36
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	36
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	36
4.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE <i>A. parviflora</i> .....	38
4.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS .....	38
4.4.1 Material Microbiológico .....	38
4.4.2 Padronização do Inóculo .....	39
4.4.3 Ensaio Antimicrobiano Qualitativo .....	39
4.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	40
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	41
4.5.1 Preparo de Soluções Estoque das Amostras .....	41
4.5.2 Preparo das Soluções Padrão de Ácido Ascórbico .....	42
4.5.3 Preparo da Solução de DPPH .....	42
4.5.4 Realização da Análise de Atividade Antioxidante .....	42
4.5.5 Avaliação dos Resultados .....	43
4.5.6 Análise Estatística .....	43
4.6 CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS EXTRATOS .....	44
4.6.1 Linhagem Celular .....	44
4.6.2 Preparo das Amostras .....	44

4.6.3 Ensaio do Alamar Blue.....	44
4.6.4 Análise dos Resultados .....	45
4.7 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS EXTRATOS.....	45
4.7.1 Determinação dos Grupos Químicos dos Extratos de <i>A. parviflora</i> .....	45
4.7.2 Análise Cromatográfica dos Óleos Essenciais e dos Extratos de <i>A. parviflora</i> .....	47
4.8 FORMULAÇÃO COSMÉTICA.....	47
4.8.2 Preparo das Emulsões .....	48
4.8.3 Análise Macroscópica das Formulações .....	49
4.8.4 Teste Preliminar de Estabilidade.....	53
4.8.5 Análise dos Resultados .....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS DE <i>A. parviflora</i> .....	55
5.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>A. parviflora</i> .....	55
5.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES DE <i>A. parviflora</i> .....	60
5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	75
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	79
5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	83
5.6 CITOTOXICIDADE.....	87
5.7 FORMULAÇÃO COSMÉTICA.....	89
5.7.1 Avaliação das Propriedades Organolépticas .....	89
5.7.2 Análise de Centrifugação.....	90
5.7.3 Avaliação do pH.....	91
5.7.6 Avaliação da Densidade .....	95
5.7.7 Teste de Estabilidade Preliminar das Formulações Cosméticas de <i>A. parviflora</i> . .....	97
CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS .....	104



## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de compostos naturais de origem vegetal em produtos alimentícios, cosméticos e medicamentos vem de longa data. Derivados de plantas há tempos são utilizados na medicina tradicional, na forma de infusões e decocções, para a prevenção e tratamento de inúmeras patologias (LUO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013), entre as quais estão as doenças infecciosas causadoras de morbimortalidade (MORENS, FOLKERS e FAUCI 2008; RADULOVIC et al., 2013) e doenças neurodegenerativas (SAHOO et al., 2013). De fato, compostos biologicamente ativos oriundos de espécies de plantas podem representar novas fontes para o desenvolvimento de produtos importantes nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, tais como, antimicrobianos e antioxidantes (BENBELAID et al., 2013).

Neste sentido, muitas plantas existentes nos biomas brasileiros são tradicionalmente utilizadas como medicamentos naturais por populações locais no tratamento de inúmeras doenças tropicais, como, esquistossomose, malária, leishmaniose e ainda para infecções bacterianas e fúngicas (ALVES et al., 2000; OLIVEIRA, KFFURI e CASALI, 2010). Entretanto, ainda são poucos os dados sobre as propriedades biológicas existentes em relação às plantas que compõem a flora brasileira, sejam elas nativas ou exóticas, ressaltando assim a importância de se gerar novos conhecimentos.

Na Região Amazônica, as plantas que compõem sua rica biodiversidade representam uma alternativa econômica para o desenvolvimento sustentável da região. Óleos essenciais e extratos obtidos de diversas espécies vegetais são apontados como possuidores de inúmeros potenciais e propriedades biológicas. Assim, os produtos oriundos de plantas da Amazônia, entre eles, óleos e extratos, podem ser utilizados como matéria-prima nas indústrias para diversos fins.

Em se tratando da indústria de cosméticos, o crescimento deste setor tem valorizado bastante a pesquisa de novas matérias-primas naturais, especialmente quando se trata da utilização de plantas amazônicas (FRANQUILINO, 2006a). A utilização de ativos naturais para fins cosméticos tem sido frequente, em vista do interesse do mercado nacional e internacional por estes, principalmente, se a matéria-prima em questão apresenta estudos comprovando sua segurança e eficácia, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável (FRANQUILINO, 2006b).

Dessa forma, o estudo do potencial biológico de óleos essenciais e de extratos de *Aniba parviflora* para sua aplicação em um fitocosmético, contribui para a descrição da

composição química e propriedades biológicas de uma planta amazônica. Fornece ainda, uma perspectiva de aproveitamento sustentável de recursos naturais da região, de forma a demonstrar a importância da preservação dos ativos naturais nela existentes.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 COSMÉTICOS

Um cosmético é definido no Brasil, conforme a Câmara Técnica de Cosméticos (Catec) na Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano: pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, e ou corrigir odores corporais, protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2008).

Fitocosméticos, por sua vez, são cosméticos que contêm ativo natural de origem vegetal, seja este um extrato, óleo ou óleo essencial, e do qual a ação define a atividade do produto. Este deve passar por todas as etapas de pesquisa: proposição, criação e desenvolvimento, que devem incluir testes de estabilidade para assegurar a atividade durante toda sua vida útil (ISAAC et al., 2008).

Na área cosmética, formulações do tipo emulsões representam uma classe de cosméticos de uso tópico, que apresentam como grande desafio a otimização da permeação de substâncias ativas no tecido cutâneo (SANTOS et al., 2011). As emulsões constituem-se em sistemas heterogêneos formados por uma mistura de dois líquidos imiscíveis, sendo estes, uma fase aquosa ou hidrofílica, e uma fase oleosa ou lipofílica, sendo uma das fases dispersa na outra. O terceiro componente, o emulsificante, é utilizado para estabilizar o sistema unindo as duas fases (MORAIS e BURGUES, 2012).

De acordo com a natureza da fase dispersante ou externa das emulsões, estas podem ser classificadas em dois tipos: emulsão água em óleo (A/O), ou seja, a que contém água como fase dispersa sob a forma de pequenas partículas na fase oleosa; e óleo em água (O/A), a qual é composta pela dispersão de material oleoso na fase aquosa (SHARMA e SHAH, 1985).

Outros componentes configuram a preparação das emulsões, dentre eles, os tensoativos, os emolientes, conservantes e agentes umectantes.

Ingredientes vegetais utilizados na produção de cosméticos incluem uma grande variedade de preparações, entre eles, extratos, tinturas, ceras, óleos, óleos essenciais, assim como componentes purificados, que incluem vitaminas antioxidantes ou outras substâncias com atividade biológica (ALLEMANN e BAUMANN, 2009). Os vegetais fornecedores destes ingredientes incluem desde aqueles utilizados na dieta (cereais, frutas, legumes, raízes,

bulbos e especiarias), ervas utilizadas na medicina popular, assim também como plantas exóticas e seus componentes (ANTIGNAC et al., 2011). Atualmente, a expansão da procura por produtos naturais, reorientou parte da indústria de cosméticos para extratos e óleos essenciais (SEBRAE, 2008).

### **2.1.1 Óleos Essenciais**

O metabolismo vegetal constitui-se em um conjunto de reações químicas que ocorre constantemente nas células vegetais. No metabolismo primário, as reações realizadas por enzimas específicas da rota metabólica dos compostos vegetais visam, em primeiro plano, o aproveitamento dos nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais das células. Estes, essenciais para a vida do vegetal, são encontrados em todas as suas células, sendo formados por açúcares simples, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (SIMÕES et al., 2006).

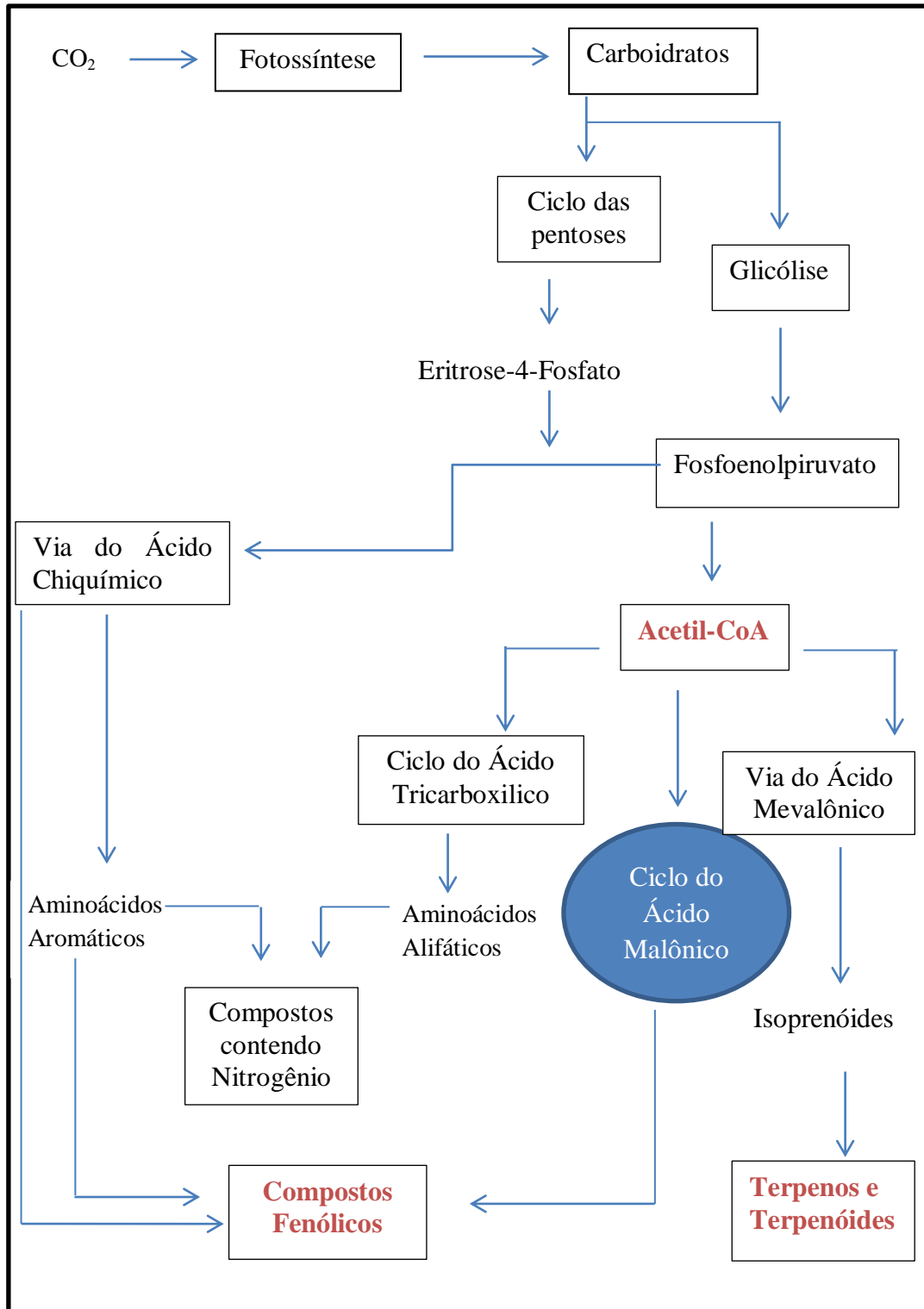
A produção, transformação e acumulação de outras substâncias que não estão envolvidas de forma direta na manutenção da vida do vegetal, são chamadas de metabolismo secundário (SIMÕES et al., 2006). Estes compostos, apesar de não fazerem parte das funções vitais da célula vegetal, como os metabólitos primários, desempenham um papel fundamental na adaptação da planta ao ambiente (BOURGAUD et al., 2001). É no grupo de metabólitos secundários que se encontram os óleos essenciais (OE).

Os OE, também conhecidos como óleos voláteis, são produtos aromáticos obtidos de diferentes órgãos vegetais. Estes compostos encontram-se armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares, e podem estar estocados em diferentes órgãos vegetais, como as flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes. Estes óleos são compostos por misturas de substâncias voláteis lipofílicas e líquidas. Podem apresentar ainda características como aroma agradável e intenso (BAKKALI et al., 2008).

Os OE consistem em uma mistura complexa de compostos, que pode conter cerca de 2 a 60 componentes em concentrações diferentes. Nesta mistura dois ou três componentes podem ocorrer em concentrações bastante elevadas (20 a 70%) em relação a outras substâncias presentes em menores quantidades. São geralmente estes componentes principais que determinam as propriedades biológicas dos OE (BAKKALI et al., 2008). As rotas biossintéticas das quais os metabólitos são formados constituem as vias mevalonato e chiquimato (Figura 1). Os compostos formados por essas vias estão dispostos em dois grupos:

o grupo dos terpenos ou terpenóides e outro de fenilpropanóides (CROTEAU et al., 2000; BAKKALI et al., 2008).

Figura 1 - Rota biossintética dos principais metabólitos secundários de plantas.



Fonte: Taiz e Zeiger (2004).

Substâncias como os monoterpenos e os sesquiterpenos são originadas da rota do ácido mevalônico, enquanto os fenilpropanóides são provenientes da rota do ácido chiquímico. As vias biossintéticas de terpenos e derivados de fenilpropânicos geralmente são separadas em plantas, mas podem coexistir em algumas, assumindo uma das vias principais, a do ácido chiquímico a partir dos carboidratos, ou via melavonato (BAKKALI et al., 2008). Nos OE podem ser encontrados também ácidos orgânicos de baixo peso molecular e cumarinas (SIMÕES et al., 2006).

Os terpenos são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos. Sendo a classificação dessa classe feita de acordo com a quantidade de unidades de isopreno: hemiterpenóides (C5); monoterpenóides (C10); sesquiterpenóides, (C15); diterpenóides, (C20); triterpenóides, (C30); e tetraterpenóides, (C40). Estes compostos desempenham diferentes funções nas plantas, fazendo parte de tecidos fotossintetizantes, participando da polinização, atuando como agentes de defesa e feromônio, germinação de sementes e pigmentos (PERES, 2004).

Os fenilpropanóides, por sua vez, são substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos. Através da junção do ácido chiquímico, precursor dos fenilpropanóides, e de uma molécula de fosfoenolpiruvato ocorre a formação do ácido corísmico. Este, por sua vez, é responsável por gerar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano, que são precursores de vários alcalóides, importante classe de compostos com inúmeras atividades biológicas descritas (PERES, 2004).

Muitos grupos de pesquisa já demonstraram que os OE e seus componentes majoritários possuem um amplo espectro de atividades biológicas com grande potencial em vários campos da química dos alimentos e farmacêutica (CRISTANI et al., 2007), sendo estas propriedades atribuídas à presença de misturas de compostos, formados principalmente pelos terpenóides e fenilpropanóides (SCHELZ et al., 2010).

A extração de OE pode dar-se através de diferentes técnicas, e o método de escolha varia conforme a localização do óleo na planta e a finalidade do uso (SIMÕES et al., 2006). Elas podem ser por: Enfleurage, método de extração utilizado para extrair óleo essencial de pétalas de flores; Extração com Solventes Orgânicos, onde o material vegetal é imerso em solvente químico adequado (hexano, acetona, ou outros derivados de petróleo) e separado quimicamente pela destilação em temperaturas específicas, que causam somente a condensação do óleo, livre dos solventes; Prensagem a frio, empregado para extração de óleos essenciais de frutos cítricos; Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, onde o CO<sub>2</sub> é primeiramente

liquefeito através da compressão, depois aquecido a uma temperatura superior ao seu ponto crítico, 31°C, e pressurizado a uma pressão crítica; e pelo método de Hidrodestilação por Arraste a Vapor.

A Hidrodestilação consiste na extração de óleos essenciais através de vapor seguida da condensação do óleo. Nesta técnica, pelo efeito da temperatura do vapor em fluxo ascendente, ocorre o rompimento das células odoríferas da planta aromática, em decorrência do aumento da pressão interna das células, devido à vaporização parcial do óleo em seu interior. O óleo em contato com o vapor é arrastado para a parte superior do extrator até o condensador e, dessa forma, água e óleo essencial em emulsão são conduzidos por gravidade ao vaso de decantação, onde ocorre a separação das fases.

### **2.1.2 Extratos Vegetais**

Extratos vegetais são preparações concentradas obtidas de folhas, galhos ou outra parte da planta, cuja consistência pode ser líquida, sólida ou intermediária (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), usando como solvente etanol, água ou uma mistura entre estes, ou ainda, outro líquido extrator apropriado ao uso (SCHULZ et al., 2002). Após o processo de extração, o solvente pode ser evaporado, em rotaevaporador, e o resíduo liofilizado. A preparação destes dá-se por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando o solvente adequado, em função da classe de substâncias que se pretende extrair, variando de polaridade e acidez. Após a extração, os materiais indesejáveis são então eliminados (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

A utilização de extratos vegetais na medicina popular para o tratamento de inúmeras doenças é relatado desde muito tempo. Extratos de casca de pinheiro (*Pinus pinaster*), utilizados por índios nativos do Quebec, foram utilizados pelo explorador francês Jacques Cartier e sua tripulação, na forma de chá das cascas, para a prevenção do escorbuto, doença causada pela deficiência de vitamina C. Mais tarde, o professor Jack Masquelier determinou que o extrato da casca de pinheiro apresentava-se rico em biflavonóides, que por sua vez, possuem atividade antioxidante contra radicais livres (MAIMOONA et al., 2011).

Dessa forma, extratos de plantas superiores foram relatados por muitos grupos de pesquisa como possuidores de inúmeras propriedades farmacológicas, tais como, atividade antibacteriana (BRANTNER e GREIN, 1994; MARTINS et al., 2013), antifúngica (OKIGBO e OGBONNAYA, 2006; VOGTA et al., 2013), anti-inflamatória (RAO et al., 2012) entre outras. Neste sentido, a seleção de extratos brutos de plantas pelo rastreamento de suas atividades

biológicas, pode ser uma etapa bem sucedida para a busca de compostos puros, isolados a partir de produtos naturais (UNIYAL et al., 2006).

Os extratos vegetais podem ser utilizados em diferentes preparações cosméticas e, dependendo da classe química de seus compostos, podem atribuir diferentes atividades ao produto. Para a obtenção do extrato glicólico, que é comumente utilizado em preparações cosméticas, o material deve ser suspenso em propilenoglicol, que possui grande compatibilidade com as formulações farmacêuticas que são usadas como veículos e excipientes cosméticos. A padronização do extrato estabelece a relação ideal entre droga vegetal e extrato, e a relação entre extrato e marcador, sendo a utilização de extratos padronizados importante para assegurar a eficácia de um fitocosmético, garantindo-lhe segurança e qualidade (ISAAC et al., 2008).

A biodiversidade amazônica destaca-se por possuir plantas aromáticas com inúmeros potenciais biológicos, sendo que seus óleos e extratos podem ser empregados em diversas indústrias. Neste sentido, espécies da família Lauraceae, sobressaem-se, por seu significativo potencial biológico e econômico, comprovados em diversos estudos que foram e ainda são realizados com espécies desta família (MAIA e ANDRADE, 2007).

## 2.2 FAMÍLIA LAURACEAE

Lauraceae constitui uma família com aproximadamente 2500 espécies, incluídas em 52 gêneros. Nas Américas ocorrem cerca de 29 gêneros e 900 espécies. Caracteriza-se como uma família de plantas predominantemente arbóreas, variando de arbustos a árvores de dossel. Arbustos escandentes ocorrem raramente, sendo o gênero *Cassytha* uma erva parasita com apenas uma espécie neotropical. A grande diversidade das Lauraceas ocorre em terras baixas da Amazônia e América Central (GOTTLIEB, 1972; RIBEIRO et al., 1999).

A utilização de espécies desta família é frequentemente relatada desde os tempos mais antigos aos mais atuais. As folhas de louro, *Laurus nobilis* foram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para produzir grinaldas, utilizadas para coroar atletas e guerreiros vitoriosos. A procura por esses produtos são relatadas ainda em outros contos, entre estes a procura de soldados espanhóis, desde os Andes até o estuário do rio Amazonas, por uma árvore-canela, provavelmente casca preciosa (*Aniba canelilla*) (GOTTLIEB, 1972).

Plantas da família Lauraceae têm sido reconhecidas ainda por serem difíceis de identificar. Fatores que contribuem para isso incluem o fato de muitas coleções serem estéreis, ou seja, por não possuírem caracteres florais e frutificação, importantes para a identificação.



A falta de representantes em herbários é também outro fato que contribui para este problema (BURGER, 1988; WERFF, 1991).

O odor presente nas cascas e também em folhas de espécimes de Lauraceae é a principal característica para reconhecer a família no campo, pois são poucas as espécies que não o possuem. Alguns, inclusive, são tão marcantes que permitem reconhecer a espécie, variando quanto ao tipo de cheiro. Por exemplo, um odor forte e fétido lembrando peixe ou gengibre é característico de espécies como *Licaria canella*, *Licaria chrysophylla* e *Licaria guianensis*. Outras como *Aniba rosaeodora* e *Licaria puchury-major* possuem um odor forte e agradável de perfume, *Aniba canelilla* de cravo e *Endlicheria citriodora* de limão (RIBEIRO et al., 1999).

As muitas espécies dessa família são de grande importância econômica no mundo todo, sendo estas utilizadas por sua madeira, frutos cosmetíveis, gordura nas sementes, como especiarias, entre outros. Espécies utilizadas em grande escala incluem o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e o louro (*Laurus nobilis*). Cascas e frutos de algumas espécies como *Dicypellium caryophyllaceum* são usadas como condimentos, outras como *Licaria puchury* e *Aniba canelilla* são utilizadas para preparo de chás. Algumas espécies são ainda exploradas na extração de madeira, na Amazônia, por exemplo, a itaúba (*Mezilaurus* spp.) é frequentemente utilizada na construção de embarcações em razão de sua durabilidade e resistência (RIBEIRO et al., 1999; MARQUES, 2001).

Outras espécies como a canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) e o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) são fontes de substâncias aromáticas para perfumaria (MARQUES, 2001). Nesse sentido, espécies do gênero *Aniba* destacam-se entre as de grande importância econômica, principalmente na indústria de perfume.

### 2.2.1 Gênero *Aniba*

O gênero *Aniba* é representado por árvores produtoras de óleos voláteis, presentes em todos os seus órgãos vegetais, e que são inclusive extremamente importantes na indústria química (MORAIS et al., 1971; MARQUES, 2001). Entre elas, *Aniba rosaeodora* Ducke, que possui em seu óleo uma alta concentração de linalol, que é um composto de grande valor na indústria de perfumaria. A maior parte das espécies desse gênero encontra-se na região Amazônica (MAIA e ANDRADE, 2007).

Algumas espécies de *Aniba* têm sido ainda referidas como medicinais e ou possuidoras de propriedades farmacológicas, entre elas a *A. rosaeodora* cujo óleo essencial possui

potencial antimicrobiano (LOBATO et al., 1989; HAMMER et al., 1999; SIMIC et al., 2004) e atividade larvicida (SOUZA et al., 2007); *A. heringerii* apresenta potencial antifúngico (TÓFOLI et al., 2012); *A. canelilla* possui atividade antioxidante (SILVA et al., 2007; SILVA, 2012) e *A. riparia*, espécie típica da região amazônica cujo extrato obtido dos frutos e cálices possui atividade antimicrobiana (BARBOSA et al., 1988).

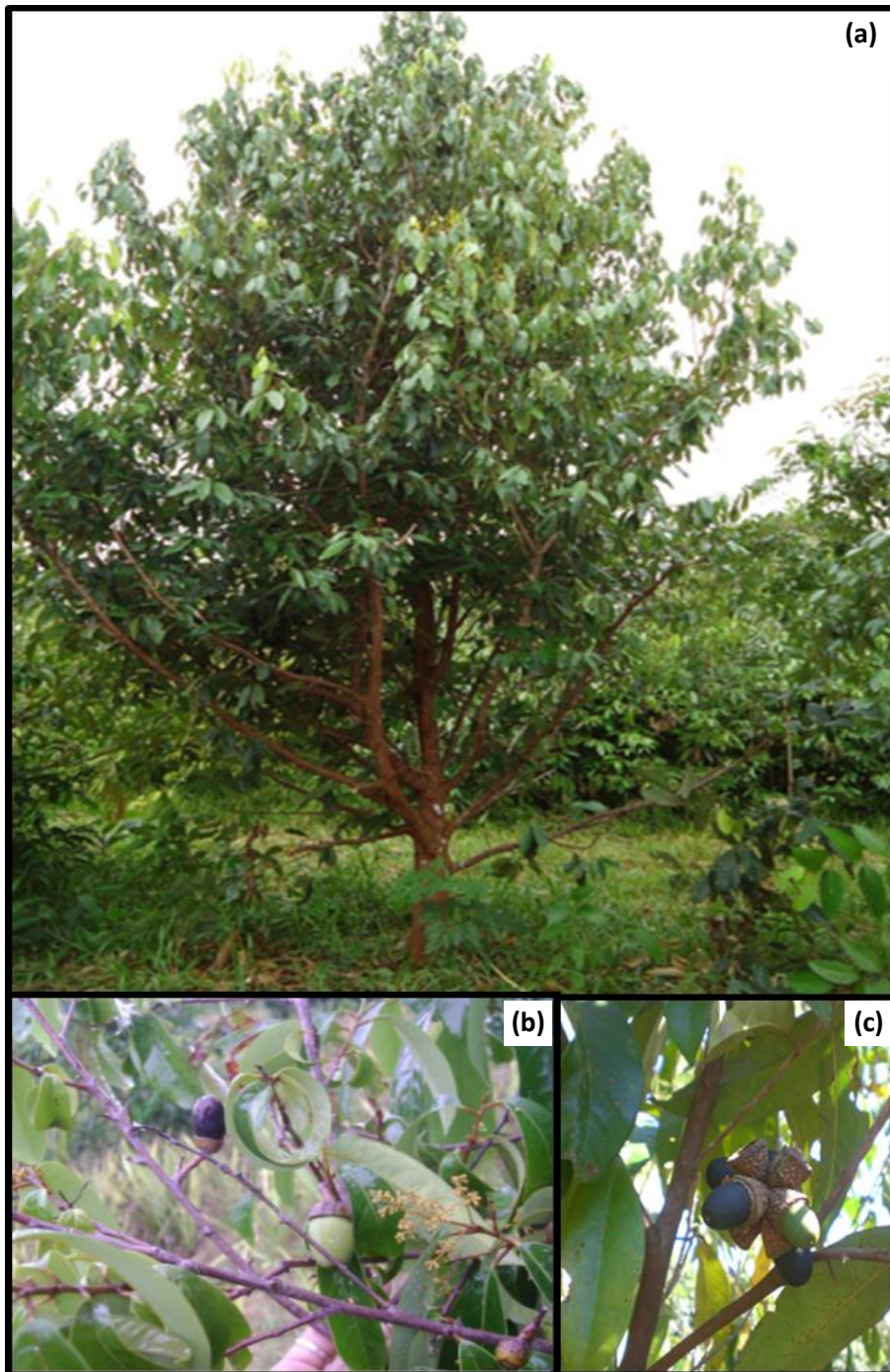
Alguns autores como Morais et al. (1971) e Gottlieb e Kubitzki (1981), classificam as cerca de 40 espécies de *Aniba* ocorrentes no Brasil em três grupos, de acordo com a natureza química do óleo essencial e seus constituintes predominantes: o grupo linalol, representado por *A. rosaeodora* Ducke e *A. duckei* Kosterm.; o grupo benzoato de benzila, cujos representantes incluem *A. burchellii* Kosterm., *A. firmula* (Nees & Mart.) Mez., *A. guianensis* Aubl., *A. fragrans* Ducke, *A. gardneri* (Meiss.) Mez., *A. parviflora* (Meisn) Mez. e *A. permollis* (Nees) Mez.; e o grupo alilbenzeno que compreende *A. canelilla* Mez., *A. hostimanniana* Mez. e *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm.

As espécies pertencentes a esse gênero são frequentemente de difícil identificação, considerando-se apenas caracteres morfológicos, principalmente vegetativos, devido à extrema semelhança que existe entre eles. *Aniba parviflora*, em particular, apresenta grande dificuldade de identificação, principalmente em relação à espécie *A. rosaeodora*.

### **2.2.2 *Aniba parviflora* (Meisn) Mez.**

*Aniba parviflora* é uma planta aromática da família Lauraceae, nativa da região amazônica, característica de solos argilosos e não inundáveis. A espécie constitui em árvores medianas de aproximadamente 30 m sendo frequente na Bacia Amazônica e Guianas (RIBEIRO et al., 1999). Morfologicamente caracteriza-se por pecíolos e ramos delgados, folhas coriáceas com base cuneada, secundárias de 8-16 pares, casca pardo-amarelada, inflorescência lateral de 2,5 cm de comprimento, multifloral, de flores pequenas, cúpula do fruto espessa, ferrugínea, fruto do tipo baga, de aproximadamente 25x20 mm, de cor vinho-escuro quando maduro (Figura 2) (RIBEIRO et al., 1999; MATTOSO, 2005). A espécie *A. parviflora* tem como sinónímia a *A. fragrans* Ducke (KUBITZKI e RENNER, 1982).

Figura 2 - *Aniba parviflora*: (a) espécime; (b) folhas, galhos e inflorescência; (c) frutos.



Fonte: Batista (2014).

Na região amazônica, ramos e madeira de *A. parviflora*, popularmente conhecida como macacaporanga ou louro rosa, quando secos, são transformados em pó e utilizados como sachês aromatizantes (CORRÊA, 1974). Sua casca é ainda comercializada no mercado Ver-O-Peso em Belém do Pará, e sua infusão é utilizada em “banhos-de-cheiro” comum em festejos de São João (MATTOSO, 2005).

*A. parviflora* é uma espécie frequentemente confundida com o pau-rosa por apresentar características morfológicas semelhantes a esta espécie. Entretanto, ambas apresentam diferenças em relação à composição química e ao aroma. Em estudos para avaliar os óleos essenciais e extratos de folhas de *A. parviflora* e *A. rosaeodora* através das técnicas de CG-EM (cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa) e de NMR-HRMAS (Nuclear Magnetic Resonance - High Resolution Magic Angle Spinning) obtiveram-se perfis diferentes, indicando que estas são distintas quimicamente (BARCELOS et al., 2012). Apesar de *A. parviflora* conter linalol, a análise olfativa do óleo essencial de folhas de pau-rosa e macacaporanga, realizado através de cromatografia gasosa enantioseletiva acoplada à olfatometria (Es-GC-O, Enantioselective Gas Chromatography-Olfactometry), comprovou que ambos são bem distintos em relação ao aroma (BARATA et al., 2003).

Em trabalho realizado para avaliar a composição química do óleo essencial de *A. parviflora*, utilizando cromatografia gasosa bidimensional com espectrometria de massa quadrupolar de rápida varredura, Tranchida et al. (2008) identificaram a presença de 87 componentes no óleo da planta. Em outro estudo, Pereira (2012), utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, encontrou 63 compostos voláteis no óleo essencial de *A. parviflora*, tendo o linalol como componente majoritário com média de percentual relativo nos períodos seco e chuvoso de 34,63 e 27,83%, respectivamente. Os demais componentes tiveram concentrações inferiores a 7%, entre eles o  $\beta$ -felandreno e o espatulenol, que apresentaram as maiores concentrações em relação aos demais.

O linalol, um dos componentes majoritários do OE de *A. parviflora*, é um composto de alto valor biológico e econômico. Tem sido descrito como possuidor de inúmeras propriedades biológicas, entre eles, ação anticâncer (LOIZZO et al., 2008), bactericida (BAGAMBOULA et al., 2004) e fungicida (ALVIANO et al., 2005). Além disso, o mesmo possui uma grande aplicação no setor de perfumaria, sendo necessária sua produção em quantidades sempre crescentes (SILVA et al., 2003).

Em estudos preliminares foi demonstrado que o óleo essencial de *A. parviflora* possui potencial econômico no setor de perfumaria (MAIA et al., 2001). Além disso, apesar do potencial do óleo essencial de *A. parviflora* ter sido citado para uso em cosméticos e materiais de limpeza, estudos sobre o potencial biológico e biotecnológico de *A. parviflora* ainda são escassos. Dessa forma, faz-se necessário a realização de estudos que exaltem o potencial dessa planta nativa da região amazônica, que pode beneficiar o desenvolvimento da região através de sua exploração consciente.

### 2.3 PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS PARA CONTROLE MICROBIANO

A maioria das plantas produz compostos que desempenham funções fundamentais em sua interação com o meio ambiente. Tais compostos pertencem ao metabolismo vegetal secundário e possuem importância na sobrevivência e propagação do vegetal. Funcionam como sinais químicos que permitem à planta respostas a estímulos ambientais, apresentam atividade alelopática, alguns fornecem proteção contra a radiação solar ou contribuem para a dispersão de pólen e sementes, ou ainda protegem o vegetal do ataque de herbívoros, micro-organismos patogênicos ou competidores (RAVEN et al., 2001; BOURGAUD et al., 2001). Tais compostos são comumente responsáveis pelas inúmeras atividades biológicas apresentadas por diversas espécies de plantas, entre elas, a atividade antimicrobiana.

As plantas superiores e aromáticas, tradicionalmente utilizadas na medicina popular e na conservação de alimentos, mostraram-se inibidoras de bactérias, fungos e leveduras (HULIN et al., 1998). Grande parte das suas propriedades biológicas são atribuídas aos óleos essenciais produzidos pelo seu metabolismo secundário. Dessa forma, óleos essenciais e extratos de inúmeras espécies de plantas são capazes de controlar os micro-organismos que estão frequentemente associados a infecções de pele (ADAM et al., 1998), entre outros micro-organismos associados como causadores de infecção hospitalar (BEGNAMI et al., 2010) e deterioração de alimentos (ALBAYRAK et al., 2010), incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GALLI et al., 1985), leveduras e fungos filamentosos.

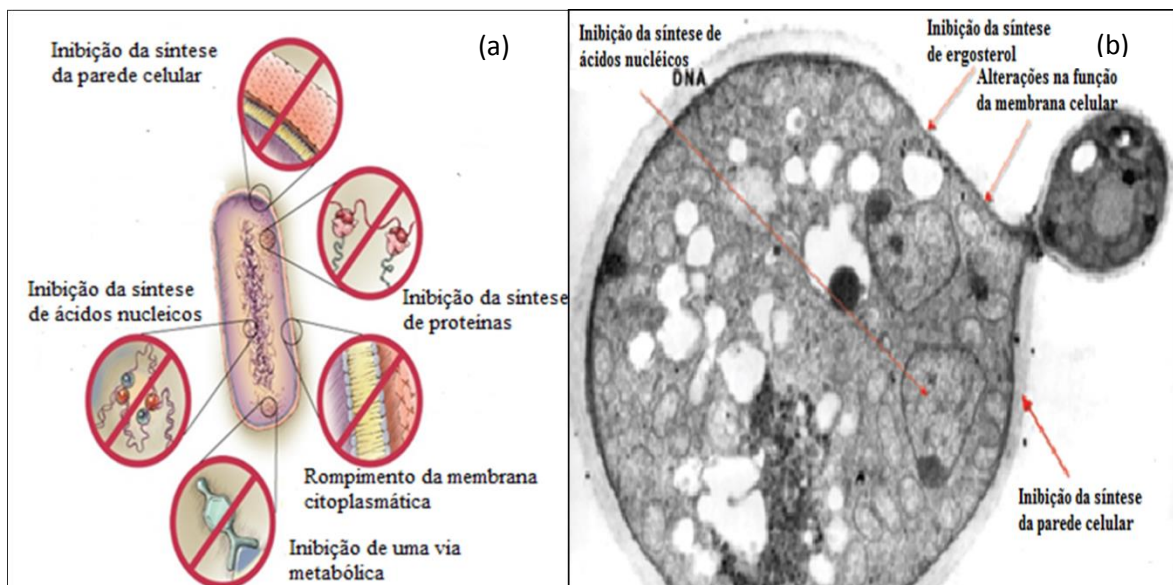
Os principais grupos de compostos possuidores de propriedades antimicrobianas extraídos de plantas incluem os terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonoídes), taninos e cumarinas (SIMÕES et al., 2006; RESCHKE et al., 2007). Essa variedade de compostos é responsável pelo interesse de pesquisas com plantas para a produção de novos antimicrobianos (COWAN, 1999). Os compostos ativos encontrados em algumas plantas possuem ação antisséptica como, por exemplo, o timol e o carvacrol, o eugenol e o isoeugenol, assim como o  $\alpha$ -terpinelol, e em alguns casos, os terpenos têm maior poder antibacteriano que outros compostos (KNOBLOCH et al., 1989).

Os compostos isolados de plantas são substâncias com estrutura química bem diferenciada dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias e fungos. Estes produtos podem apresentar diversos sítios de atuação, podendo atuar no metabolismo intermediário, ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo

nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo secundário (LIMA, 2001).

Em geral, a forma de atuação dos antimicrobianos está relacionada com as características do micro-organismo, sejam eles bactérias ou fungos. Antimicrobianos que atuam sobre as células bacterianas podem interferir na parede celular, causando alterações e defeitos estruturais e interferindo no processo de replicação; inibindo a síntese de proteínas, por alterações no ribossoma; inibindo a síntese de ácidos nucleicos, interferindo na replicação e transcrição; alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática; ou ainda interferindo no metabolismo dos folatos (TORTORA et al., 2005). Já os agentes antifúngicos, podem atuar ligando-se ao ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana fúngica e causando a perda de constituintes citoplasmáticos; sobre enzimas do citocromo fúngico, alterando a síntese de ergosterol; ou ainda na parede celular causando um desequilíbrio osmótico na célula fúngica (MARTINEZ, 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos sobre células bacterianas (a) e fúngicas (b).



Fonte: [www2.bakersfieldcollege.edu](http://www2.bakersfieldcollege.edu) (2013).

Fonte: Adaptado de Madigan et al. (2010).

Em tratando-se de cosméticos, um dos grandes problemas relacionados com a qualidade destes produtos, principalmente em seu estado cru, é a sua contaminação microbiológica, que pode, por sua vez, tornar-se um sério risco para os usuários de plantas medicinais (TASSANEEYAKUL et al., 2004). Sendo assim, o potencial antimicrobiano da planta que detém o princípio ativo é de grande valor.

Na indústria cosmética o *Challenge test* ou teste desafio é utilizado para verificar se o agente conservante da formulação está adequado (ANVISA, 2004). No teste, é avaliada a atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias. As bactérias que compõem o *Challenge test* são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. São descritas a seguir características das bactérias que são utilizadas no teste desafio e outras de importância médica para infecção de pele e mucosas, e de interesse para a indústria de cosméticos.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

É um bacilo Gram-negativo aeróbio, tipicamente causador de infecções hospitalares, urinárias e septicemias, sendo os pacientes com queimaduras, cateterismo vesical, fibrose cística, diabetes e neutropenia, os mais susceptíveis (THOMSON e BONOMO, 2005; MARRA et al., 2006). Uma das características mais destacadas desta espécie é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

### ***Escherichia coli***

Bactéria Gram-negativa aeróbica que habita o trato intestinal de humanos e animais, apresentando diversos sorotipos e diferentes fatores de virulência. Cada sorotipo é capaz de causar diferentes infecções: entéricas, urinárias e hospitalares (MARRS et al., 2005).

### ***Staphylococcus aureus***

São cocos Gram-positivos que colonizam naturalmente a pele, as mucosas e o trato respiratório superior, mas que são incapazes de invadir pele e mucosas íntegras. A infecção por *S. aureus* ocorre quando este patógeno encontra uma porta de entrada, pele e mucosas não íntegras, secretando enzimas e toxinas lesivas às membranas, capazes de destruir as células de defesa do corpo (RUBIN e FARBER, 1999). Esta bactéria secreta também exotoxinas e enzimas causadoras de infecções na pele como impetigo, furúnculos e abscessos subcutâneos, podendo causar inclusive infecções sistêmicas como síndrome do choque tóxico e septicemias (IWATSUKI et al., 2006).



### ***Enterococcus faecalis***

Esta espécie é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo frequentemente associado a infecções intra-abdominal e pélvica, bem como outras infecções mais graves como bacteremias, meningite, endocardite, infecções urinárias e odontológicas (BABALOLA et al. 2004). Os *Enterococcus* podem sobreviver até 07 dias em superfícies, sendo naturalmente resistentes a vários antimicrobianos (NOSKIN et al., 1995; NEUMAN et al., 1998).

### ***Proteus vulgaris***

Bactéria Gram-negativa, que habita o trato intestinal de humanos e animais, podendo ser encontrada em água no solo e matéria fecal. A patogenicidade deste bacilo está relacionada com o desenvolvimento de fatores de virulência, podendo causar infecções urinárias, respiratórias e septicemia (FALEH, 2011).

### ***Salmonella enterica***

Bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, causadora de infecção em uma grande variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis. Em humanos, é caracterizada como grande causadora de infecções em todo o mundo anualmente, desencadeando sintomas como gastroenterite e diarreia, e febre tifóide, doença sistêmica grave. A virulência varia de acordo com o sorotipo e a susceptibilidade do hospedeiro (CHUANG et al., 2009).

Assim como as bactérias, os fungos (leveduras e bolores) estão associados a contaminação de cosméticos e, dessa forma, também devem fazer parte da avaliação da segurança destes produtos (CAMPANA et al., 2006). Entre os fungos que compõem o Teste Desafio do Sistema Conservante (*Challenge test*) está a levedura *Candida albicans*. Além de fazer parte dos testes de qualidade microbiológica dos produtos cosméticos, esta levedura é um importante patógeno humano, sendo suas características descritas a seguir.



### *Candida albicans*

A espécie *C. albicans* é dimórfica, o que caracteriza sua ocorrência tanto em formas leveduriformes no estado saprofítico, quanto em formas filamentosas, observadas em processos patogênicos. Apresenta grande distribuição no meio ambiente ocupando diversos habitats, o que não acontece com outras espécies do gênero que têm distribuição mais restrita a poucos nichos ecológicos (TORTORA et al., 2005). Em seres humanos, a colonização por esses fungos pode ocorrer durante ou logo após o nascimento, podendo estes apenas compor a microbiota humana normal do trato gastrointestinal e das mucosas oral e vaginal. No entanto, também podem provocar infecções sistêmicas graves, o que vem adquirindo grande importância clínica, principalmente para pacientes imunocomprometidos e ainda devido à existência de cepas resistentes às drogas antifúngicas (BROOKS et al., 2000).

#### 2.4 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

O metabolismo celular normal do corpo é responsável pela produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos severos a biomoléculas celulares, entre estas as moléculas de DNA e RNA (LOUREIRO et al., 2002). Estes radicais são compostos que possuem um elétron não emparelhado girando na camada periférica em torno do núcleo.

O conjunto de radicais livres gerados a partir do oxigênio é chamado de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), sendo que o dano causado às moléculas por estes compostos, deve-se à extração de elétrons para alcançar assim sua estabilidade. Os EROs correspondem às principais fontes de catalisadores primários que iniciam a oxidação *in vivo* e *in vitro*. Este processo leva a célula a um estresse oxidativo, que pode resultar em diversas desordens fisiológicas e doenças (CHANDA e DAVE, 2009), tais como: o envelhecimento precoce (SORG, 2004) doenças cardiovasculares (SINGH e JIALAL, 2006), mal de Alzheimer (SMITH et al., 2000), mal de Parkinson (SORG, 2004), câncer (KINNULA e CRAPO, 2004), entre outras.

Os radicais livres formados podem ter duas origens: derivados de fontes endógenas, como o metabolismo de nutrientes, processo de envelhecimento, entre outros; ou fontes exógenas como radiação ionizante, fumo, solventes orgânicos, etc. (BUYUKOKUROGLU et al., 2001). As células, entretanto, para defenderem-se contra os EROs e manter a homeostase redox, são equipadas com diferentes tipos de mecanismo de defesa. Estes mecanismos de

defesa incluem a presença, produção ou aquisição de moléculas que protegem a célula da ação dos radicais livres, os chamados antioxidantes.

Antioxidantes, são substâncias que retardam a velocidade dos processos oxidativos, responsáveis pela formação dos radicais livres, conferindo importantes benefícios à saúde (PIETTA, 2000). Estas substâncias podem ser naturais ou sintéticas. Antioxidantes, tais como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, presentes normalmente no organismo, desempenham papéis importantes na eliminação dos radicais livres e prevenção de lesões nas células. Outras moléculas, como as vitaminas C e E, fortes antioxidantes, inibem a peroxidação lipídica nas células. Quando o mecanismo antioxidante torna-se desequilibrado no corpo humano, suplementos de antioxidantes podem ser utilizados para ajudar a reduzir os danos oxidativos (CHANDA e DAVE, 2009). No entanto, o uso de antioxidantes sintéticos tem sido evitado devido a suspeita de que estes possam produzir efeitos carcinogênicos (BOTTERWECK et al., 2000).

Existe, portanto, a necessidade de se obter antioxidantes mais eficazes, menos tóxicos e de baixo custo. As plantas, por sua vez, por possuírem inúmeros compostos resultantes do seu metabolismo secundário, podem ser fontes de substâncias antioxidantes. Embora os compostos fenólicos e flavonóides estejam associados com a maioria dos antioxidantes naturais (RAZAVI et al., 2008), muitos outros compostos estão sendo descobertos.

Em tratando-se de cosméticos, é extremamente importante realizar um balanceamento entre as matérias-primas sintéticas e naturais a fim de maximizar a ação farmacológica e alcançar melhores efeitos (RODRIGUES, 2001; PIETRO et al., 2006). Atualmente, observa-se uma tendência dos consumidores à procura de produtos que apresentem elevada qualidade, os quais minimizam os fenômenos de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem dos produtos. Além dos conjuntos de processos que objetivam eliminar e/ou minimizar a atividade oxidante há a procura por matérias-primas que apresentem características antioxidantes (CHORILLI et al., 2007; VICENTINO e MENEZES, 2007).

Dentre as substâncias ativas utilizadas atualmente em produtos cosméticos visando a ação antioxidante, em especial a ação antienvhecimento, estão os carotenóides, o ácido ascórbico, a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e extratos vegetais, principalmente aqueles que possuem compostos fenólicos (SCOTTI et al., 2007).

Neste sentido, um grande número de métodos *in vitro* tem sido desenvolvido para medir a eficiência dos antioxidantes naturais, sejam compostos puros ou compostos de plantas. Tendo em vista o grande potencial das plantas como antioxidantes, *A. parviflora*, pode representar uma fonte de compostos com potenciais a serem explorados.

## 2.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A utilização de plantas como medicinais e em pesquisas de exploração de suas propriedades biológicas é de grande importância e bastante promissor. Estas devem ser estudadas a fim de elucidar os riscos que podem oferecer quanto a sua toxicidade e ainda avaliar seu potencial tóxico para emprego em outros produtos biológicos.

A utilização de bioensaios de toxicidade em pesquisa fitoquímica possui o objetivo de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a possível toxicidade das substâncias de origem vegetal (FORBES e FORBES, 1994).

Da mesma forma, os ingredientes para uso em produtos cosméticos devem ser avaliados em termos de risco e não de dano. Consequentemente, a avaliação do risco deve relacionar o dano com o nível de exposição. A avaliação de segurança deve, portanto, atender o conhecimento dos parâmetros toxicológicos dos ingredientes (ANVISA, 2003).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o teste preliminar para avaliar a biocompatibilidade de materiais a serem usados em dispositivos biomédicos. Estes testes consistem em colocar os materiais de interesse direta ou indiretamente em contato com a cultura de células de mamíferos, analisando a ocorrência de alterações celulares, através de uso de corantes reveladores, ou inibição da formação de colônias celulares. Estudos utilizando cultura de células para avaliar toxicidade demonstram que estes testes podem ser utilizados satisfatoriamente, tendo em vista que são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (ROGERO et al., 2003).

Uma vez que baseiam-se no potencial de degeneração ou morte celular provocado pelo material analisado, materiais com resultados positivos nos ensaios de citotoxicidade descaracterizam a condição de inocuidade para emprego em cosméticos (CHORILLI et al., 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar por meio de um estudo químico e biológico o óleo essencial e extratos de *Aniba parviflora* visando a formulação de um fitocosmético.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

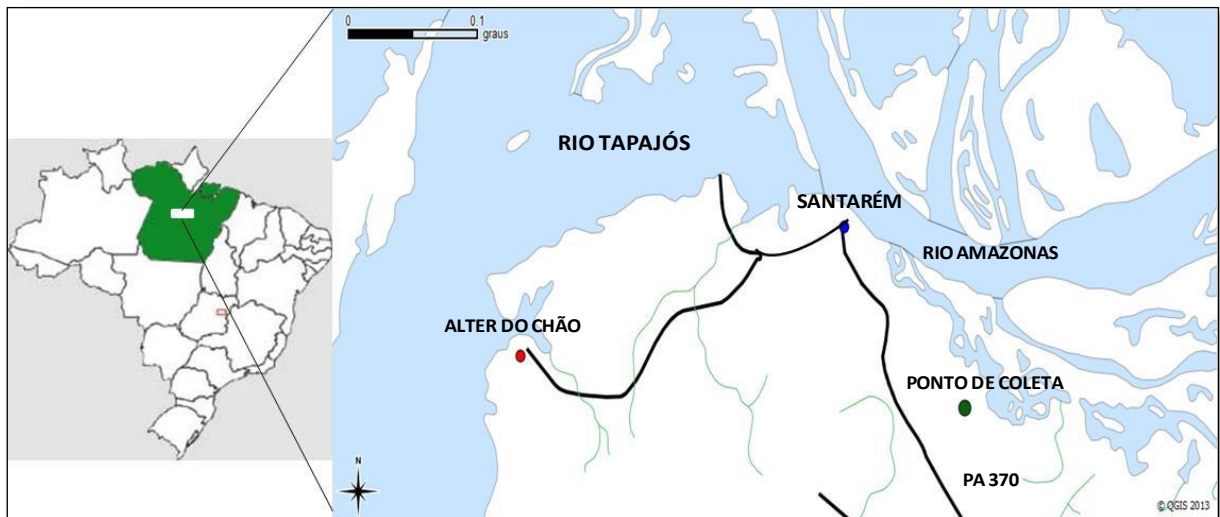
- Investigar a atividade antimicrobiana, a citotoxicidade e a ação antioxidante dos óleos essenciais, extratos brutos e fases particionadas de folhas e galhos de *A. parviflora*;
- Verificar a presença de compostos químicos (terpenos, flavonóides, alcalóides, fenóis, esteróides e saponinas) por meio de ensaios qualitativos nos extratos e partições de *A. parviflora*;
- Analisar o perfil cromatográfico dos óleos essenciais e dos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora*;
- Formular um produto fitocosmético contendo óleo essencial e/ou extratos de *A. parviflora*;
- Avaliar a estabilidade preliminar do fitocosmético obtido.

## 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e galhos de quatro indivíduos de *A. parviflora* foram coletados na fazenda Experimental Curauá- PEMATEC, localizada no município de Santarém-PA (Figura 4), no período de abril de 2012. O material vegetal foi utilizado separadamente para a extração do óleo essencial e produção do extrato etanólico. Foi coletado ainda, material vegetal para produção de exsicatas para identificação da planta, realizada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com o número de registro 254.490.

Figura 4 - Mapa de Santarém-PA e circunvizinhança do ponto de coleta de *Aniba parviflora*.



Fonte: Batista (2014).

O material vegetal, folhas e galhos, coletado foi seco a temperatura ambiente por um período de 10 dias e moído em moinho elétrico de facas com tela de 3 mm, para utilização na extração de óleos e produção dos extratos.

### 4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Figura 5), onde o material vegetal foi submerso em água destilada na proporção de 1/10, e aquecido a uma temperatura de 100°C por um tempo de três horas para folhas e de seis horas para galhos. Após a extração os óleos essenciais foram depositados em frascos de vidro âmbar e

armazenados na geladeira para posteriores ensaios de atividades biológicas. O rendimento dos óleos essenciais foi calculado a partir da massa do material seco e da massa do óleo extraído, conforme a Equação 1:

$$Rend = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{planta}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$m_{\text{óleo}}$  = Massa do óleo (g)

$m_{\text{planta}}$  = Massa da planta (g)

Rend = Rendimento em porcentagem (%p/p)

Figura 5 - Aparelhos tipo Clevenger utilizados para extração do óleo essencial de *A. parviflora*.



Fonte: Batista (2014).

### 4.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE *A. parviflora*

Após os processos de secagem e moagem, o material vegetal (folhas e galhos) foi macerado com álcool etílico de cereais 92,8°INPM em temperatura ambiente, sendo a extração realizada em três ciclos de 72 h, totalizado um período de nove dias, onde a cada 72h o material vegetal foi filtrado e um novo solvente adicionado a este. Por fim, os filtrados foram submetidos ao rotaevaporador, sob pressão reduzida a 40°C, até a retirada total do solvente (SILVA, 2012). Uma fração do extrato bruto resultante foi dissolvido em etanol-água (1:3) e submetido à partição líquido-líquido, utilizando primeiramente o solvente *n*-hexano, seguido de diclorometano e acetato de etila. Após a partição foram obtidas fases solúveis em *n*-hexano, diclorometano, e acetato de etila, as quais foram rotaevaporadas, e uma fração hidroalcoólica que foi liofilizada.

Calculou-se o rendimento total dos extratos de acordo com a Equação 2:

$$Rend = \frac{P_{ext}}{P_{mv}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

Rend = Rendimento total do extrato (%)

$P_{ext}$  = Peso do extrato seco (g)

$P_{mv}$  = Peso do material vegetal (g)

### 4.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

As soluções obtidas a partir dos extratos, ressuspendidas em dimetil-sulfóxido (DMSO) e dos óleos essenciais, diluídos em solução de Tween 80 a 1% (v/v), foram testados quanto à ação antimicrobiana em diferentes cepas de micro-organismos potencialmente patogênicos.

#### 4.4.1 Material Microbiológico

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos OE e dos extratos foram utilizadas cepas adquiridas comercialmente da marca Cefar, na forma liofilizada. Os micro-organismos utilizados como cepas padrões para a realização dos ensaios antimicrobianos foram as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923); *Enterococcus faecalis*

(CCCD-E002); Gram-negativas: *Escherichia coli* (CCCD-E004) e *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004); entéricas *Salmonella enterica* (CCCD-S001) e *Proteus vulgaris* (CCCD-P002) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

#### 4.4.2 Padronização do Inóculo

As cepas bacterianas liofilizadas foram inicialmente hidratadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas por 24 h para reativação. Após esse período, as bactérias foram semeadas em Ágar BHI e reincubadas a 36°C por 24 h. Uma pequena fração de colônias em crescimento foi retirada e apropriadamente diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,9%), para obtenção do inóculo no padrão de turbidez 0,5 na escala de Mac Farland, que equivale à concentração final de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (NCCLS, 2003).

A cepa fúngica foi reativada através de sua inoculação em 1 mL de caldo Sabouraud e incubação a 30°C. Após reativação, a cultura foi sub-cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubada. Decorrido o período de crescimento, a cultura foi apropriadamente diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,9%), para obtenção do inóculo no padrão de turbidez 0,5 na escala de Mc Farland, que equivale à concentração final de 2 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL (NCCLS, 2003).

#### 4.4.3 Ensaio Antimicrobiano Qualitativo

Os testes qualitativos de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, extrato bruto e partições foram realizados utilizando a metodologia de difusão em ágar (NCCLS M7-A6). Os micro-organismos foram inoculados em câmara de fluxo laminar, onde para cada 25 mL de meio de cultura foram adicionados 500 µL de inóculo padrão. Após a solidificação do ágar foram feitas cavidades circulares de 6 mm de diâmetro, nas quais foram adicionados 20 µL da solução de óleo essencial diluído em Tween 80 a 1% na concentração de 1/10 ou dos extratos de *A. parviflora* na concentração de 4,0 mg/mL. Da mesma forma, foram utilizados discos de antibiótico Gentamicina (10 µg) e de Cetoconazol (100 mg) como controles positivos, e DMSO ou solução de Tween 80 a 1% (v/v) como controles negativos.

As placas foram então incubadas, em temperatura e tempo ideais para o crescimento dos micro-organismos, sendo os ensaios realizados em triplicata. Após a incubação em estufa, foi verificada a formação dos halos de inibição de crescimento microbiano. A atividade antibacteriana foi determinada pela mensuração do halo de inibição e classificada segundo



Alves et al. (2010), sendo halos inferiores a 9 mm considerados inativos, halos entre 9 e 12 mm pouco ativos, entre 13 e 18 mm ativos, e maiores que 18 mm muito ativos.

#### **4.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Após a verificação da existência de atividade antimicrobiana foram feitos testes para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM foi determinada somente para as amostras que apresentaram eficácia no método de difusão em poço (halos de inibição com diâmetro maior ou igual a 8 mm). A CIM é a menor concentração do OE ou do extrato que inibe visivelmente o crescimento bacteriano, e foi determinada pela técnica de microdiluição em placa de ELISA (NCCLS, 2007).

Inicialmente, os inóculos foram padronizados frente à escala 0,5 de McFarland e submetidos à diluição em solução Caldo Mueller Hinton para atingir a concentração final de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL.

Os ensaios foram realizados em triplicata, por adição de 100  $\mu$ L de meio de cultura líquido com inóculo microbiano e 100  $\mu$ L de concentrações seriadas a partir de 4,0 mg/mL até 0,06 mg/mL da amostra em cada poço da placa de ELISA. Foram feitos ainda poços com controle de crescimento do micro-organismo e controle de esterilidade do meio. As placas foram então incubadas a 36°C durante 2 horas para posterior verificação do crescimento microbiano.

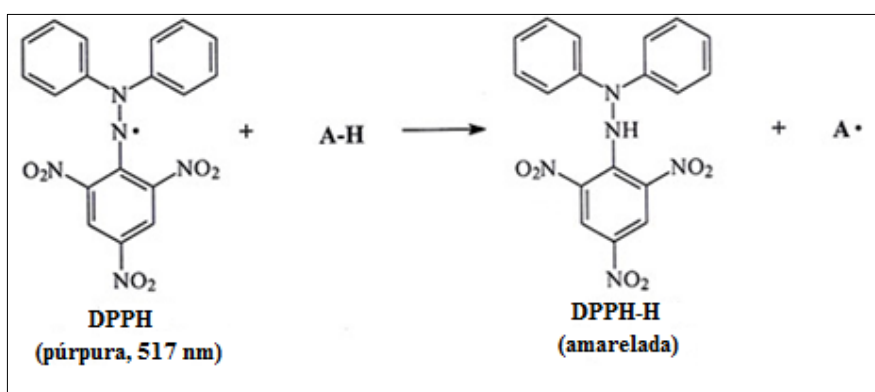
Após a incubação, 20  $\mu$ L de solução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) a 0,01% (p/v) foram adicionados à microplaca para controle de crescimento bacteriano. A microplaca foi posteriormente reincubada por um período de 3 horas à temperatura de 36°C e analisada quanto à mudança de coloração das culturas. Na reação com o revelador resazurina, a permanência da cor azul indica que não houve crescimento bacteriano e a mudança para coloração rosa indica que houve crescimento (CANILLAC e MOUREY, 2001). A mudança de cor é explicada levando-se em conta que a resazurina é um corante azul não-fluorescente que torna-se rosa e fluorescente quando é reduzido à resofurina através de oxidoredução por células microbianas viáveis. A resofurina ainda pode ser reduzida à hidroresofurina (incolor e não-fluorescente), tornando a cor mais translúcida. A concentração inibitória mínima foi revelada pela menor concentração que promoveu a inibição do crescimento microbiano, evidenciado pela permanência da coloração original.

Aligiannis et al. (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH $\cdot$ ). O DPPH é um radical livre estável amplamente utilizado para avaliar a atividade de compostos antioxidantes sobre radicais livres. O ensaio antioxidante utilizando o método do DPPH baseia-se na redução do radical livre na presença de um antioxidante, ou seja, uma substância que pode ceder um átomo de hidrogênio ou espécie radicalar, formando o difenil-picril-hidrazina (MOLYNEUX, 2004). O processo resulta na mudança de coloração de cor púrpura para amarelada, consequentemente provocando a perda da absorbância que é medida em espectrofotômetro (KRISHNAIAH et al., 2011) (Figura 6). A metodologia utilizada neste estudo foi descrita por Brand-Williams et al. (1995) modificada por Sánchez-Moreno et al. (1998), Mensor et al. (2001), Silva et al. (2007), Rufino et al. (2007) e adaptada por Silva (2012).

Figura 6 - Reação do método de sequestro do radical livre DPPH na presença de um antioxidante.



Fonte: grupiv.wordpress.com (2013).

##### 4.5.1 Preparo de Soluções Estoque das Amostras

Para o preparo das soluções estoque foram pesados 0,0128 g de extrato bruto seco, das partições (hexânica; diclorometano; acetato de etila e hidroalcoólica) e de óleo essencial, e solubilizados em metanol P.A., avolumando-se para 10 mL em balão volumétrico. A partir da solução estoque foram então feitas diluições sucessivas em progressão geométrica utilizando

como solvente metanol P.A., em microtubos tipo eppendorf, até a concentração de 5,0 mg/mL.

#### **4.5.2 Preparo das Soluções Padrão de Ácido Ascórbico**

Foram pesados 0,0200 g de ácido ascórbico e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL avolumando-se com metanol P.A., obtendo-se uma solução estoque com concentração de 800 mg/mL. Em seguida foram feitas as diluições necessárias obtendo-se as concentrações finais de 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 e 0 mg/mL para a construção da curva padrão.

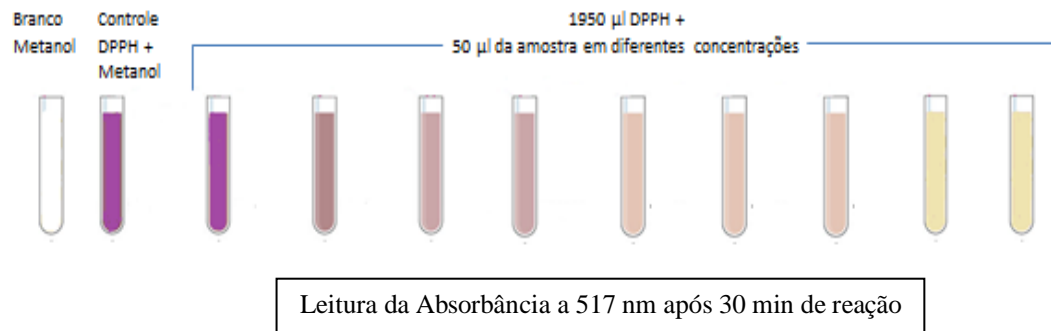
#### **4.5.3 Preparo da Solução de DPPH•**

A solução de DPPH• foi preparada na concentração 0,06 mol/L. Para isso, 0,0280 g de DPPH foram pesados e avolumados com metanol P.A. em balão volumétrico de 1000 mL. A solução foi preparada no mesmo dia da análise e protegida da exposição à luz.

#### **4.5.4 Realização da Análise de Atividade Antioxidante**

Foram transferidos 50 µL de cada concentração da amostra em triplicata, para tubos de ensaio, protegidos da exposição direta da luz, sendo adicionados 1950 µL da solução de DPPH• 0,06 mol/L seguido de homogeneização da mistura. O controle foi preparado de modo semelhante, substituindo a amostra por metanol P.A. O branco foi preparado adicionando-se 1950 µL de metanol P.A. a 50 µL da amostra na mesma concentração de cada ensaio para a calibração do espectrofotômetro. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 517 nm, após 30, 60 e 90 min para o óleo e 30 min para os extratos (Figura 7).

Figura 7 - Metodologia para avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH.



#### 4.5.5 Avaliação dos Resultados

Para avaliar o potencial antioxidante dos óleos e extratos foi determinada a porcentagem de inibição de DPPH<sup>•</sup>, conforme a Equação 3, e por meio de regressão linear, determinado a concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), ou seja, a concentração da amostra necessária para o sequestro de 50% dos radicais livres (SILVA et al., 2007).

$$AA\% = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{amostra}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

AA% = atividade antioxidante em percentagem

$Abs_{controle}$  = absorvância da solução controle

$Abs_{amostra}$  = absorvância da amostra

#### 4.5.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão da média onde foram aplicados o teste ANOVA One Way seguido do teste de Tukey para discriminação das diferenças. Foram consideradas as diferenças com  $p \leq 0,01$  como significativas.

## 4.6 CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS EXTRATOS

Para avaliação do efeito citotóxico das amostras foi aplicado o teste do Alamar Blue, realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994) com o intuito de analisar a viabilidade celular após a exposição às amostras testadas nessa pesquisa.

### 4.6.1 Linhagem Celular

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando linhagens de células tumorais e uma linhagem não tumoral, dentre elas: SKMELL19 (melanoma humano), HCT116 (carcinoma do colón humano), MCF7 (adenocarcinoma da mama humana) e MRC5 (fibroblasto humano). As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico Ampicilina-Estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.6.2 Preparo das Amostras

As amostras de óleos essenciais, extratos brutos e as partições (diclorometano, hexano, acetato de etila e hidroalcoólico), foram preparadas em DMSO e para o ensaio do Alamar blue diluídas em DMEM na concentração final de 50 µg/mL na placa. A concentração de DMSO não excedeu 0,2% nesse ensaio.

### 4.6.3 Ensaio do Alamar Blue

Para o ensaio, as células foram transferidas para placas de 96 poços na densidade 0,5 x 10<sup>4</sup> por poço. As placas foram então incubadas por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram expostas às amostras a serem avaliadas, em concentração única de 50 µg/mL, por um período de 72 h. Para o controle negativo foi utilizado o diluente DMSO (0,2%) e para o controle positivo, Doxorubicina (5,0 µg/mL). Passado o período de tratamento foi adicionado 10 µL do corante Alamar blue (0,02%) aos poços, e posteriormente feita a leitura das placas em leitor de Elisa (DTX 800 Beckman e Coulter), nos comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm.

O Alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN et al., 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox, portanto, reduzindo-se na presença de células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente, indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente, indicando viabilidade celular).

#### 4.6.4 Análise dos Resultados

A viabilidade foi calculada conforme a Equação 4, onde  $\Delta Ft$  = (fluorescência da célula + meio + extrato + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + extrato) e  $\Delta Fc$  = (fluorescência da célula + meio + DMSO + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + DMSO).

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\Delta Ft}{\Delta Fc} \times 100 \quad (4)$$

### 4.7 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS EXTRATOS

#### 4.7.1 Determinação dos Grupos Químicos dos Extratos de *A. parviflora*

Para a prospecção fitoquímica preliminar dos extratos brutos de *A. parviflora* foi utilizada a metodologia de Matos (2009). Para cada procedimento realizado foram preparadas soluções contendo 0,01g dos extratos e partições, correspondente de folhas e galhos, diluindo ambos em 20,00 mL de álcool etílico separadamente.

Os ensaios realizados consistiram em testes para verificar a presença de alcalóides, flavonóides, esteróides, saponinas e taninos e fenóis.

##### 4.7.1.1 Teste para Alcalóides

Em tubo de ensaio com 2,00 mL de extrato de *A. parviflora* acrescentaram-se três gotas do reagente de Drangendorff para a observação da presença de precipitado (precipitado floculoso, em pelo menos dois tubos é indicativo de alcalóides).

#### 4.7.1.2 Teste para Esteróides

Foi realizada a reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), tomando 2,00 mL do extrato e misturando-o a 2,00 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1,00 mL de anidrido acético, agitando suavemente e acrescentaram-se três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado observando-se se há o desenvolvimento de cores: coloração azul seguida de verde permanente indica presença de esteróides livres.

#### 4.7.1.3 Teste para Flavonóides

Foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg). Para isso adicionou-se a 2,00 mL do extrato, aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita e 2,00 mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação é determinado pelo término de efervescência e pode ser considerado positivo se houver o aparecimento da cor vermelha.

Além disso, para a confirmação dos resultados obtidos a partir do teste anteriormente descrito, foi realizado o teste de alcalinização dos extratos utilizando uma solução de NaOH a 2% adicionada gota a gota a 3,00 mL do extrato de *A. parviflora* em um tubo de ensaio, até um pH de 11, observando-se a mudança de cor. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes: amarela para flavonas, flavonóis e xantonas e vermelho laranja para flavonóis.

#### 4.7.1.4 Teste para Saponinas

Para determinação da presença de saponinas nas amostras foram misturados 2,00 mL de clorofórmio junto a 2,00 mL de extrato e 5,00 mL de água destilada. Em seguida, foi separada a fração aquosa e depois agitada para observação de uma possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas.

#### 4.7.1.5 Teste para Fenóis e Taninos

Para determinação da presença de taninos nas amostras, em um tubo de ensaio contendo 2,00 mL de extrato foram adicionados três gotas de FeCl<sub>3</sub>. Após forte agitação foi

observado a mudança de cor ou formação de precipitado abundante. Coloração entre azul e vermelho indica presença de fenóis e precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indica a presença de taninos.

#### **4.7.2 Análise Cromatográfica dos Óleos Essenciais e dos Extratos de *A. parviflora***

A composição química dos óleos essenciais e extratos de *A. parviflora* foi avaliada através da Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa (CG-EM) utilizando o cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GCMS-QP2010, equipado com coluna capilar 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Para a realização da análise cromatográfica, foi utilizado injetor ajustado à 220°C, a uma coluna fixada em 60°C, com uma rampa de aquecimento de 3°C/min e uma temperatura final de 240°C, com detector de espectros de massa fixado em 250°C. Hélio foi utilizado como gás de transporte a 1,0 mL/min.

O preparo das amostras para a análise cromatográfica deu-se pela solubilização dos óleos e das partições (folhas e galhos) em acetato de etila na concentração de 20 mg/mL. Os extratos brutos foram preparados na concentração de 250 µg/mL. Para a análise foram injetados no CG-EM 1,0 µL de cada solução em duplicata. Os componentes dos óleos essenciais e extratos foram então identificados por comparação com os dados descritos na literatura e os perfis da biblioteca de espectros de massa NIST 05.

### **4.8 FORMULAÇÃO COSMÉTICA**

#### **4.8.1 Planejamento Experimental**

O planejamento experimental fracionado foi utilizado a fim de se determinar os fatores que influenciam no desenvolvimento de uma formulação cosmética a partir de metabólitos de *A. parviflora*. Este permite detectar as possíveis interações entre as variáveis envolvidas, e assim, determinar um ponto ótimo, em condições experimentais (RODRIGUES e IEMA, 2005). Para isso, foram analisados os efeitos de quatro fatores da formulação em dois níveis de resposta, codificados como (+1) para o nível superior e (-1) para o nível inferior, sendo elaborado um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ . Após a escolha das formulações com as características organolépticas e físico-químicas desejadas, foram realizados estudos de estabilidade.



No planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , segundo metodologia proposta por Barros Neto (2010), é possível estimar os efeitos principais em um experimento, realizando apenas oito ensaios, ao invés dos dezesseis necessários em um planejamento completo  $2^4$ , economizando esforços e gastos, uma vez que os valores das interações significativas das duas metodologias possuem boa concordância.

As respostas investigadas foram: pH, condutividade elétrica, viscosidade e densidade relativa, sendo ainda monitoradas nas formulações as características organolépticas como cor, odor e aspecto. A atribuição dos valores para o nível superior e inferior foi feita de modo arbitrário, sem interferências na realização do experimento e na interpretação dos resultados, permitindo sua esquematização em forma de matrizes (AOUADA et al., 2008).

A seguir são apresentados os valores dos níveis, em quantidade (gramas), para cada um dos fatores estudados (Tabela 1) e a distribuição aleatória desses níveis, conforme planejamento experimental fracionado  $2^{4-1}$  (Tabela 2).

Tabela 1 - Fatores e níveis (em gramas) utilizados no planejamento experimental fracionado  $2^{4-1}$ .

<b>Fatores</b>	<b>Nível inferior (-1)</b>	<b>Nível superior (-1)</b>
Base Croda	40,00	88,00
Glicerina	8,00	40,00
Partição Glicólica	24,00	56,00
Óleo Vegetal	48,00	112,00

Tabela 2 - Distribuição aleatória dos níveis dos fatores estudados no planejamento experimental  $2^{4-1}$ .

<b>Fatores</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>	<b>F7</b>	<b>F8</b>
Base Croda	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
Glicerina	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
Partição Glicólica	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
Óleo Vegetal	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1

#### 4.8.2 Preparo das Emulsões

As emulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases empregando a partição glicólica a 0,5% (obtida a partir da partição hidroalcoólica e de uma solução de propilenoglicol em água), essência (óleo essencial de *A. parviflora* e essência de açaí na proporção de 1:4), glicerina, base Croda, conservantes metilparabeno (Nipagin) e propilparabeno (Nipazol), óleo vegetal, antioxidante BHT, quelante EDTA, ureia e água de osmose reversa, em concentrações determinadas no planejamento experimental.

As fases aquosa e oleosa foram aquecidas a 75°C, vertendo-se posteriormente a fase oleosa à aquosa, sendo esta mistura mantida sob agitação a 1200 rpm durante 25 min. Todas as formulações foram preparadas e avaliadas em 2 lotes diferentes, sendo todas realizadas em duplicata. Na Tabela 3 são apresentadas as matérias primas, suas respectivas funções e a quantidade (em gramas) das mesmas, utilizadas nas formulações.

Tabela 3 - Matérias-primas utilizadas no planejamento experimental das formulações cosméticas de *A. parviflora*, suas funções e quantidades.

<b>Componente</b>	<b>Função</b>	<b>Quantidade (g)</b>
Base Croda	Autoemulsificante	*
Glicerina	Umectante	*
Extrato glicólico	Aditivo biológico	*
Óleo vegetal	Emoliente	*
Nipazol	Conservante	0,80
Nipagin	Conservante	1,20
BHT	Antioxidante	0,40
EDTA	Quelante	0,80
Essência	Aroma	5,00
Ureia	Emoliente	8,00
Água deionizada	Veículo	564,00

\*Conforme a matriz do planejamento experimental (Tabela 1).

### 4.8.3 Análise Macroscópica das Formulações

#### 4.8.3.1 Análise das Características Organolépticas

As formulações foram avaliadas quanto às características organolépticas de cor, odor e aspecto. A coloração e o aspecto foram avaliados visualmente e o odor foi analisado através do olfato em relação ao padrão (LANGE et al., 2009). As amostras dos produtos foram classificadas em relação ao odor e coloração, segundo os seguintes critérios: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada e intensamente modificada (ISAAC et al., 2008).

O aspecto foi avaliado comparando-o em relação ao padrão, para verificar sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases, precipitação ou turvação deve ser indicativa da estabilidade da amostra (ISAAC et al., 2008). As amostras foram classificadas segundo os seguintes critérios: normal, sem alteração; levemente separada, levemente precipitada ou levemente turva; separada, precipitada ou turva.

#### 4.8.3.2 Teste de Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado para produzir estresse na amostra, uma vez que simula o aumento na força da gravidade, aumentando, dessa forma, a mobilidade das partículas, antecipando possíveis instabilidades (FARIA et al., 2012). O teste foi realizado 24 h após o preparo das amostras e dos testes de estabilidade preliminar (item 4.8.5).

Em um tubo de ensaio cônico graduado foram adicionados 10,0 g de cada amostra sendo submetidos aos ciclos de 1000, 2500 e 3500 rpm durante 30 min em cada rotação à temperatura ambiente (IDSON, 1993; RIEGER, 1996). Na avaliação foram observadas as características organolépticas (cor, aspecto e odor) e a homogeneidade das formulações, para identificar qualquer processo de instabilidade, tais como separação de fases e formação de precipitação (CASTELI et al., 2008; FARIA et al., 2012). Os testes foram realizados em duplicata.

#### 4.8.3.3 Densidade Relativa

A densidade das formulações foi analisada utilizando-se picnômetro de vidro. Para isso, uma fração das amostras foi depositada no picnômetro (Figura 8) e com auxílio de uma balança analítica, foram registradas suas respectivas massas ( $M_2$ ), em gramas. Da mesma forma, foram realizadas as medidas da massa do picnômetro com água ( $M_1$ ) e do picnômetro vazio ( $M_0$ ). Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente e em duplicata. A densidade relativa das amostras foi calculada, segundo metodologia proposta pela ANVISA (2008), utilizando-se a Equação 5:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \quad (5)$$

Onde:

d = densidade

$M_0$  = Massa do picnômetro vazio, em gramas;

$M_1$  = Massa do picnômetro com água purificada, em gramas;

$M_2$  = Massa do picnômetro com amostra, em gramas.

Figura 8 - Picnômetro de vidro utilizado para determinação da densidade relativa das formulações.

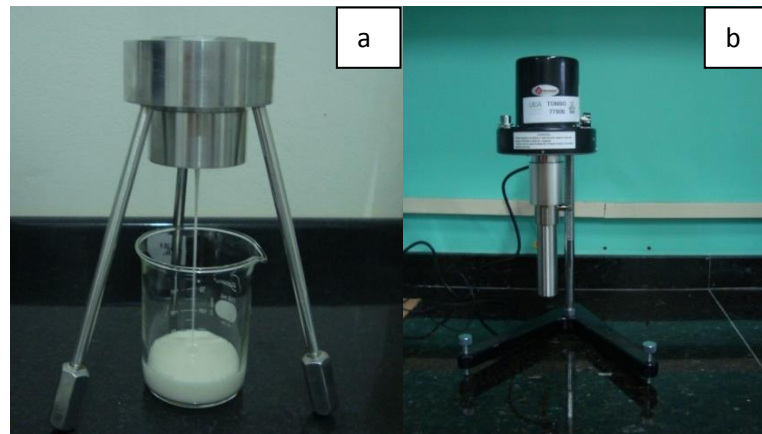


Fonte: Batista (2014).

#### 5.8.3.4 Viscosidade

As formulações foram avaliadas quanto a sua viscosidade utilizando-se dois métodos: viscosidade cinemática, medida em copo Ford (Figura 9a); e viscosidade dinâmica, utilizando viscosímetro rotativo analógico (Figura 9b).

Figura 9 - Copo Ford (a) e viscosímetro rotativo analógico (b) utilizados para a determinação da viscosidade das formulações.



Fonte: Batista (2014).

A medição em copo Ford foi realizada colocando-se uma fração da amostra no aparelho e observando a velocidade da passagem da emulsão pelo orifício do copo Ford. Para isso, o equipamento foi nivelado em superfície plana, o orifício localizado na parte inferior do copo foi obstruído e a amostra inserida até transbordar o copo. Em seguida nivelou-se a superfície da amostra e esta foi colocada para escorrer, observando-se o tempo de escoamento (ANVISA 2008). Para a determinação da viscosidade cinemática foi utilizada a Equação 6:

$$\text{Viscosidade} = A \times T + B \quad (6)$$

Onde:

T = tempo expresso em segundos

A e B = constantes definidas experimentalmente pelo fabricante, que variam para diferentes orifícios do copo Ford.

A viscosidade dinâmica foi determinada através da medição da força de fricção, utilizando-se um viscosímetro rotativo. Para isso foi necessário estimar, primeiramente, a faixa aproximada de viscosidade das formulações para seleção do rotor e da velocidade de rotação. A combinação destes elementos, para cada formulação, é aplicada para medir uma faixa de viscosidade diferente. Posteriormente à seleção do rotor, a amostra foi colocada dentro de um tubo de aço inoxidável e mantida no nível indicado no rotor. Depois de selecionada a velocidade, o teste transcorreu até a estabilização do indicador, por um tempo padronizado de 30 segundos. Após a estabilização pressionou-se a trava de disco graduado e desligou-se o motor, simultaneamente, sendo realizada, então, a leitura do valor indicado no disco.

Para o cálculo da viscosidade absoluta da amostra, a leitura do ângulo de deflexão encontrada no disco graduado foi multiplicado pelo coeficiente (Tabela 4), de acordo com a equação 7:

$$\eta = K \cdot \alpha \quad (7)$$

Onde:

$\eta$  = viscosidade absoluta em cP;

K = coeficiente encontrado na Tabela 4;

$\alpha$  = leitura indicada pelo ponteiro (ângulo de deflexão)

Tabela 4 - Coeficientes utilizados no cálculo de determinação da viscosidade de acordo com a velocidade e o rotor utilizado no viscosímetro rotativo.

	<b>RPM</b>	<b>Rotor 1</b>	<b>Rotor 2</b>	<b>Rotor 3</b>	<b>Rotor 4</b>
<b>L</b> <b>RPM</b>	0,3	200	1.000	4.000	20.000
	0,6	100	500	2.000	10.000
	1,5	40	200	800	4.000
	3,0	20	100	400	2.000
<b>H</b> <b>RPM</b>	6	10	50	200	1.000
	12	5	25	100	500
	30	2	10	40	200
	60	1	5	20	100

Valores em cP. RPM = Rotações por minuto. L = baixa velocidade. H = alta velocidade.

#### 4.8.3.5 pH e Condutividade

Os valores de pH foram determinados inserindo-se o eletrodo do pHmetro diretamente na diluição aquosa 1:10 (p/p) das amostras homogeneizadas à temperatura de 25°C (DAVIS, 1977). As leituras foram realizadas em triplicada em cada lote. O mesmo procedimento foi realizado para a determinação dos valores de condutividade utilizando o condutivímetro.

#### 4.8.4 Teste Preliminar de Estabilidade

As emulsões classificadas macroscopicamente como estáveis, depois de decorridos 24 h de sua manipulação, foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade, que consistiram em: estresse térmico, ciclo gela-degela (ANVISA, 2004; ISAAC et al., 2008) e exposição à radiação luminosa e ao escuro.

No ensaio de estresse térmico, as emulsões foram acondicionadas em frascos plásticos de poliestireno e submetidas ao aquecimento em banho termostatizado na faixa de temperatura de 40 a 80 °C. O ensaio foi realizado com temperatura de  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , mantendo-se por 30 min em cada temperatura. As leituras foram realizadas após 24 h do término do experimento a 80 °C, após arrefecimento natural das amostras à temperatura ambiente (FERRARI, 2002). As amostras que permaneceram macroscopicamente estáveis foram analisadas quanto aos parâmetros de avaliação: determinação do valor do pH, condutividade, densidade, viscosidade, espalhabilidade, cor, odor e aspecto.

No teste do ciclo gela-degela, as formulações permaneceram nas temperaturas padronizadas por um período de 12 dias. O 1º dia correspondeu às 24 h após o preparo das formulações. As amostras foram submetidas à temperatura de  $4 \pm 2$  °C/24 h em geladeira e  $45 \pm 2$  °C/24 h em estufa, completando-se um ciclo. As leituras foram realizadas antes do início do teste e no final do 6º ciclo (12 dias). Foram utilizados os mesmos parâmetros de avaliação do teste de estresse térmico (FERRARI, 2002).

No teste de exposição à radiação luminosa, as formulações permaneceram expostas ao sol por um período de 15 dias. Após esse período e decorridos 24 h, as amostras foram novamente avaliadas quanto aos parâmetros de avaliação, a fim de se analisar se houve degradação dos constituintes das formulações (ANVISA, 2004).

As formulações foram ainda mantidas armazenadas em prateleira, em temperatura ambiente e sem intervenção de luz, por um período de 15 dias, para verificar se as emulsões mantiveram-se estáveis. As análises foram realizadas após 24 h.

#### **4.8.5 Análise dos Resultados**

As análises estatísticas foram avaliadas pelo programa Statistica 7.0. Os resultados dos testes de estabilidade preliminar foram submetidos aos testes estatísticos de Tamhane para amostras heterogêneas e ao teste de Tukey para as homogêneas, considerando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS DE *A. parviflora*

A hidrodestilação realizada para a obtenção dos óleos essenciais de folhas e galhos de *A. parviflora* resultou em 560  $\mu\text{L}$  de OE de folhas e 400  $\mu\text{L}$  de OE de galhos, em média, com rendimentos de 0,52% e 0,34% respectivamente. Em trabalho realizado por Alcântara et al. (2010) o rendimento encontrado na obtenção do OE de caule de *A. rosaeodora*, foi de 1,3%, e em outro trabalho, Maia et al. (2007) encontraram o rendimento do OE para folhas de pau-rosa variando entre 1,6% e 2,2%, nos períodos seco e chuvoso, respectivamente. Lima et al. (2009) relataram que o rendimento do óleo das folhas de *A. canelilla* chegou à 2,0% e Manhães et al. (2012) encontraram rendimento do óleo essencial do caule de *A. canelilla* de 0,9%. Esses resultados demonstram que *A. parviflora* fornece rendimentos de OE inferiores a outras espécies de *Aniba*.

A extração realizada com álcool de cereais, utilizando 300 g de material vegetal moído de folhas e galhos de *A. parviflora*, possibilitou a obtenção de 40,521 g de extrato bruto etanólico de folhas e 30,766 g de galhos, com rendimento de 13,5% e 10,3%, respectivamente. Trabalhos que se utilizam de extratos de espécies de *Aniba*, em especial de *A. parviflora*, são escassos na literatura, o que pode estar relacionado com a grande exploração do óleo essencial de espécies deste gênero, caracterizado por plantas aromáticas.

### 5.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *A. parviflora*

A partir da análise por CG-EM, 59 compostos foram identificados nos óleos essenciais de folhas e galhos de *A. parviflora*, como apresentado nos cromatogramas das Figuras 10 e 11, com base em seus espectros de massas e índices de retenção (IR), os quais foram comparados com o banco de dados da biblioteca NIST 05.

Nos óleos essenciais de folhas foram identificados 53 compostos (Tabela 5) e nos óleos essenciais de galhos 46 compostos (Tabela 6). Como pode ser observado nas Figuras 10 e 11, onde estão apresentados os cromatogramas obtidos para o óleo essencial de folhas e galhos de *A. parviflora*, respectivamente, o linalol correspondeu ao composto majoritário de ambos os óleos, seguido dos compostos cariofileno e  $\beta$ -felandreno no óleo de folhas e aristoleno e  $\beta$ -eudesmol no dos galhos. Esses resultados coincidem com os encontrados por Pereira (2011), que observou o composto linalol como componente majoritário dos óleos



essenciais de *A. parviflora*, seguido do composto  $\beta$ -felandreno. Outros componentes como o *o*-cimeno e o espatulenol também apresentaram uma proporção elevada nas amostras de óleos essenciais de *A. parviflora*.

Tabela 5 - Composição química do óleo essencial de folhas de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	4,02	( <i>E</i> )-2-Hexenal	520730	0,04
2	5,59	$\alpha$ -Tujeno	4558008	0,32
3	5,80	$\alpha$ -Pinoeno	25355321	1,77
4	6,20	Canfeno	2569865	0,18
5	6,52	Benzaldeído	3646921	0,25
6	6,99	$\beta$ -Pinoeno	12419218	0,87
7	7,33	$\beta$ -Mirceno	15979503	1,11
8	7,83	$\alpha$ -Felandreno	77642975	5,41
9	8,00	3-Careno	3577193	0,25
10	8,20	(+)-4-Careno	2109503	0,15
11	8,51	<i>o</i> -Cimeno	88878768	6,19
12	8,68	$\beta$ -Felandreno	108342371	7,55
13	8,76	Eucaliptol	77297320	5,39
14	9,25	( <i>Z</i> )-Ocimeno	8800864	0,61
15	9,67	$\gamma$ -Terpineno	4779193	0,33
16	10,18	Óxido de Linalol	5892520	0,41
17	10,79	2-Careno	10333150	0,72
18	11,37	Linalol	328288369	22,88
19	11,45	Hotrienol	1744328	0,12
20	13,96	endo-Borneol	3009089	0,21
21	14,42	4-Terpinenol	12549620	0,87
22	15,01	$\alpha$ -Terpineol	36395143	2,54
23	15,46	Acetato de Sabinil	3670841	0,26
24	21,71	$\alpha$ -Cubebeno	5323885	0,37
25	23,51	$\beta$ -Elemeno	3696415	0,26
26	24,73	Cariofileno	116897130	8,15
27	25,46	Aloaromadendreno	17895517	1,25
28	26,05	Humuleno	11763843	0,82
29	27,17	$\beta$ -Copaeno	9224247	0,64
30	27,40	$\beta$ -Selineno	27657679	1,93
31	27,84	$\gamma$ -Elemeno	57104567	3,98
32	27,95	$\alpha$ -Muroleno	2045724	0,14
33	28,21	$\alpha$ -Farneseno	13936733	0,97
34	28,48	$\gamma$ -Cadineno	2589209	0,18
35	28,63	$\alpha$ -Panasinseno	3748480	0,26
36	28,85	$\delta$ -Cadineno	8515981	0,59
37	29,86	Elemol	2921848	0,20
38	30,17	Germacreno	9017745	0,63
39	30,27	Epiglobulol	1430205	0,10
40	30,40	( <i>E</i> )-Nerolidol	12430429	0,87
41	30,58	Palustrol	2501937	0,17
42	31,06	Espatuleno	83950664	5,87

43	31,24	Óxido de Cariofileno	37788034	2,63
44	31,75	Guaiol	6720172	0,47
45	31,96	Viridiflorol	5532827	0,39
46	33,07	(-)-Aristoleno	70079365	4,88
47	33,73	$\beta$ -Eudesmol	15295310	1,77
48	33,83	$\alpha$ -Eudesmol	16658843	1,16
49	33,99	Viridiflorol	3892438	0,27
50	34,32	Hediciariol	3728162	0,26
51	34,46	Acetato de 10,14-dimetil-16-oxo-17-oxapentaciclo [13.2.2.01,14.02,11.05,10]-7-nonadecil	3090473	0,22
53	37,80	Benzoato de Benzila	5784173	0,40

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 10 - Cromatograma do óleo essencial de folhas de *A. parviflora*.

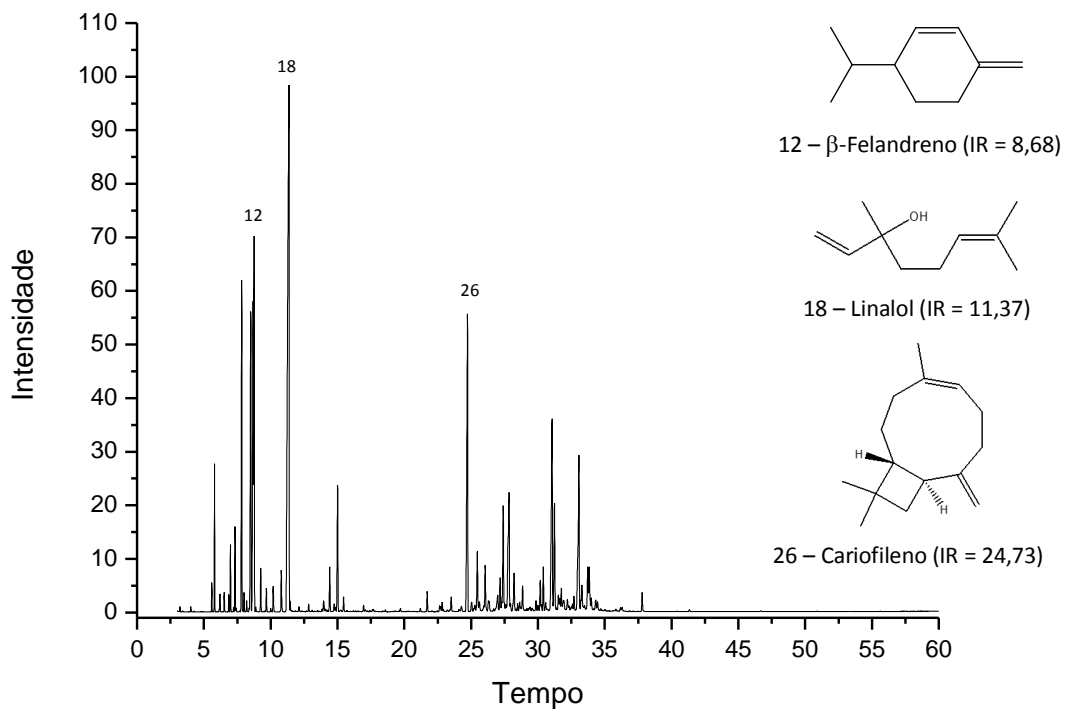
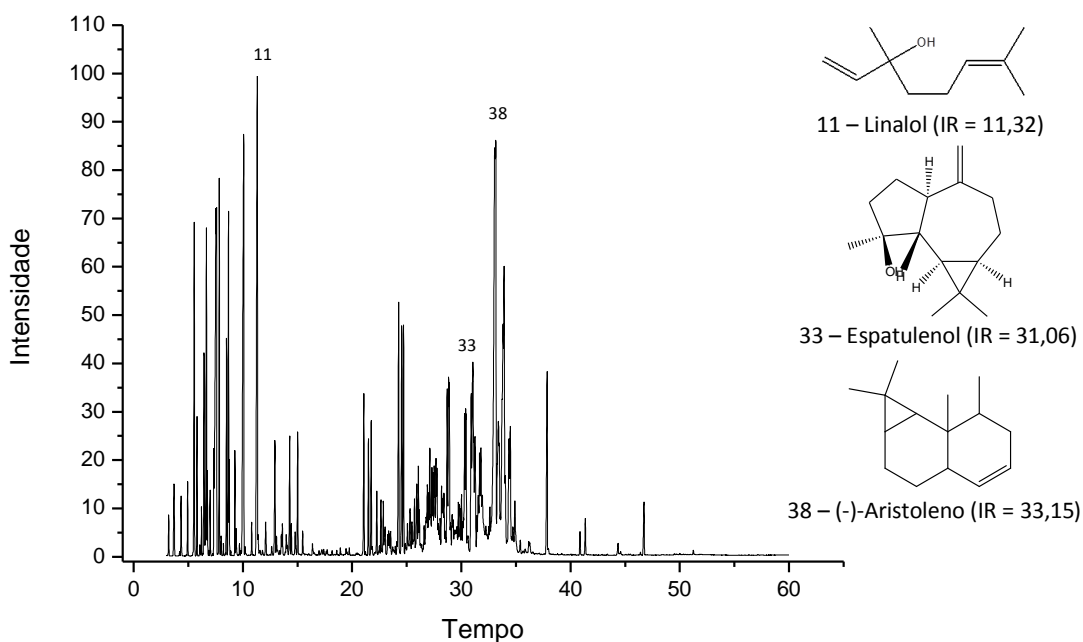


Tabela 6 - Composição química do óleo essencial de galhos de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	3,70	Ocimeno	20459083	0,59
2	4,34	L- $\beta$ -Pineno	12187701	0,35
3	4,94	$\beta$ -Mirceno	14089712	0,41
4	5,55	$\alpha$ -Felandreno	80668832	2,34
5	5,80	D- $\alpha$ -Pineno	20074178	0,58
6	6,44	<i>o</i> -Cimeno	49583355	1,44
7	6,74	Eucaliptol	15105085	0,44
8	7,00	L- $\beta$ -Pineno	10284215	0,30
9	7,84	$\alpha$ -Felandreno	73722106	2,14
10	8,68	$\beta$ -Felandreno	86194153	2,50
11	11,32	Linalol	371923988	11,90
12	12,09	L-4-Terpineol	10160300	0,29
13	12,93	$\alpha$ -Terpineol	34765857	1,01
14	21,08	$\alpha$ -Cubebeno	42577925	1,24
15	22,26	Copaeno	16168669	0,47
16	22,86	$\alpha$ -Copaeno	13676312	0,40
17	23,04	$\beta$ -Elemeno	12301370	0,36
18	24,56	Cariofileno	74099517	2,15
19	25,30	(Z)-Cariofileno	15785473	0,46
20	26,05	Humuleno	14513050	0,60
21	26,75	(+)-epi-Biciclosesquifelandreno	11226589	0,33
22	26,89	$\beta$ -Cubebeno	20126954	0,58
23	27,00	Himachaleno	13687373	0,40
24	27,12	$\beta$ -Selineno	29048030	0,84
25	27,51	(+)-Ledeno	25772452	0,75
26	28,19	$\beta$ -Curcumeno	16570947	0,48
27	28,41	$\alpha$ -Cedreno	33227218	0,96
28	28,71	$\delta$ -Cadineno	52572354	1,53
29	28,91	$\beta$ -Cadineno	39676772	1,15
30	29,84	Elemol	15280369	0,44
31	30,02	Germacreno	10806638	0,31
32	30,30	(E)-Nerolidol	45042933	1,31
33	31,06	Espatulenol	121127710	3,51
34	31,25	(-)-Globulol	43565905	1,26
35	31,53	Epiglobulol	19880623	0,58
36	31,67	Guaiol	23902462	0,69
37	31,94	$\alpha$ -Eudesmol	11879165	0,34
38	33,15	(-)-Aristoleno	381457878	11,07
39	33,40	$\tau$ -Cadinol	100606206	2,92
40	33,82	$\beta$ -Eudesmol	136862447	3,97
41	34,03	1-Aromadendreno	16497839	0,48
42	34,36	Bulnesol	44547471	1,29
43	34,48	$\beta$ -Bisabolol	37113687	1,08
44	34,90	$\alpha$ -Bisabolol	16747614	0,49
45	37,86	Benzoato de Benzila	59566971	1,73
46	41,35	Salicilato de Benzila	9486445	0,28

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 11 - Cromatograma do óleo essencial de galhos de *A. parviflora*.



Outras espécies da família Lauraceae apresentam em seus óleos essenciais componentes encontrados nos óleos de *A. parviflora*, os quais apresentam atividade biológica de interesse. Oh et al. (2012) reportaram a presença de  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno no óleo essencial da espécie *Lindera melissifolia*, substâncias que se mostraram responsáveis pela atividade repelente contra carrapatos. Em outro estudo, Guzmán-Gutiérrez et al. (2012) verificaram que o óleo essencial da espécie *Litsea glaucescens* demonstrou atividade antidepressiva. Os monoterpenos  $\beta$ -pineno e linalol foram identificados como os dois principais compostos ativos do OE, sendo que eucaliptol, limoneno e  $\alpha$ -pineno também foram identificados no OE dessa espécie de Lauraceae.

Bruni et al. (2004) identificaram por CG-EM os constituintes do óleo essencial da espécie *Ocotea quixos* e observaram a presença 44 compostos, entre eles o benzaldeído. Os autores verificaram que o óleo apresentou atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). O óleo de *O. quixos* também apresentou atividade antifúngica frente *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pythium ultimum* e *Trichophyton mentagrophytes*.

Takaku, Haber e Setzer (2007) identificaram por CG-EM os componentes químicos de óleos essenciais obtidos de folhas de 10 espécies do gênero *Ocotea*, a fim de discriminar as diferenças e as similaridades existentes entre os compostos químicos voláteis dessas espécies.

Os compostos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e cariofileno foram encontrados em todas as espécies. Estas substâncias também foram encontradas nos óleos essenciais de *A. parviflora*.

A maioria dos compostos encontrados nos óleos essenciais de *A. parviflora* possui potencial para ser utilizada na indústria cosmética. Tais substâncias possuem inúmeras atividades biológicas descritas na literatura, em especial o linalol, composto majoritário do OE da espécie, largamente utilizado na indústria de perfumaria, e com um grande potencial biológico descrito (ALCANTARA, 2010).

Sœur et al. (2011) investigaram os efeitos do OE de *A. rosaeodora*, rico em linalol, em células de carcinoma epidermóide humano. Os autores verificaram que o OE eliminou seletivamente as células cancerígenas, por meio da indução da produção de espécies reativas de oxigênio e despolarização da membrana mitocondrial, causando estágios iniciais da apoptose. Em um estudo recente, Kladniew et al. (2014) verificaram o efeito antiproliferativo e anticolesterogênico do linalol em células derivadas do fígado. O monoterpene quando combinado com simvastatina inibiu sinergicamente a proliferação e a colesterogênese em células humanas.

O composto aristoleno, que apresentou concentração abundante no óleo essencial de galhos de *A. parviflora*, foi encontrado em espécies de plantas com atividade antibacteriana (WANG et al., 2010) e antioxidante (SOARES e FABRI, 2011).

Considerando os resultados encontrados na análise química de óleos essenciais de galhos e folhas, nota-se que assim como a espécie *A. rosaeodora*, o OE de *A. parviflora* demonstra excelente potencial como fonte de compostos químicos com inúmeras atividades biológicas de interesse, que podem ser aplicados em diversas indústrias, em especial a farmacêutica e a cosmética.

### 5.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES DE *A. parviflora*

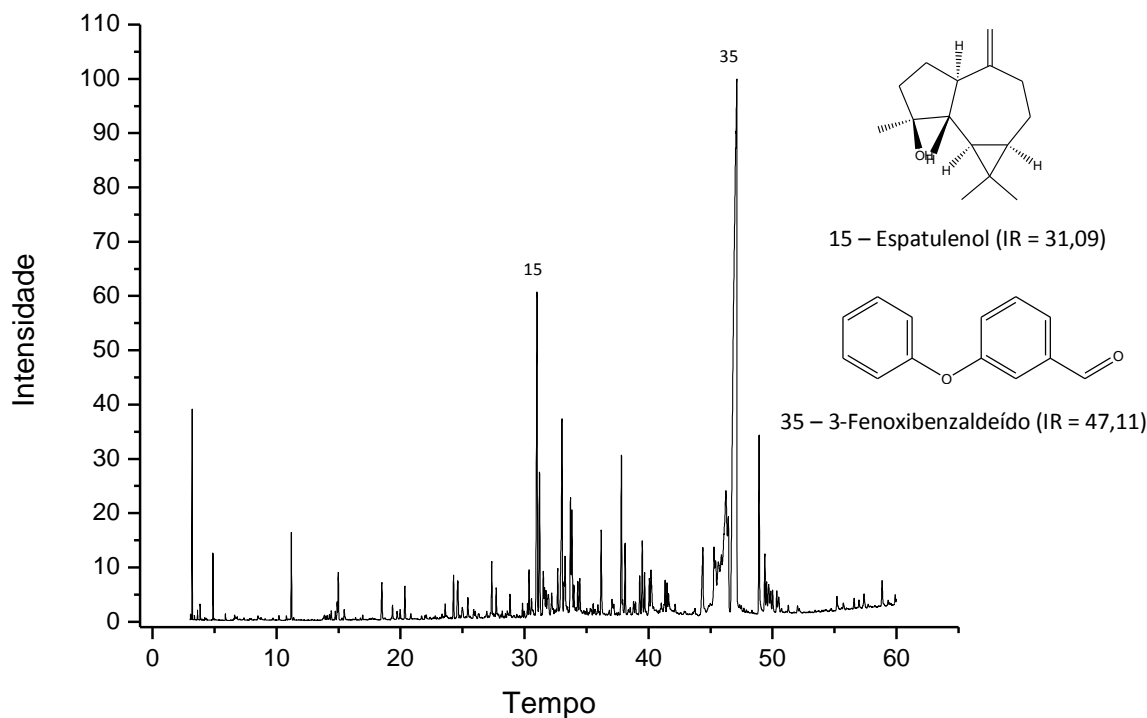
Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados os componentes químicos identificados nos extratos etanólicos brutos de *A. parviflora*. A partir da análise por CG-EM, foram identificados 45 compostos nos extratos brutos de folhas e galhos de *A. parviflora* com base em seus espectros de massas e índices de retenção (IR), os quais foram comparados com o banco de dados da biblioteca NIST 05. Os cromatogramas obtidos para os extratos brutos de folhas e galhos estão apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

Tabela 7 - Composição química dos extratos etanólicos de folhas de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	3,19	<i>n</i> -Butirato de Etila	12440976	1,17
2	4,87	Ciclohexanona	5659284	0,53
3	11,19	Linalol	9958642	0,94
4	14,98	$\alpha$ -Terpineol	6174271	0,58
5	18,49	3,7-Dimetil-1,7-Octadien-3,6-Diol	6444448	0,61
6	20,35	1,3,3-Trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol	4622232	0,43
7	24,28	trans-2-Ciclohexen-1-ona, 4-hidróxi-3-metil-6-(1-metiletil)	6453920	0,61
8	24,63	Cariofileno	8455385	0,80
9	25,43	Aloaromadendreno	2649861	0,25
10	27,35	$\beta$ -Eudesmeno	7202850	0,68
11	27,71	Ledeno	3737838	0,35
12	28,83	$\delta$ -Cadineno	2838073	0,27
13	30,36	( <i>E</i> )-Nerolidol	5756185	0,54
14	30,56	Palustrol	2188139	0,21
15	31,09	Espatulenol	63290220	5,96
16	31,21	Óxido de Cariofileno	27371937	2,58
17	31,51	(-)-Globulol	7054650	0,66
18	31,62	$\alpha$ -Eudesmol	5259901	0,49
19	31,73	Guaiol	3706554	0,35
20	33,02	(-)-Aristoleno	41866732	3,94
21	33,19	Tetraciclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]-9-tridecanol, 4,4-dimetil	4007181	0,38
22	33,71	$\beta$ -Eudesmol	19319547	1,82
23	33,98	Viridiflorol	3998981	0,38
24	34,29	Hedicariol	4867086	0,46
25	34,45	Longifolenaldeído	5735722	0,54
26	37,81	Benzoato de Benzila	26835076	2,53
27	39,29	2,6,10,15,19,23-Hexametil-tetracos-2,10,14,18,22-pentaene-6,7-diol	6290323	0,59
28	40,06	Monobenzona	5557859	0,52
29	40,20	Acetato de Fitol	9807561	0,92
30	41,34	Salicilato de Benzila	3878671	0,36
31	41,49	4,4,8-Trimetiltriciclo[6.3.1.0(1,5)]dodecano-2,9-diol	4632735	0,44
32	41,61	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	3466197	0,33
33	44,38	Ácido <i>n</i> -Hexadecanóico	16888001	1,59
34	45,61	2H-Piran-2-ona, 4-metóxi-6-[( <i>E</i> )-2-(2-metóxiifenil)etenil]	23651180	2,23
35	47,11	3-Fenoxibenzaldeído	364347270	34,28
36	47,49	4-Hidróxi-9-fluorenona	2463676	0,23
37	49,39	1(2H)-Dibenzofuranona, 3,4-dihidro-8-metóxi	17663311	1,66
38	50,35	( <i>Z,Z</i> )-9,12-Ácido Octadecadienóico	3783732	0,36
39	55,20	$\delta$ -Damascona	3675425	0,35

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 12 - Cromatograma do extrato etanólico de folhas de *A. parviflora*.



Observam-se nos extratos etanólicos alguns compostos que foram encontrados nos óleos essenciais, como linalol, cariofileno,  $\alpha$ -terpineol, (*E*)-nerolidol, espatulenol e o eudesmol. Nos extratos brutos de folhas e galhos foi observada a presença dos compostos aristoleno e 3-fenoxibenzaldeído, em grandes concentrações.

O sesquiterpeno cariofileno é conhecido pelo forte aroma e propriedades biológicas interessantes, entre as quais se destaca o potencial anticarcinogênico (SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007). O  $\alpha$ -terpineol, por sua vez, possui excelente atividade antibacteriana relatada (PARK et al. 2012). O sesquiterpeno (*E*)-nerolidol, utilizado como agente aromatizante de alimentos, apresentou bons resultados quando avaliado quanto a sua atividade antilesmânica (ARRUDA et al. 2005).

O 3-fenoxibenzaldeído é uma substância produzida a partir da degradação de piretróides sintéticos, compostos largamente utilizados como inseticidas (COLOMBO, YARIWAKEB e LANZA, 2104). Quando lançados no meio ambiente, os piretróides são rapidamente degradados por meio de processos bióticos e abióticos e seus metabólitos de degradação são amplamente encontrados no ambiente (JIN et al., 2010). Dessa forma, a presença do 3-fenoxibenzaldeído nos extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. parviflora* pode ser explicada pelo uso de tais inseticidas em sua área de plantio.

Tabela 8 - Composição química do extrato etanólico de galhos de *A. parviflora*.

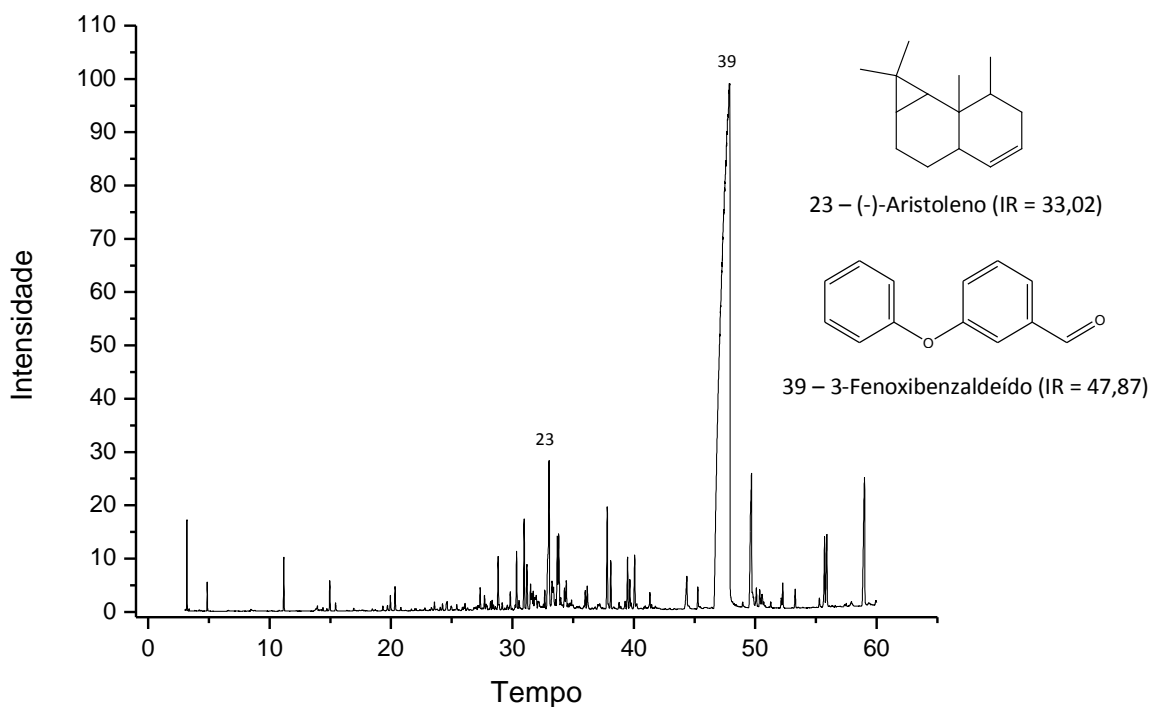
NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	3,19	Butirato de Etila	10349317	0,41
2	4,86	Ciclohexanona	4643980	0,18
3	11,17	Linalol	11698574	0,46
4	14,96	$\alpha$ -Terpineol	7004679	0,27
5	15,44	Acetato de $\beta$ -Sabinil	1917202	0,08
6	19,95	2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimetil	3819729	0,15
7	23,58	(1S,2S,3R,5S)-(+)-Pinanediol	2199835	0,09
8	24,62	Cariofileno	3656455	0,14
9	27,34	$\beta$ -Eudesmeno	5427373	0,21
10	27,70	(+)-Ledeno	3893427	0,15
11	28,19	$\beta$ -Bisaboleno	2050631	0,08
12	28,33	$\alpha$ -Cedreno	2345269	0,09
13	28,82	$\delta$ -Cadineno	15350361	0,60
14	29,82	Elemol	4380648	0,17
15	30,34	(E)-Nerolidol	14774136	0,58
16	30,54	Palustrol	2171830	0,09
17	30,54	Espatuleno	27624958	1,08
18	31,19	(-)-Globulol	15773645	0,62
19	31,61	$\alpha$ -Eudesmol	5577685	0,22
20	31,71	Guaiol	4810255	0,19
21	31,95	Cubedol	4152534	0,16
22	32,12	Epiglobulol	3150471	0,12
23	33,02	(-)-Aristoleno	71436097	2,80
24	33,39	$\alpha$ -Cadinol	8719492	0,34
25	33,55	$\delta$ -Cadinol	1805263	0,07
26	33,70	$\beta$ -Eudesmol	22190377	1,07
27	33,97	Cubenol	2512471	0,10
28	34,28	Hedicariol	6152693	0,24
29	34,43	$\beta$ -Bisabolol	7960155	0,31
30	35,99	1-Etoxinaftaleno	4758542	0,19
31	37,81	Benzoato de Benzila	31530344	1,24
32	38,78	(1S,2E,4S,5R,7E,11E)-Cembra-2,7,11-trien-4,5-diol	2008443	0,08
33	39,28	2,6,10,15,19,23-Hexametil-tetracos-2,10,14,18,22-pentaeno-6,7-diol	8623071	0,09
34	39,77	Androstano-17,19-diol, 3,3-etilenodioxi-4,4-dimetil	1749545	0,07
35	40,07	Monobenzona	16123060	0,63
36	41,32	Salicilato de Benzila	3809110	0,15
37	44,36	Dipalmitato de Ascorbila	13146210	0,52
38	45,27	Palmitato de Etila	5688479	0,22
39	47,87	3-Fenoxibenzaldeído	1833498828	71,96
40	49,69	8-Metóxi-3,4-dihidro-2H-dibenzofuran-1-ona	86632442	3,40
41	50,09	N-[(2-carbamoilfenil)carbamoil]-4-metilbenzamida	7079081	0,28
42	50,37	Linoleato de Etila	6596229	0,26
43	50,55	2,4,7,14-Tetrametil-4-vinil triciclo[5.4.3.0(1,8)]tetradecan-6-ol	5605656	0,22



44	52,14	2-Hidroxifenil 2-metoxibenzoato	3065490	0,12
45	52,26	Etil 6-metil-4-oxo-4H-cromeno-2-carboxilato	7827206	0,31

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 13 - Cromatograma do extrato etanólico de galhos de *A. parviflora*.



A seguir serão apresentados os componentes químicos encontrados nas partições de folhas e galhos de *A. parviflora* em diferentes solventes. Verifica-se que assim como o extrato bruto etanólico, as partições *n*-hexânica, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica apresentam alguns dos compostos encontrados nos óleos essenciais. Observa-se ainda que a quantidade de compostos nas partições diminuiu em relação ao extrato bruto, a medida em que ocorre o aumento de polaridade dos solventes utilizados.

Nas Tabelas 9 e 10 estão apresentados os componentes químicos encontrados nas partições *n*-hexânicas de folhas e galhos de *A. parviflora*. A partir da análise por CG-EM, 26 componentes foram identificados nessas partições, com base em seus espectros de massa e índices de retenção (IR), os quais foram comparados com o banco de dados da biblioteca NIST 05. Os cromatogramas obtidos para as partições *n*-hexânicas de folhas e galhos estão apresentados nas Figuras 14 e 15, repectivamente.

Tabela 9 - Composição química da fase *n*-hexânica de folhas de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	11,19	Linalol	18061640	1,69
2	13,70	$\alpha$ -Terpineol	7033192	0,66
3	24,49	Cariofileno	6798791	0,64
4	27,18	$\beta$ -Eudesmeno	8036620	0,75
5	30,36	( <i>E</i> )-Nerolidol	11997030	1,12
6	30,94	Espatuleno	170024792	15,90
7	31,19	Óxido de Cariofileno	70684997	6,61
8	31,51	(-)-Globulol	9873313	0,92
9	32,66	$\alpha$ -Eudesmol	12836406	1,20
10	33,00	(-)-Aristoleno	99407507	9,30
11	33,69	$\beta$ -Eudesmol	44820981	4,19
12	33,80	$\gamma$ -Eudesmol	43210837	4,04
13	33,96	Ledeno	9031744	0,84
14	34,28	Hedicariol	9905700	0,93
15	34,44	Longifolenaldeído	11057857	1,03
16	37,82	Benzoato de Benzila	58027473	5,43
17	40,19	Acetato de Fitol	16889030	1,58
18	41,33	Salicilato de Benzila	7851363	0,73
19	41,62	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	15428949	1,44
20	44,44	Ácido <i>n</i> -Hexadecanóico	13109853	1,23
21	46,97	N-(3-Clorofenil)-2-(2-oxo-2H-piridin-1-il) benzamida	266006961	24,91
22	48,91	Fitol	11466749	1,07

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

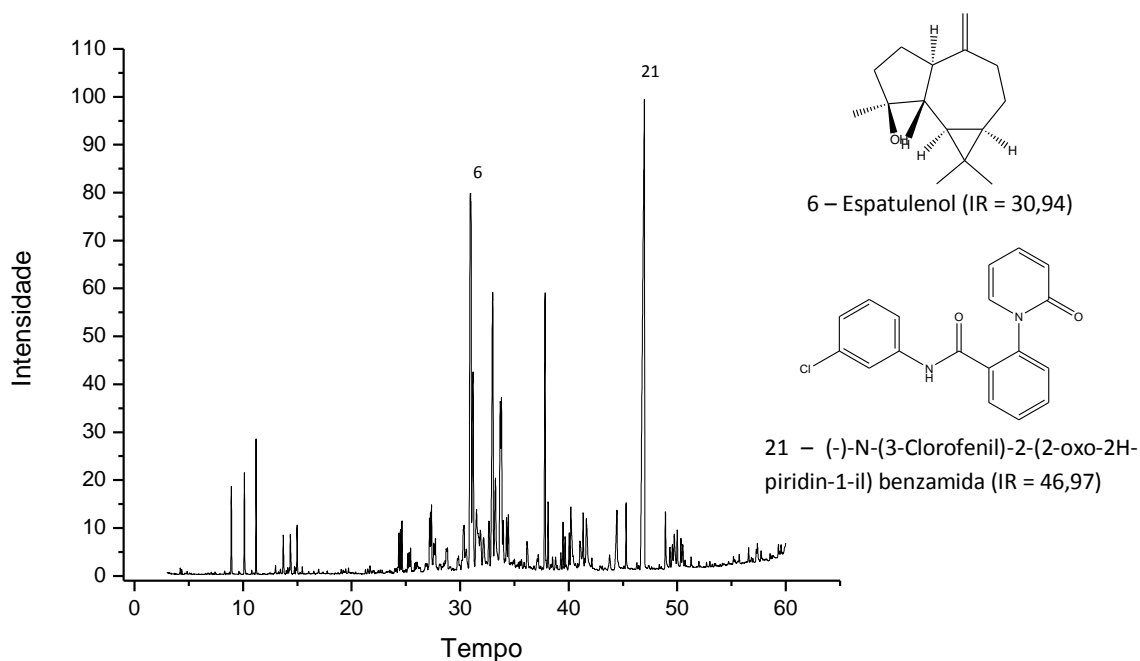
Figura 14 - Cromatograma da fase *n*-hexânica de folhas de *A. parviflora*.

Tabela 10 - Composição química da fase *n*-hexânica de galhos de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	11,22	Linalol	19606981	3,01
2	15,00	$\alpha$ -Terpineol	8921532	1,37
3	27,38	$\beta$ -Selineno	4761420	0,73
4	28,86	$\delta$ -Cadineno	10662430	1,64
5	29,86	Elemol	4488195	0,69
6	30,38	( <i>E</i> )-Nerolidol	15762713	2,42
7	31,00	Espatuleno	30650128	4,71
8	31,23	(-)-Globulol	17234524	2,65
9	31,53	Epiglobulol	7375976	1,13
10	31,64	$\alpha$ -Eudesmol	5347471	0,82
11	31,75	Guaiol	4095771	0,63
12	31,98	Widdrol	8518208	1,31
13	32,95	$\alpha$ -Cedreno	18584294	2,86
14	33,05	(-)-Aristoleno	57733565	8,87
15	33,42	Cubenol	5844228	0,90
16	33,73	$\beta$ -Eudesmol	22435648	3,45
17	34,31	Hedicariol	4919653	0,76
18	34,47	$\beta$ -Bisabolol	7863685	1,21
19	37,84	Benzoato de Benzila	36602732	5,62
20	39,69	$\beta$ -Elemeno	3362243	0,52
21	40,08	Monobenzona	6301771	0,97
22	41,36	Salicilato de Benzila	4467474	0,69
23	44,37	Ácido <i>n</i> -hexanóico	7799105	1,20
24	46,99	N-(3-Clorofenil)-2-(2-oxo-2H-piridin-1-il) benzamida	250980523	38,57
25	49,55	Ácido Linoléico	4090948	0,63

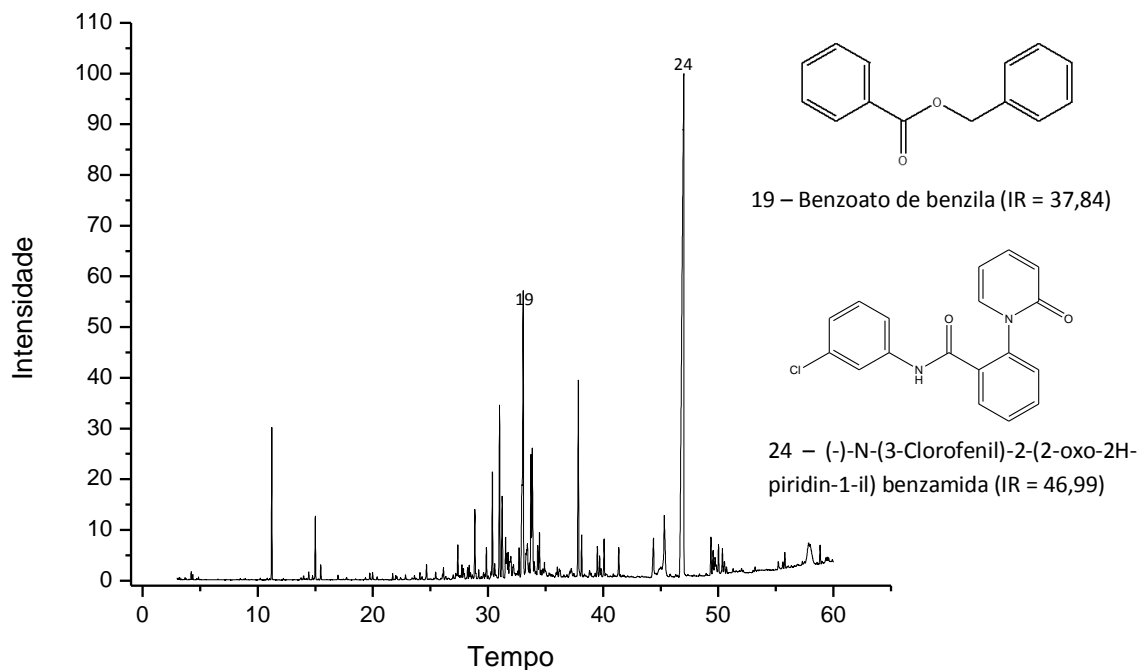
NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Observa-se nas partições *n*-hexânicas alguns compostos que foram encontrados nos extratos brutos, como o linalol,  $\alpha$ -terpineol, cariofileno, (*E*)-nerolidol, aristoleno e o benzoato de benzila. O benzoato de benzila é um composto com atividade imunoestimuladora descrita, indicando que este possa ser um candidato em terapias antitumorais (CHOI et al. 2005).

A presença de  $\beta$ -eudesmol e elemol em *A. parviflora* foi descrita anteriormente por Pereira (2011) e Tranchida et al. (2008), em trabalhos com o óleo essencial desta planta. Os compostos elemol e  $\beta$ -eudesmol possuem atividade repelente (CARROLL et al., 2010) e antiangiogênica (TSUNEKI et al., 2005), respectivamente.

Foi observado ainda que alguns compostos que foram identificados apenas nesta partição. Isso pode ter acontecido em função da maior capacidade deste solvente em extrair componentes com afinidade pela sua baixa polaridade.

Figura 15 - Cromatograma da fase *n*-hexânica de galhos de *A. parviflora*.



Nas Tabelas 11 e 12 estão apresentados os componentes químicos encontrados nas partições diclorometânicas de folhas e galhos de *A. parviflora*. A partir da análise por CG-EM, um total de 23 componentes foram identificados nas partições diclorometânicas, com base em seus espectros de massa e índices de retenção (IR), os quais foram comparados com o banco de dados da biblioteca NIST 05. Os cromatogramas obtidos para as partições diclorometânicas de folhas e galhos estão apresentados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Observa-se nas partições diclorometânicas alguns compostos que foram encontrados nos extratos etanólicos brutos, como linalol,  $\alpha$ -terpineol, cariofileno e (*E*)-nerolidol. E outros que, a exemplo da fase *n*-hexânica, foram encontrados nas partições, entre eles o bulnesol e *o*-xileno. Outros compostos encontrados, como etilbenzeno e 2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol não foram relatados para essa espécie em outros estudos. Pode-se observar ainda a presença dos compostos 3-fenoxibenzadeído, *o*-metil- $\delta$ -tocoferol e N-(3-clorofenil)-2-(2-oxo-2H-piridin-1-il) benzamida em grande concentração.

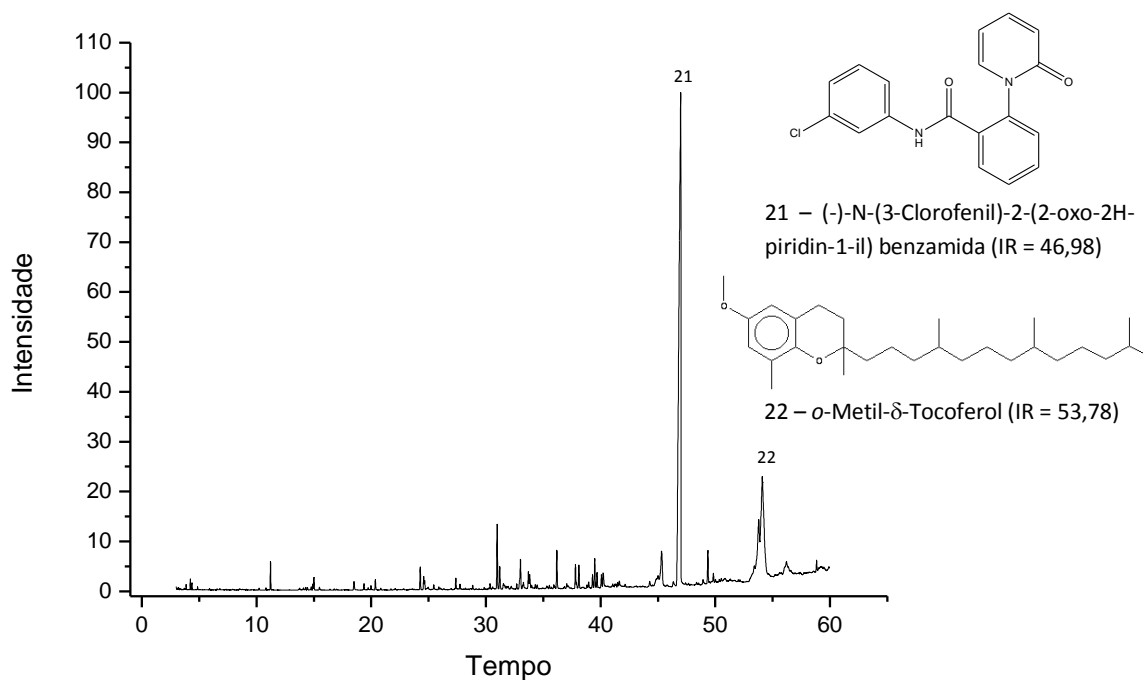
Tabela 11 - Composição química da fase diclorometano de folhas de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	4,23	Etilbenzeno	733703	0,19
2	4,37	<i>o</i> -Xileno	529609	0,14
3	11,22	Linalol	3331748	0,86
4	14,90	1,5-Octadieno-3,7-diol	625250	0,16
5	15,00	$\alpha$ -Terpineol	1498158	0,39
6	20,36	2-Hidróxi-1,8-Cineol	1301067	0,34
7	24,27	trans-2-Ciclohexen-1-ona, 4-hidróxi-3-metil-6-(1-metiletil)	3275859	0,85
8	24,67	Cariofileno	1229080	0,32
9	27,37	$\beta$ -Eudesmeno	1405666	0,36
10	30,98	Espatuleno	10357493	2,67
11	31,20	Óxido de Cariofileno	3759339	0,97
12	32,93	Bulnesol	693155	0,18
13	33,01	(-)-Aristoleno	4188513	1,08
14	33,71	$\beta$ -Eudesmol	2622109	0,68
15	33,82	$\alpha$ -Eudesmol	2436311	0,63
16	36,18	$\beta$ -Espatuleno	6094367	1,57
17	37,80	Benzoato de Benzila	3147581	0,81
18	39,69	$\beta$ -Elemeno	2370018	0,61
19	40,07	Monobenzona	1817652	0,47
20	45,31	2H-Piran-2-ona, 4-metóxi-6-[(E)-2-(2-metóxi-fenil)etenil]	6034156	1,56
21	46,98	3-Fenoxibenzaldeído	231776995	59,86
22	53,78	<i>o</i> -Metil- $\delta$ -Tocoferol	62306628	16,09
23	58,83	1,6-dimetil-3,8-dihidropiridazino[4,5-g]ftalazina-4,9-quinona	1817516	0,47

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

O composto *O*-Metil- $\delta$ -Tocoferol foi encontrado em quantidade significativa na fase diclorometânica de folhas de *A. parviflora*. A vitamina E (descrição genérica para todos os derivados de tocoferóis e tocotrienóis) está presente em diversas espécies da família Lauraceae. Ouchikh et al. (2011) reportaram a presença de  $\alpha$ -tocoferol em diversos órgãos de *Laurus nobilis*, sendo que as folhas de louro apresentaram as maiores concentrações. Singh et al. (2007) encontraram vitamina E na oleoresina obtida da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume).

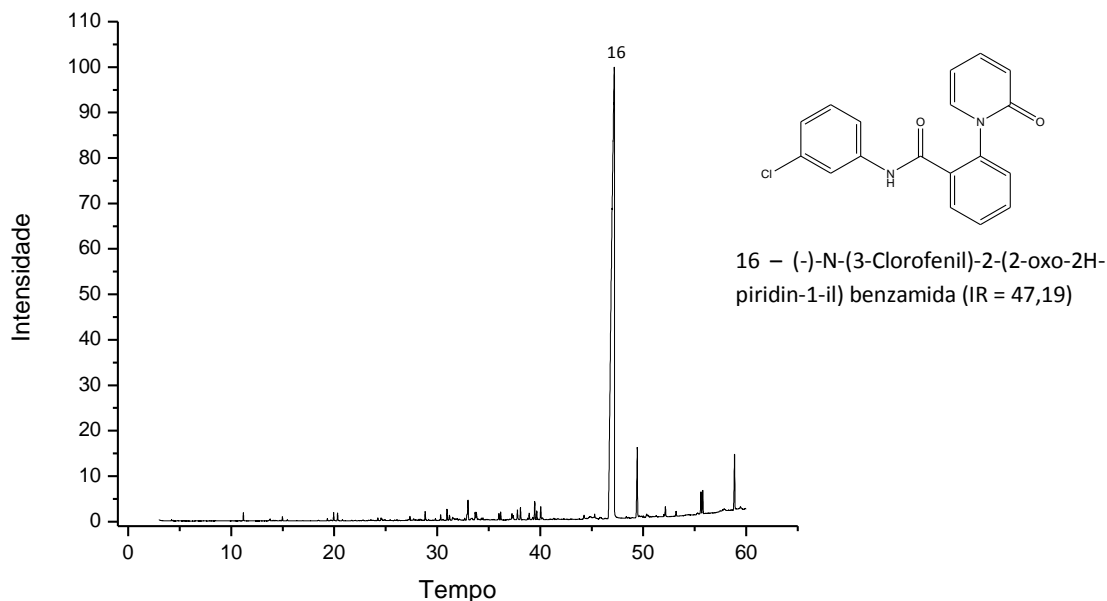
Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais e estão entre os antioxidantes naturais mais utilizados. A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia (RAMALHO E JORGE, 2006).

Figura 16 - Cromatograma da fase diclorometano de folhas de *A. parviflora*.Tabela 12 - Composição química da fase diclorometano de galhos de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	11,18	Linalol	1614837	0,22
2	19,95	2-Hidróxi-1,8-Cineol	1960313	0,27
3	28,83	$\delta$ -Cadineno	2091940	0,29
4	30,95	EspatulenoI	2807651	0,38
5	31,19	(-)-Globulol	1412561	0,19
6	32,89	$\alpha$ -Funebreno	2162931	0,30
7	32,99	(-)-Aristoleno	5344053	0,73
8	33,68	$\beta$ -Eudesmol	2060611	0,28
9	33,79	$\alpha$ -Eudesmol	2652785	0,36
10	35,99	1-Etoxinaftaleno	1535176	0,21
11	36,15	$\beta$ -EspatulenoI	2091429	0,29
12	37,79	Benzoato de Benzila	2417385	0,33
13	38,93	1,2,3,4,5,6,7,8-Octahidro-antraceno	1652422	0,23
14	39,66	$\beta$ -Elemeno	2243750	0,31
15	40,05	Monobenzona	3613075	0,49
16	47,19	N-(3-Clorofenil)-2-(2-oxo-2H-piridin-1-il) benzamida	624195286	85,38

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 17 - Cromatograma da fase diclorometano de galhos de *A. parviflora*.



Nas Tabelas 13 e 14 estão apresentados os componentes químicos encontrados nas partições acetato de etila de folhas e galhos de *A. parviflora*. A partir da análise por CG-EM, um total de 19 componentes foram identificados nas partições acetato de etila de *A. parviflora* com base em seus espectros de massas e índices de retenção (IR), os quais foram comparados com o banco de dados da biblioteca NIST 05. Os cromatogramas obtidos para as partições acetato de etila de folhas e galhos estão apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

Observam-se nas partições acetato de etila alguns compostos que foram encontrados nos extratos brutos, como linalol e  $\alpha$ -terpineol, e outros que, assim como nas demais fases citadas anteriormente, foram observadas apenas nas partições, como o 2,6-Dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol. Este composto possui propriedades organolépticas apreciadas na preparação de perfumes (MUELLER, 2010). Os compostos benzenoacetaldeído,  $\alpha$ -(2-furanilmetileno), N-(3-Clorofenil)-2-(2-oxo-2H-piridin-1-il) benzamida e tocoferol foram encontrados em altas concentrações nestas partições.

Tabela 13 - Composição química da fase acetato de etila de folhas de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	3,84	Diacetona	271692	0,11
2	11,20	Linalol	510455	0,21
3	18,47	2,6-Dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol	3543484	1,45
4	19,34	2-Hidróxi-1,8-Cineol	505140	0,21
5	23,56	(+)-Pinanediol	457725	0,19
6	24,25	4-Hidróxi-3-metil-6-propan-2-ilciclohex-2-en-1-ona	1686314	0,69
7	30,95	Espatuleno	1263895	0,52
8	36,16	$\beta$ -Espatuleno	3620814	1,48
9	38,08	$\alpha$ -Eudesmol	786147	0,32
10	39,27	Epiglobulol	760971	0,31
11	39,66	$\beta$ -Elemeno	555834	0,23
12	40,19	Acetato de Fitol	1602972	0,66
13	43,10	Palmitato de Etila	1483489	0,61
14	44,22	Palmitato de Retinol	565927	0,23
15	46,30	1-Fenoxinaftaleno	881667	0,36
16	46,77	3-Furan-2-il-2-fenil-propenal	54712881	22,37
17	48,52	Ácido Elaídico	1824517	0,75
18	57,53	2H-Piran-2-ona, tetrahidro-6-tridecil	1832705	0,75
19	58,21	DL- $\alpha$ -Tocoferol	85896614	35,12

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

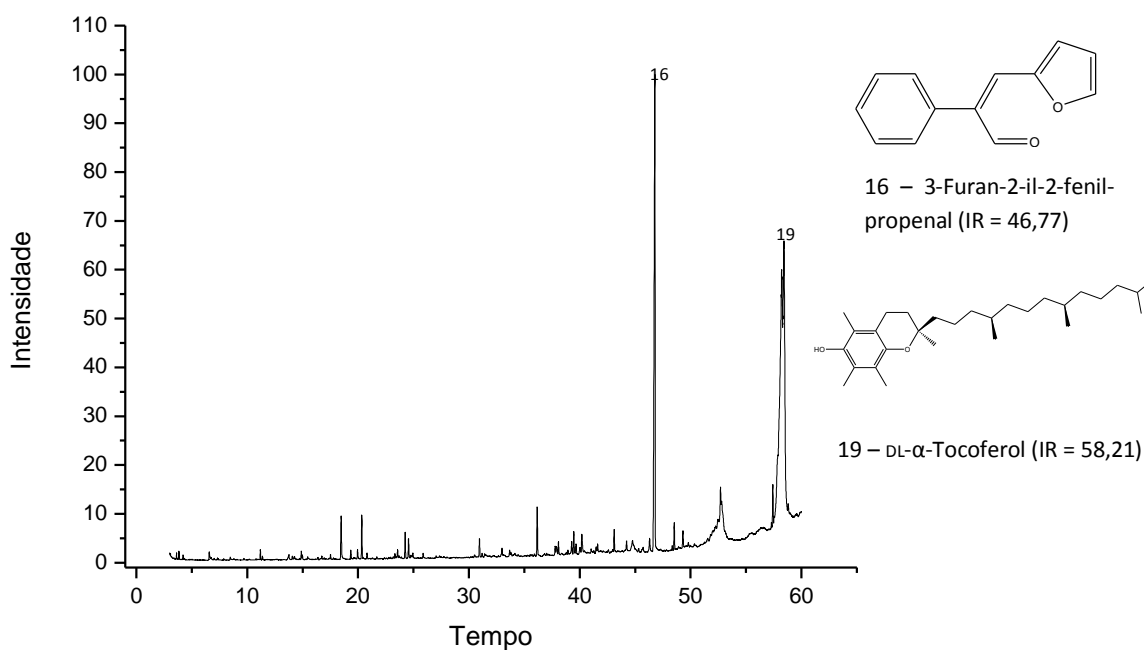
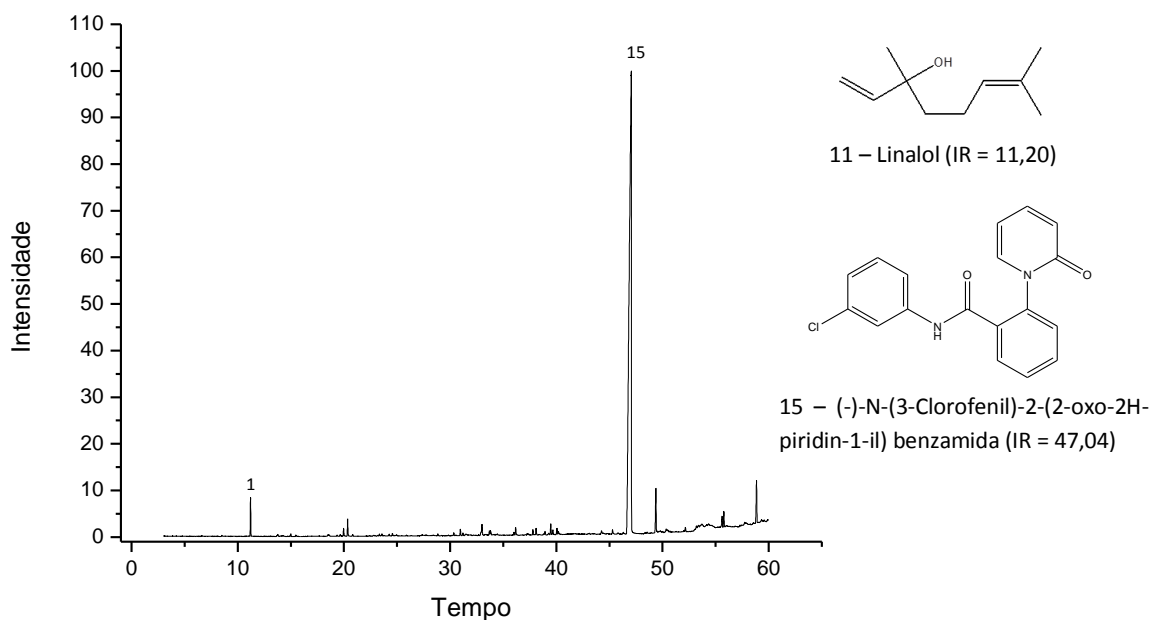
Figura 18 - Cromatograma da fase acetato de etila de folhas de *A. parviflora*.



Tabela 14 - Composição química da fase acetato de etila de galhos de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	11,20	Linalol	5957396	1,47
2	19,96	2-Oxabiciclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimetil	1492877	0,37
3	30,96	Espatuleno	1292869	0,32
4	31,20	(-)-Globulol	556549	0,14
5	32,91	Cubeno	788470	0,19
6	33,00	(-)-Aristoleno	2188965	0,54
7	33,69	$\beta$ -Eudesmol	924828	0,23
8	33,80	$\alpha$ -Eudesmol	1184945	0,29
9	36,17	$\beta$ -Espatuleno	1540722	0,38
10	37,79	Benzoato de Benzila	1009500	0,25
11	38,94	1,2,3,4,5,6,7,8-Octahidro-antraceno	677917	0,17
12	39,67	$\beta$ -Elemene	1028598	0,25
13	40,06	Monobenzona	1303779	0,32
14	44,25	Ácido <i>n</i> -Hexadecanóico	778033	0,19
15	47,04	N-(3-Clorofenil)-2-(2-oxo-2H-piridin-1-il) benzamida	349300915	86,25
16	55,60	4-Metóxi-6-[2-(4-metóxiifenil)etil]-2H-piran-2-ona	2320614	0,57

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 19 - Cromatograma da fase acetato de etila de galhos de *A. parviflora*.

Nas Tabelas 15 e 16 estão apresentados os componentes químicos encontrados nas partições hidroalcoólicas de *A. parviflora*. A partir da análise por CG-EM, um total de 9 componentes foram identificados nas partições hidroalcoólicas de folhas e galhos de *A. parviflora* com base em seus espectros de massa e índices de retenção (IR), os quais foram

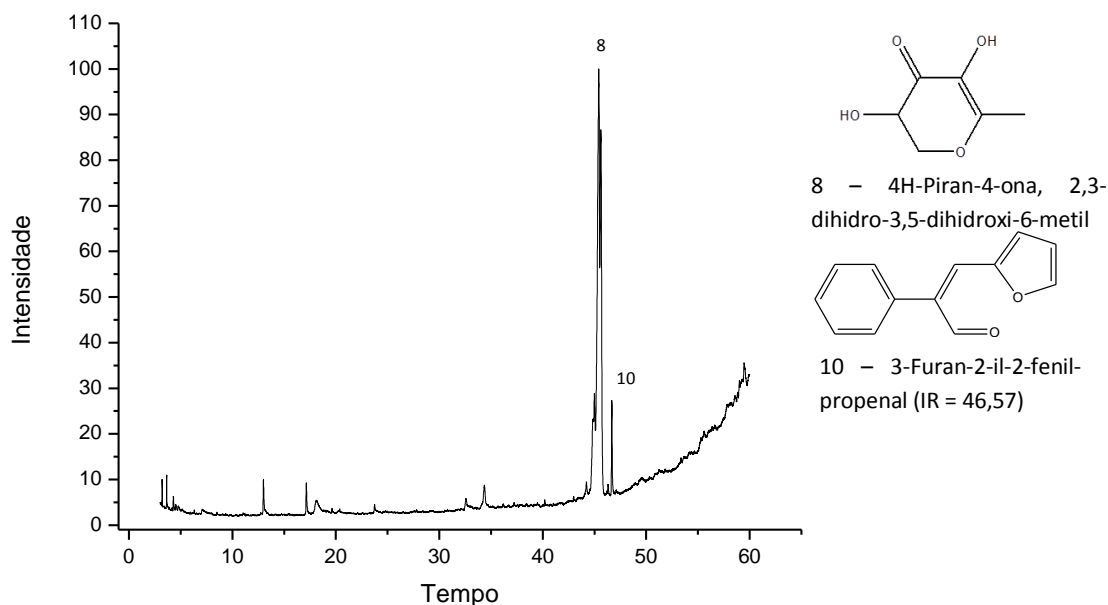
comparados com o banco de dados da biblioteca NIST 05. Os cromatogramas obtidos para as partições hidroalcoólicas de folhas e galhos estão apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Observa-se nas partições hidroalcoólicas que apenas o composto *n*-Butirato de etila também foi identificado nos extratos brutos. Os ésteres de ácido butírico, entre eles o *n*-Butirato de etila, possuem atividades antitumorais descritas, e são comumente usados em medicamentos, cosméticos, aditivos de perfumes ou como relaxantes musculares (MOHARRAM; MOSTAFA e ISMAIL, 2012). O composto piranona, identificado na partição hidroalcoólica de galhos, possui forte atividade antioxidante, segundo Yu et al. (2013).

Tabela 15 - Composição química da fase hidroalcoólica de folhas de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	3,21	Butirato de Etila	221906	0,36
2	3,65	Formato de Isopropila	251309	0,40
3	4,29	L-Ácido Láctico	274992	0,44
4	13,01	4H-Piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil	747199	1,18
5	17,14	$\alpha$ -Monoacetina	725639	1,15
6	34,35	$\gamma$ -Glicidoxipropiltrimetóxisilano	557001	0,88
7	44,84	2-Oxabiciclo[4.2.0]oct-4-en-3-ona, REL-(1R,6S,7S,8S)-5-metóxi-7-(2-metóxfenil)-8-(4-metóxi-2-oxo-2H-piran-6-il)-1-[(E)-2-(2-metóxfenil)etenil	3830543	6,06
8	45,41	2-Piranona	30673182	49,12
9	46,32	2,3,5-Trimetil-fenantreno	209712	0,33
10	46,57	3-Furan-2-il-2-fenil-propenal	2219524	3,51

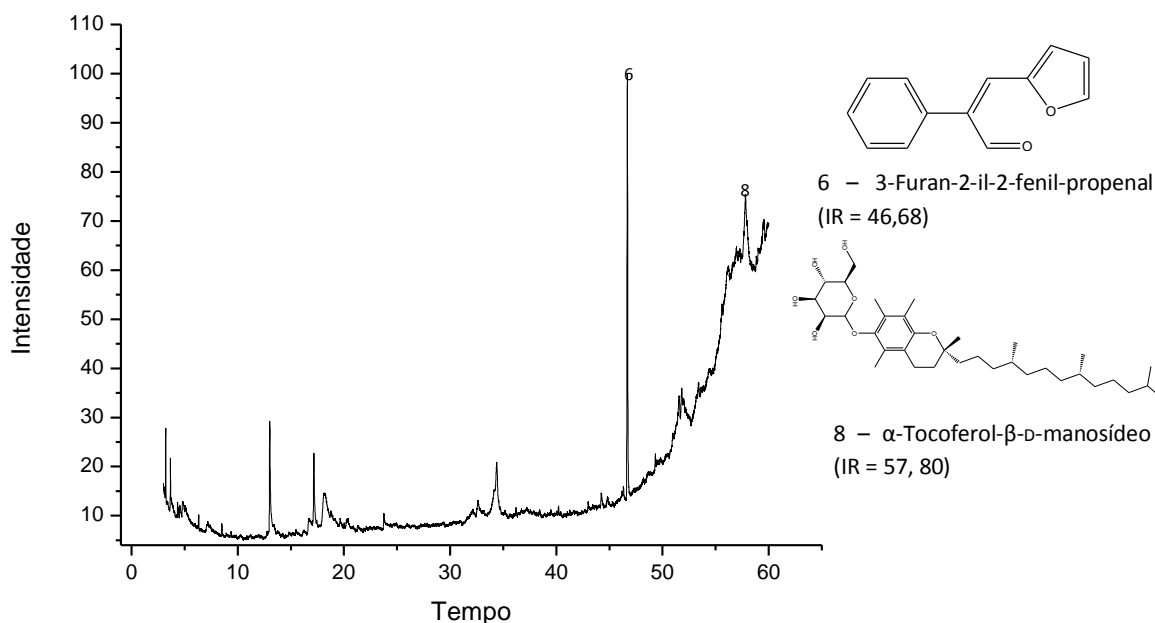
NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 20 - Cromatograma da fase hidroalcoólica de folhas de *A. parviflora*.Tabela 16 - Composição química da fase hidroalcoólica de galhos de *A. parviflora*.

NIE	IR	Identificação do composto (NIST 05)	Área	% Relativa
1	3,22	<i>n</i> -Butirato de Etila	267199	3,24
2	3,66	Formato de Isopropila	135486	1,64
3	13,01	4H-Piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil	948761	11,51
4	17,17	$\alpha$ -Monoacetina	635657	7,71
5	34,39	$\gamma$ -Glicidoxipropiltrimetóxisilano	329498	4,00
6	46,68	3-Furan-2-il-2-fenil-propenal	3537369	42,91
7	57,65	Éster metílico de $\beta$ -Alanina, N-metil-N-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)	184172	2,23
8	57,80	$\alpha$ -Tocoferol- $\beta$ -D-manosídeo	1139148	13,82
9	59,47	Éster isobutílico 2-norbornil de ácido fumárico	143648	1,74

NIE = Número de identificação no cromatograma; IR = Índice de retenção.

Figura 21 - Cromatograma da fase hidroalcoólica de galhos de *A. parviflora*.



Observa-se, portanto, que assim como outras espécies da família Lauraceae e do gênero *Aniba*, folhas e galhos de *A. parviflora* podem ser considerados como promissoras fontes de metabólitos secundários com inúmeras atividades biológicas conhecidas. Estes compostos, por sua vez, podem fazer parte de formulações fitocosméticas, agregando valor a estes produtos.

#### 5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA

A realização de uma pesquisa fitoquímica preliminar tem por objetivo conhecer os grupos de metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais, podendo a mesma ser direcionada a uma classe específica de constituintes ou substâncias responsáveis por uma atividade biológica.

Com a triagem fitoquímica dos extratos de galhos e folhas de *A. parviflora* e suas partições foi possível a obtenção dos resultados observados na Tabela 17.

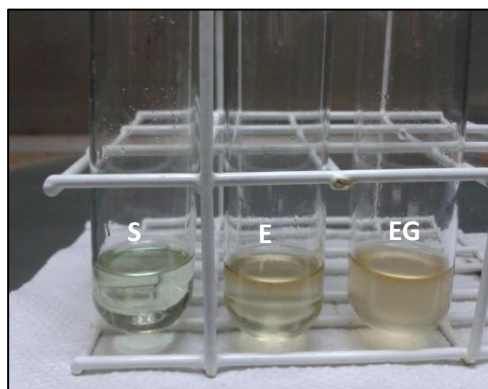
Tabela 17 - Resultados dos testes de triagem fitoquímica para óleos essenciais, extratos e partições de folhas e galhos de *A. parviflora*.

Amostras vegetais	Testes Realizados					
	Alcalóides	Triterpenos e Esteróides	Flavonóides	Saponinas	Fenóis/Taninos	
EBF	-	-	+	+	-	+
EBG	-	-	+	+	-	+
FHF	nr	nr	+	+	-	+
FHG	nr	nr	+	+	-	+
FDF	nr	nr	+	+	-	+
FDG	nr	nr	+	+	-	+
FAF	nr	nr	+	+	-	+
FAG	nr	nr	+	+	-	+
FHAF	nr	nr	+	-	-	+
FHAG	nr	nr	+	-	-	+

EBF = Extrato bruto de folhas; EBG = Extrato bruto de galhos; FHF = Fase hexânica de folhas; FHG = Fase hexânica de galhos; FDF = Fase diclorometano de folhas; FDG = Fase diclorometano de galhos; FAF = Fase acetato de etila de folhas; FAG = Fase acetato de etila de galhos; FHAF = Fase hidroalcoólica de folhas; FHAG = Fase hidroalcoólica de galhos; nr = Não realizado.

Inicialmente, foram realizados os testes apenas para os extratos brutos de folhas e galhos, em triplicata. A triagem fitoquímica dos extratos etanólicos mostrou que a reação de Lieberman-Burchard apresentou resultado negativo (Figura 22), indicando, portanto, a ausência de esteróides e triterpenos nas amostras de folhas e galhos de *A. parviflora*. Dessa forma, não foi realizado este teste nas partições.

Figura 22 - Resultado do teste para esteróides e triterpenos nos extratos brutos de folhas e galhos de *A. parviflora*.

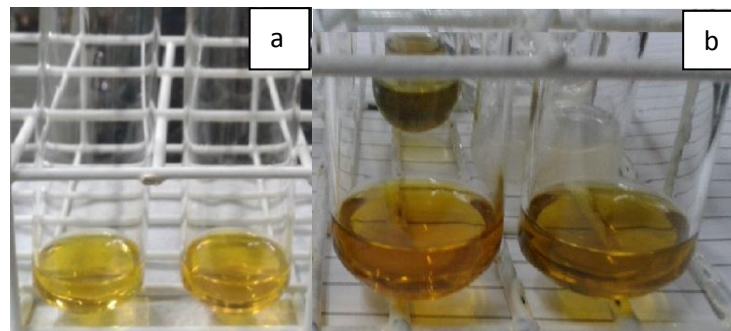


SP = Solução padrão; EF = Extrato de folhas; EG = Extrato de galhos.

Do mesmo modo, a reação de Dragendorff utilizado para verificar a presença de alcalóides, foi negativa para os extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. parviflora*, sugerindo, portanto, a ausência dessa classe de compostos.

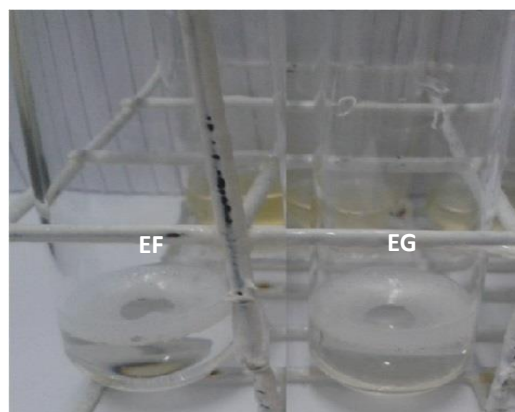
Nos teste realizados para verificar a presença de flavonóides, foi observado que as soluções adquiriram uma coloração vermelho alaranjada em todas as amostras de folhas e amarelada para galhos, ambas as cores indicativas da presença desta classe química nas amostras de *A. parviflora* avaliadas (Figura 23).

Figura 23 - Resultados dos testes para flavonóides em *A. parviflora*: (a) extratos de folhas e (b) extrato de galhos.



Já no teste realizado para verificar a presença de saponinas nos extratos etanólicos, foi verificada a formação de espuma quando a fração aquosa era separada e agitada fortemente por alguns minutos (Figura 24). No entanto, nas fases particionadas observaram-se resultados negativos, uma vez que não foi observada uma abundante formação de espuma quando comparados aos extratos brutos.

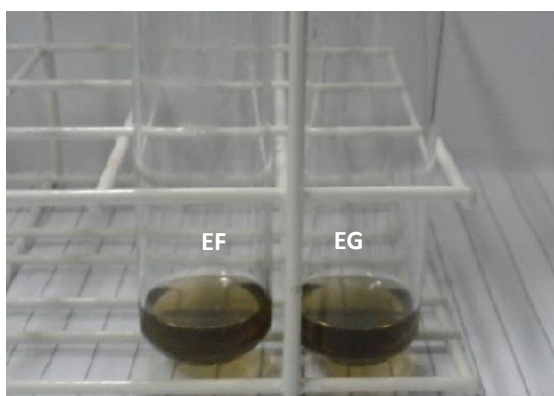
Figura 24 - Resultado do teste para saponinas nos extratos brutos de folhas e galhos de *A. parviflora*.



EF = Extrato de folhas; EG = Extrato de galhos.

As reações com cloreto férrico para verificar a presença de fenóis e taninos mostraram a aquisição de uma coloração verde em todas as amostras avaliadas, indicando a presença de taninos (Figura 25).

Figura 25 - Resultados do teste para fenóis e taninos nos extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. parviflora*, depois da reação com  $\text{FeCl}_3$ .



EF = Extrato de folhas; EG = Extrato de galhos.

O uso de testes químicos qualitativos para conhecer a composição química de extratos vegetais é um método rápido e de baixo custo, que possibilita identificar as classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico que estão presentes nos extratos. Dessa forma, o estudo fitoquímico de *A. parviflora* revelou a presença de flavonóides, taninos e saponinas nos extratos etanólicos e partições.

As classes de metabólitos encontrados em *A. parviflora* possuem potencial biológico reconhecido. Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Pesquisas avaliando o potencial biológico de taninos evidenciaram a ação destes compostos contra micro-organismos e, ainda, potencial anticarcinogênico (MONTEIRO; ALBUQUERQUE e ARAÚJO, 2007). As saponinas, por sua vez, são uma classe de compostos com ampla distribuição no reino vegetal, com potencial imunoadjuvante e hemolítico já reconhecidos (SIMÕES, 2006). Da mesma forma, os flavonóides são compostos aromáticos, com inúmeras atividades biológicas descritas, entre elas o potencial vasoprotetor, anti-inflamatório, antitumoral, e destacando-se principalmente o potencial antioxidante (SOUZA; MELLO e LOPES, 2011).

A partir da análise cromatográfica dos extratos e partições de folhas e galhos de *A. parviflora* verifica-se que não foi possível identificar compostos pertencentes às classes de flavonóides, saponinas e taninos, encontrados nos ensaios de triagem fitoquímica.

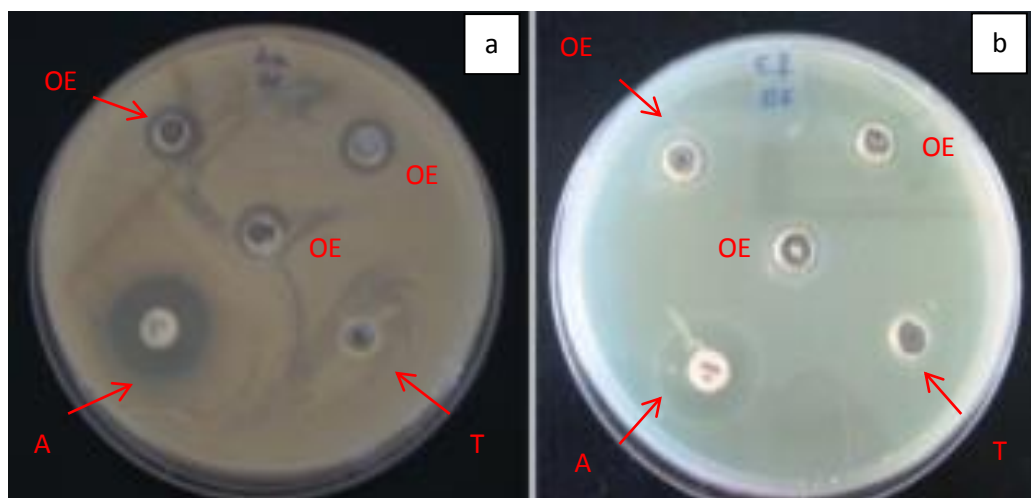
## 5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Após a obtenção do óleo essencial, extrato etanólico e as partições em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e água-etanol de folhas e galhos de *A. parviflora*, de acordo com os itens 4.2 e 4.3, estes foram preparados conforme o item 4.4, para a realização dos testes antimicrobianos. Os resultados dos testes de difusão em poços estão expostos na Tabela 18.

Os extratos e partições de folhas e galhos de *A. parviflora* não apresentaram atividade na concentração de 4,0 mg/mL contra nenhuma das bactérias testadas. Dessa forma, não foram realizados testes com os mesmos em concentrações superiores a 4,0 mg/mL, pois, além da possibilidade de um falso positivo, concentrações maiores são inviáveis econômica e fisiologicamente no desenvolvimento de novos antibióticos.

Já os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. parviflora*, testados na diluição de 1:10 em Tween 80 a 1%, apresentaram atividade antimicrobiana, com formação de halos de inibição superiores a 8 mm, para as bactérias Gram-positivas avaliadas (*S. aureus* e *E. faecalis*) como pode ser observado na Figura 26. Quando comparados ao antibiótico padrão Gentamicina, que apresentou halo de inibição de 17,7 mm para *S. aureus* e de 18,2 mm para *E. faecalis*, os óleos essenciais de *A. parviflora* foram considerados pouco ativos (ALVES, 2000), com halos de 11,0 e 9,0 mm para as respectivas bactérias.

Figura 26 - Resultados do teste de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de folhas de *A. parviflora*. Em (a) halo de inibição promovido pelo OE sobre *S. aureus*, controles positivo e negativo. Em (b) halo de inibição promovido pelo OE sobre *E. faecalis*, controles positivo e negativo.



OE= Óleo Essencial; A= Antibiótico; T= Tween 80 a 1%.



Tabela 18 - Halos de inibição resultantes da atividade antimicrobiana dos extratos, partições e do óleo essencial de folhas e galhos de *A. parviflora*.

Cepas Testes	Extratos de <i>A. parviflora</i> (mg/mL)										Óleo essencial (v/v)		Controle					
	EBF	EBG	FHF	FHG	FDF	FDG	FAF	FAG	FHAF	FHAG	OEF	OEG	GEN <sup>a</sup>	CET <sup>c</sup>				
<i>S. aureus</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	11 ± 0,1 <sup>b</sup>	11 ± 0,1 <sup>b</sup>	17,7 ± 0,7	NR				
<i>E. faecalis</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	9,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	9,0 ± 0,05 <sup>b</sup>	18,2 ± 1,3	NR				
<i>E. coli</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	26,2 ± 16,7	NR				
<i>P. aeruginosa</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	26,4 ± 1,34	NR				
<i>C. albicans</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	NR	25,3 ± 0,57				
<i>S. entérica</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	SA	SA	17,0 ± 0,1	NR		
<i>P. vulgares</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	SA	SA	15,5 ± 0,84	NR

EBF = Extrato bruto de folhas, EBG = Extrato bruto de galhos, FHF = Fase hexânica de folhas, FHG = Fase hexânica de galhos, FDF = Fase diclorometano de folhas, FDG = Fase diclorometano de galhos, FAF = Fase acetato de etila de folhas, FAG = Fase acetato de etila de galhos, FHAF = Fase hidroalcoólica de folhas, FHAG = Fase hidroalcoólica de galhos, OEF = Óleo essencial de folha, OEG = Óleo essencial de galho, GEN = Gentamicina, CET = Cetoconazol, SA = Testes que não apresentaram atividade, NR = Testes não realizados. Resultados expressos em Média ± DPM do halo de inibição (mm); Halos com a mesma letra indicam que não houve diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

Resultados de atividade antibacteriana de *A. parviflora* são escassos na literatura, mas o potencial antimicrobiano já foi encontrado em outras espécies do gênero. Klausmeyer et al. (2004) mostraram o potencial antifúngico de *A. panurensis* sobre cepas do gênero *Candida*, entre elas, *C. albicans* resistente. Simic et al. (2004) estudaram o potencial antifúngico de espécies de Lauraceas, onde destacaram-se os resultados positivos do óleo essencial de *A. rosaeodora* sobre todos os fungos testados, entre eles, espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, reconhecidos como patógenos humano e vegetal. Em outro trabalho, Rosato et al. (2010) encontram um bom potencial antimicrobiano do óleo essencial de *A. rosaeodora* em associação com o antibiótico Gentamicina sobre uma grande quantidade de estirpes 81 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Os resultados negativos em relação aos extratos e partições de folhas e galhos de *A. parviflora*, e ainda a baixa atividade dos OE em relação ao antibiótico padrão, ressaltam a importância de inferir sobre fatores que possam interferir no potencial antimicrobiano da planta. Fatores como o período de coleta, por exemplo, devem ser levados em consideração, uma vez que, no período seco a planta tende a sofrer mais injúrias pelas condições ambientais, podendo esta produzir uma maior quantidade de substâncias que possam defendê-la de tais estresses, garantindo sua sobrevivência, e levando à produção de compostos com grande potencial biológico, entre eles o antibacteriano (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Embora não se possa afirmar ao certo o mecanismo de ação dos OE nas células bacterianas, alguns estudos mostraram a maior sensibilidade de bactérias Gram-positivas à OE em relação a bactérias Gram-negativas. A maior sensibilidade de Gram-positivas pode estar associada às diferenças na parede celular bacteriana, possível sítio de atuação dos óleos essenciais. Em trabalhos que avaliaram a atividade de OE sobre Gram-negativas e Gram-positivas, foi sugerido que a relativa impermeabilidade da membrana externa, rica em lipopolissacarídeos, presente em Gram-negativas e responsáveis pelo caráter hidrofílico da superfície dessas bactérias, dificulta a ação de substâncias hidrofóbicas e assim pode torná-las menos sensíveis aos OE (DORMAN e DEANS, 2000; SMITH-PALMER *et al.*, 2001). Possivelmente os mecanismos de ação de óleos essenciais sobre as bactérias Gram-positivas dão-se através do contato direto dos compostos hidrofóbicos com os fosfolipídeos da membrana celular, levando a danos, ou rompimento desta, com conseqüente perda de nutrientes, desequilíbrio quimiostático e interferência no sistema de respiração celular (BARATTA *et al.*, 1998; KALEMBA e KUNICKA, 2003; PIEROZAN *et al.*, 2009).

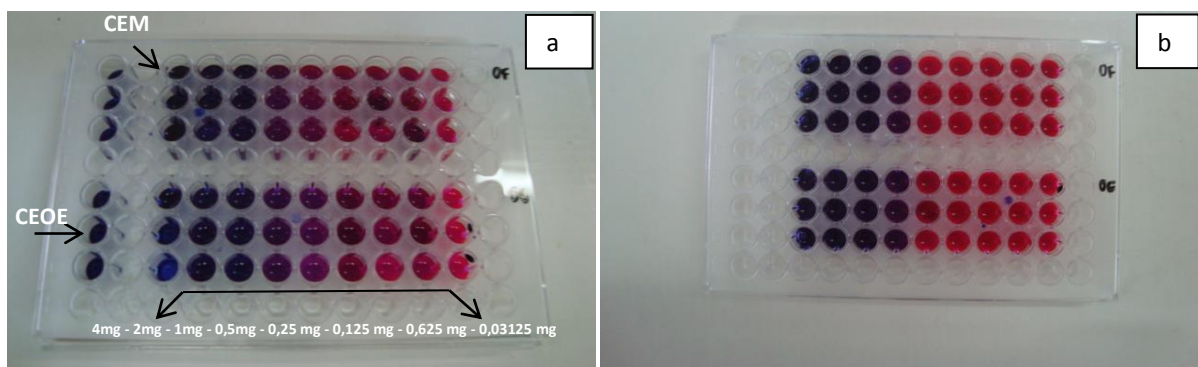
Em relação à composição química dos OE de *A. parviflora*, a análise cromatográfica indicou a presença do terpeno linalol, que pode estar associado com os resultados

encontrados. Os terpenos têm a capacidade de romper e penetrar na estrutura lipídica da parede celular das bactérias, levando à desnaturação de proteínas e da membrana celular e ao extravasamento do citoplasma e lise celular (DORMAN e DEANS 2000; OUSSALAH *et al.*, 2006). O linalol, em especial, possui muitas propriedades biológicas descritas, entre as quais o potencial anti-inflamatório, *in vitro* e *in vivo* (MEIXIA *et al.*, 2013), antibacteriano (PARK, *et al.*, 2012), repelente (YOON *et al.*, 2011) e antitumoral (MIYASHITA e SADZUKA, 2013).

Outros compostos presentes em cada um destes óleos, também podem ter participado no efeito antimicrobiano, inclusive com interações sinérgicas entre eles. Segundo Burt (2004), a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar relacionada a um efeito sinérgico entre seus constituintes. Entre eles o cariofileno,  $\beta$ -felandreno, nafitaleno entre outros.

Após a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *A. parviflora* por difusão em ágar, com formação de halos de inibição, foi realizado o ensaio qualitativo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima, menor concentração do OE capazes de inibir o crescimento bacteriano. Os resultados mostraram que os óleos essenciais foram capazes de inibir o crescimento bacteriano até a concentração de 2,0 mg/mL, evidenciado pela permanência de cor azul do reagente rezasurina (Figura 27).

Figura 27 - Determinação da CIM por ensaio de microdiluição para diferentes concentrações de OE sobre *S. aureus* (a) e *E. faecalis* (b).



CEOE = Controle de esterilidade do óleo essencial; CEM = Controle de esterilidade do meio de cultura.

Aligiannis *et al.* (2001) apresentaram a seguinte classificação para a concentração inibitória mínima de antimicrobianos: CIM até 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos. Portanto, os óleos essenciais de *A. parviflora* são considerados inibidores fracos.

Concentrações baixas de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento bacteriano são importantes para limitar qualquer efeito adverso que estes possam produzir no organismo quando empregados por suas propriedades (FISHER e PHILLIPS, 2008).

Considerando o desenvolvimento de resistência bacteriana frente aos antibacterianos disponíveis e o problema de saúde pública que isso representa, pode-se inferir que a pesquisa por busca de novos compostos antibacterianos, sobretudo de origem vegetal mostra-se de relevante significância. É possível observar o potencial antibiótico que os produtos vegetais possuem, entre os quais os óleos essenciais de *A. parviflora*, podendo estes serem largamente empregados como fármacos ou cosmeceuticos.

## 5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais de *A. parviflora* estão expressos em percentual de inibição e comparados com a atividade do ácido ascórbico, utilizado como padrão, visto que segundo Mensor et al. (2001), o ácido ascórbico possui alta atividade antioxidante. A partir da curva padrão da atividade do antioxidante para diferentes concentrações do ácido ascórbico e com o uso da Equação 3 (pag. 44), foi determinado o valor da Concentração Eficiente ( $CE_{50}$ ) de 113,34  $\mu\text{g/mL}$ . O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção da  $CE_{50}$  das amostras de *A. parviflora*.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais está relacionada à existência de compostos que possam doar íons hidrogênio para o radical DPPH na reação. Os resultados mostram que os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. parviflora* não apresentaram potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH $\cdot$ , quando comparados ao antioxidante de referência, o ácido ascórbico (Tabela 19). A baixa atividade antioxidante de óleos essenciais por avaliação pelo método DPPH já foi verificada em outros trabalhos. Polatoglu, Karacoç e Goren, (2013) observaram ao analisar os óleos essenciais de três espécies de *Achillea* (Asteraceae), que a atividade de varredura do radical DPPH era dependente da concentração do óleo, apresentando baixa atividade sequestradora no início da reação, com melhores resultados após uma hora de incubação e na mais alta concentração do óleo (20 mg/mL).

Em outro estudo Alcântara et al. (2010) avaliaram o potencial antioxidante dos óleos essenciais de *A. rosaeodora* e *A. panurensis*, e encontraram atividade varredora de radicais livres em ensaios qualitativos em placa cromatográfica, porém na análise quantitativa as concentrações consideradas ativas foram altas, sendo superiores a 700  $\mu\text{g/mL}$ . Segundo os mesmos autores, nenhum dos óleos essenciais avaliados apresentou em sua composição

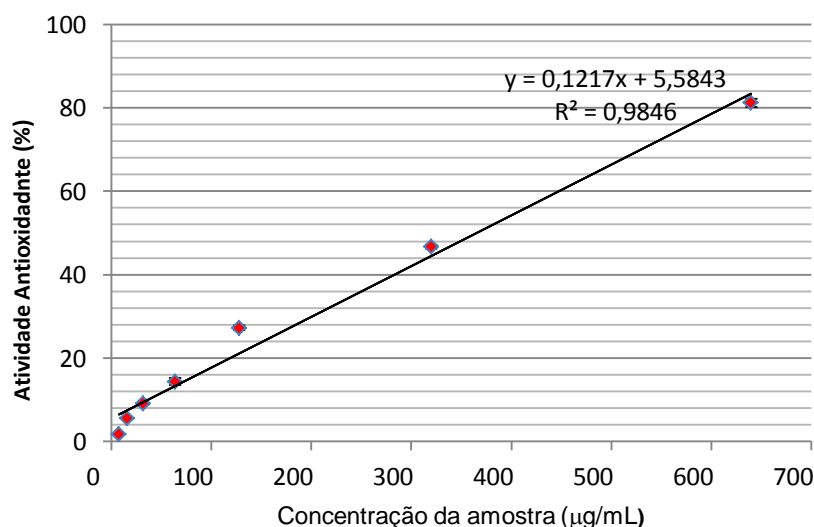
química compostos com atividade antioxidante reconhecida em quantidades significativas, tais como o  $\beta$ -cariofileno associado a compostos fenólicos (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

Tabela 19 - Atividade antioxidante dos óleos essenciais de folhas e galhos de *A. parviflora* em função da concentração e do tempo de reação expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média.

Óleo (mg/mL)	Atividade Antioxidante (AA%)					
	Óleos essenciais de folhas			Óleos essenciais de galhos		
	30min	60min	90min	30min	60min	90min
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
5	0,33 $\pm$ 0,29	0,42 $\pm$ 0,85	0,63 $\pm$ 0,30	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	0,65 $\pm$ 0,21	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
20	0,93 $\pm$ 0,21	0,09 $\pm$ 0,08	0,09 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,50
40	2,10 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,16	0,55 $\pm$ 0,54	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,51
80	2,75 $\pm$ 0,21	0,47 $\pm$ 0,21	0,34 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 1,81	0,00 $\pm$ 0,00
160	2,84 $\pm$ 0,35	1,40 $\pm$ 0,28	0,84 $\pm$ 0,79	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,67
320	4,66 $\pm$ 0,41	1,67 $\pm$ 0,24	0,96 $\pm$ 1,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,30
640	4,94 $\pm$ 0,35	1,63 $\pm$ 0,32	0,98 $\pm$ 0,92	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1280	6,62 $\pm$ 0,32	3,26 $\pm$ 0,44	1,85 $\pm$ 1,99	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

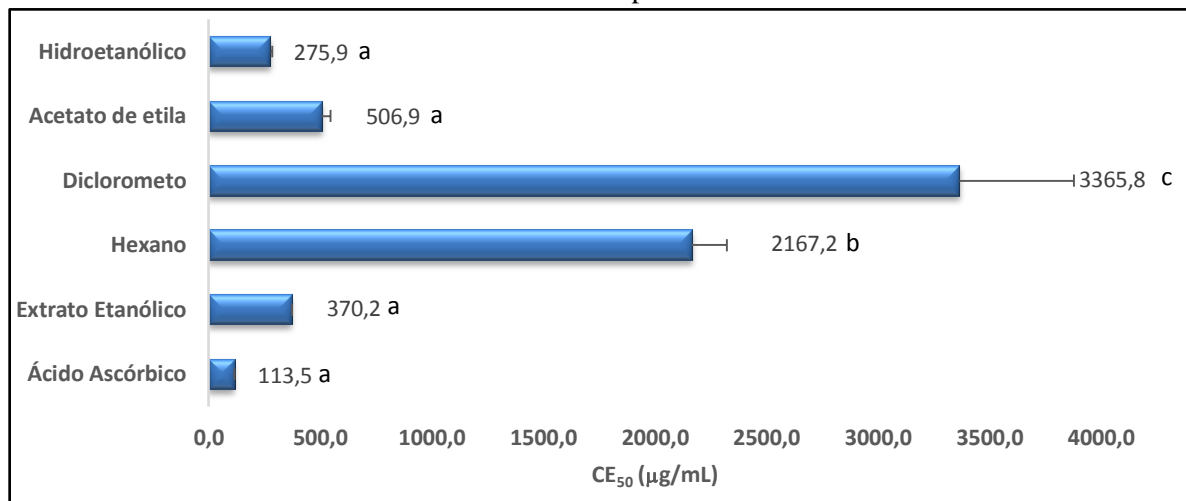
O extrato etanólico bruto das folhas mostrou uma percentagem de inibição diretamente proporcional à concentração do extrato adicionado, com coeficiente de regressão igual a 0,985 até a concentração de 640 mg/mL, com inibição de  $81,16 \pm 1,30\%$ . O percentual máximo de inibição foi verificado na concentração de 1.280 mg/mL, que correspondeu à inibição de  $87,17 \pm 0,30\%$  (Figura 28).

Figura 28 - Atividade antioxidante do extrato bruto de folhas de *A. parviflora* em função do aumento da concentração da amostra.



Os resultados mostram que o extrato etanólico bruto das folhas de *A. parviflora* apresentou uma atividade antioxidante 3,24 vezes menos eficiente ( $CE_{50} = 370,2 \mu\text{g/mL}$ ) do que o padrão ácido ascórbico ( $CE_{50} = 113,3 \mu\text{g/mL}$ ) (Figura 29).

Figura 29 - Concentração Eficiente ( $CE_{50}$ )<sup>\*</sup> do extrato bruto e partições de folhas de *A. parviflora* e do antioxidante padrão.



\*Resultados expressos em Média  $\pm$  DPM, letras diferentes indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

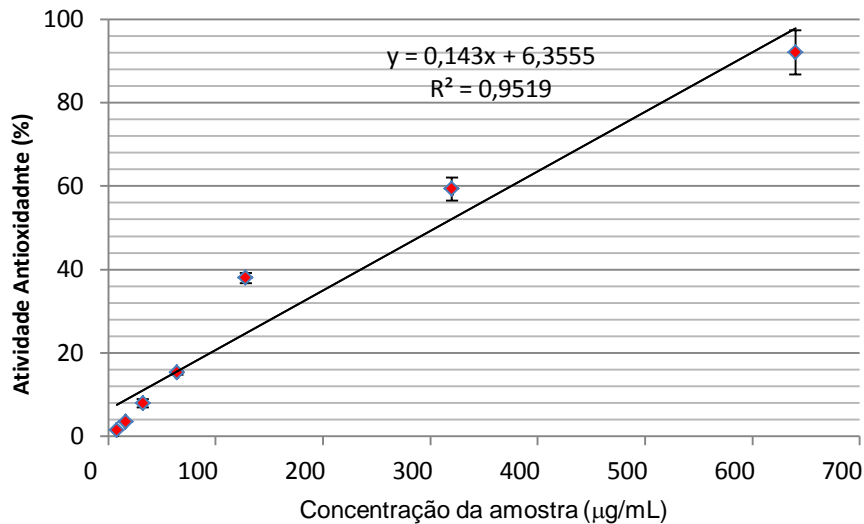
Foi verificado ainda, em relação aos extratos de folhas de *A. parviflora*, que a maior parte das substâncias responsáveis pela atividade antioxidante apresentada nos extratos brutos foi separada nas fases acetato de etila e hidroalcoólica, que possuem um caráter mais polar quando comparado aos outros solventes utilizados, apresentando  $CE_{50} = 506,9 \mu\text{g/mL}$  e  $CE_{50} = 275,9 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. As fases *n*-hexano e diclometano apresentaram baixa atividade antioxidante, sendo observada apenas nas concentrações mais altas de extrato (640 à 1280 mg/mL).

Uma vez que o ensaio utilizando o radical livre DPPH mede a capacidade das substâncias avaliadas em doar hidrogênio, quanto maior o número de hidroxilas presente nas amostras, maior seu potencial antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). O aumento do número de hidroxilas nas substâncias também aumenta sua polaridade, e consequentemente, essas substâncias podem ser extraídas nas fases mais polares da partição, o que explica a maior solubilidade das substâncias antioxidantes em solventes polares e, portanto, os resultados encontrados no ensaio antioxidante das folhas de *A. parviflora*.

Analisando o extrato etanólico obtido dos galhos de *A. parviflora*, foram observados resultados de atividade antioxidante semelhantes aos das folhas. Na Figura 30 pode-se observar a percentagem de inibição do radical DPPH, que segue diretamente proporcional ao

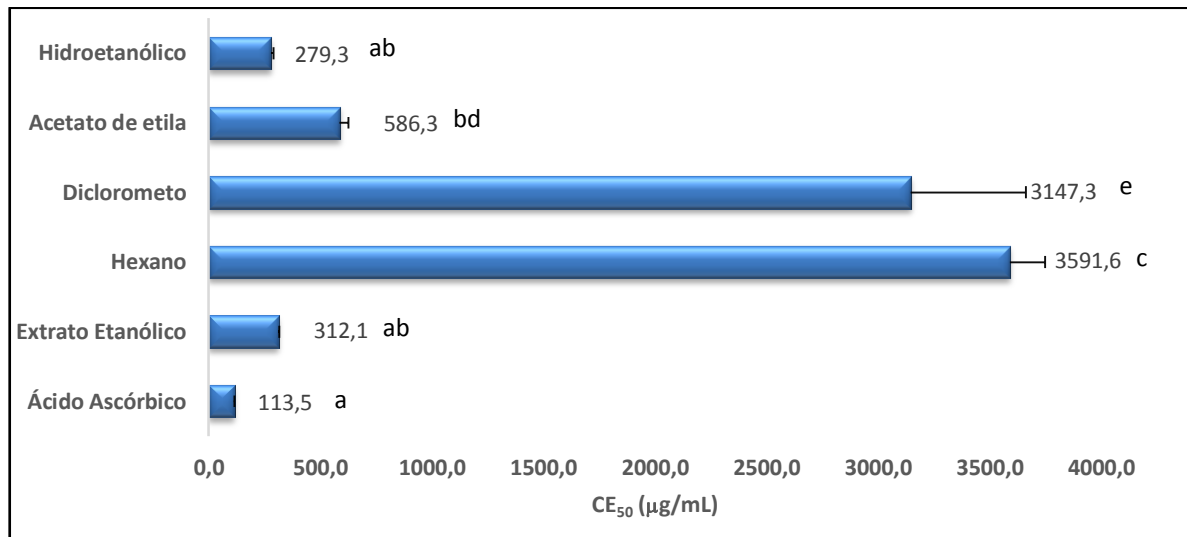
aumento da concentração do extrato, com coeficiente de regressão igual a 0,951, até a concentração 640 mg/mL, com inibição de  $91,85 \pm 0,1\%$ , sendo nessa concentração o percentual máximo de inibição.

Figura 30 - Atividade antioxidante do extrato bruto de galhos de *A. parviflora* em função do aumento da concentração da amostra.



O extrato bruto etanólico apresentou uma atividade antioxidante 2,7 vezes menos eficiente ( $CE_{50} = 312,1 \mu\text{g/mL}$ ) que o padrão (Figura 31).

Figura 31 - Concentração Eficiente ( $CE_{50}$ )<sup>\*</sup> do extrato bruto e partições de galhos de *A. parviflora*.



<sup>\*</sup>Resultados expressos em Média  $\pm$  DPM, letras diferentes indicam diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

Em relação aos resultados antioxidantes das partições, os resultados também são semelhantes aos encontrados nas folhas, onde a amostra em acetato de etila apresentou  $CE_{50} =$

586,3 µg/mL e a fase hidroalcoólica  $CE_{50} = 279,3$  µg/mL. As fases *n*-hexano e diclometano apresentaram atividade apenas nas maiores concentrações, sugerindo que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante dos galhos são similares aos das folhas, possuindo um caráter mais polar (Figura 31).

Apesar de não ser possível inferir com exatidão quais compostos são responsáveis pela atividade antioxidante apresentada pelos extratos e partições de *A. parviflora*, pode-se relaciona-la à presença de flavonoides com grupos doadores de hidrogênio ou elétrons na sua estrutura, verificada na triagem fitoquímica. Inúmeras pesquisas relatam diferentes atividades biológicas atribuídas para esta classe de compostos, entre as quais destacam-se como potentes antioxidantes (ALVES et al., 2007). Além disso, a possível presença de outros compostos polares contendo grupos hidroxila na sua estrutura, sobretudo a classe de taninos, encontrado na pesquisa fitoquímica, podem contribuir para a ação antioxidante dos extratos, uma vez que estes possuem propriedades supressoras de radicais peroxila reconhecidas (AURICCHIO et al., 2007).

Estudos sobre a atividade antioxidante de *A. parviflora* são escassos na literatura, mas outras duas espécies deste gênero (*A. rosaeodora* e *A. canelilla*), quando avaliadas pelo método do DPPH apresentaram bons resultados. Dessa forma, os resultados para atividade antioxidante dos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora* utilizando o radical livre DPPH· coincidem com os encontrados em outros estudos com espécies do gênero *Aniba*. Silva et al. (2007) encontraram atividade antioxidante nos óleos essenciais e extratos metanólicos de *A. canelilla*. Já no trabalho realizado por Silva (2012), observou-se que os extratos etanólicos de *A. canelilla* apresentaram uma percentagem de inibição do radical livre de 92,65% para folhas e 92,07% para galhos, mas os óleos essenciais de folhas e galhos não demonstraram atividade.

Os resultados encontrados mostram que os extratos etanólicos das folhas e galhos de *A. parviflora* possuem um bom potencial antioxidante que pode ser aproveitado na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos. Outros métodos devem ser utilizados para a análise dos óleos essenciais, tendo em vista que estes não apresentaram percentual de inibição significativo.

## 5.6 CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade realizados pelo ensaio do Alamar blue mostraram que mesmo nas maiores concentrações, os óleos essenciais, extratos e partições das folhas e



galhos de *A. parviflora* apresentaram baixa toxicidade em todas as linhagens estudadas. A Tabela 20 apresenta os valores de CL<sub>50</sub> (índice de citotoxicidade que causa a morte de 50% das células) encontrados. Pode-se observar que com 50 µg/mL, somente a fase diclorometano de folhas chegou a 50% de citotoxicidade para as linhagens celulares estudadas.

Tabela 20 - Resultados da avaliação de citotoxicidade dos óleos essenciais, extratos e partições de *A. parviflora*, expressos em percentagem de inibição à 50 µg/mL.

Amostras	Viab. Cel. em SKMELL19 (%)	Viab. Cel. em HCT116 (%)	Viab. Cel. em MCF7 (%)	Viab. Cel. em MRC5 (%)
OEF	100	95,5	85,6	100
OEG	100	97,9	91,1	100
EEF	95,4	98,3	83,1	100
EEG	91,5	90,1	87,6	100
FHG	90,9	94,3	79,1	98,4
FHF	88,5	91,3	82,7	99,7
FDF	52,8	44,9	27,8	40,2
FDG	67,8	76,6	43,5	73,1
FAG	77,6	77,3	63,3	77,6
FAF	75,4	100	67,8	91,1
FHAF	82,9	87,8	82,7	99,9
FHAG	74,5	77,5	76,7	89,2
Doxorrubicina (5,0 µg/mL)	16,7	10,5	14,7	10,2

OEF = Óleo essencial de folhas, OEG = Óleo essencial de galhos, EBF = Extrato bruto de folhas, EBG = Extrato bruto de galhos, FHF = Fase hexânica de folhas, FHG = Fase hexânica de galhos, FDF = Fase diclorometano de folhas, FDG = Fase diclorometano de galhos, FAF = Fase acetato de etila de folhas, FAG = Fase acetato de etila de galhos, FHAF = Fase hidroalcoólica de folhas, FHAG = Fase hidroalcoólica de galhos.

Trabalhos avaliando toxicidade de espécies de *Aniba* utilizando ensaios em cultura de células são escassos na literatura. Souer et al. (2011), a fim de explorar o potencial biológico do óleo essencial de *A. rosaeodora* em células da pele humana, investigaram primeiramente a citotoxicidade de óleos essenciais comercialmente disponíveis sobre linhagens de células de carcinoma epidermóide humano (A431), queratinócitos epidérmicos humano transformados (NHEK) e de queratinócitos normais primários (HEK001) utilizando o ensaio de MTT (Brometo de tetrazólio dimetiliazol-2,7-2,5-difenil tetrazólio). Os resultados mostraram que o tratamento dessas células com baixas concentrações de óleo ( $\leq 300$  nL/mL), não resultou em significativos efeitos citotóxicos. No entanto, em maiores concentrações do óleo (400 nL/mL), as células tumorais tiveram uma significativa redução da viabilidade, enquanto as células normais foram ainda pouco afetadas. Embora sejam linhagens celulares diferentes das utilizadas no presente estudo com *A. parviflora* e em concentrações inferiores, os resultados demonstram uma tendência das plantas desse gênero em não demonstrarem citotoxicidade em

células normais e, portanto, suas propriedades benéficas podem ser exploradas sem representar riscos aos usuários.

A avaliação da citotoxicidade fornece um importante parâmetro para avaliação da segurança na utilização dos compostos presentes em *A. parviflora*, visando uma possível ação farmacêutica destes. Os resultados encontrados são importantes, tendo em vista que óleos essenciais e extratos de *A. parviflora* apresentaram bons resultados em relação ao potencial antibacteriano e antioxidante, e não se mostraram citotóxicos para linhagem de células não tumorais MRC5.

## 5.7 FORMULAÇÃO COSMÉTICA

Além de fazer parte da biodiversidade amazônica e ser utilizada pela população local em banhos de cheiro, por seu perfume agradável, a espécie *A. parviflora* possui um bom potencial biológico além de baixa toxicidade, o que foi demonstrado pelos ensaios antioxidantes, antimicrobianos e de citotoxicidade realizados neste trabalho. Foi demonstrado ainda, que a espécie possui em sua composição química, classes de substâncias que são bem reconhecidas pelos seus benefícios a saúde humana e que podem, portanto, serem utilizadas nas indústrias farmacêutica e cosmecêutica.

Dessa forma, apresentam-se a seguir os resultados do desenvolvimento e dos testes de estabilidade preliminar de uma formulação cosmética do tipo emulsão, utilizando o extrato hidroalcoólico e óleo essencial de *A. parviflora*, baseado em um planejamento experimental de seus componentes.

### 5.7.1 Avaliação das Propriedades Organolépticas

Em geral todas as formulações obtidas adquiriram uma coloração branca, sendo possível observar que a quantidade de extrato influenciou na cor das amostras. Nas formulações em que, segundo o planejamento experimental, a quantidade do extrato glicólico de *A. parviflora* foi máxima e da base foi mínima, os extratos adquiriram uma coloração levemente mais escura. Os outros fatores não influenciaram visivelmente nas características das formulações. As propriedades organolépticas de aspecto, cor e odor das formulações desenvolvidas estão descritas na Tabela 21.

Tabela 21 - Propriedades organolépticas das formulações cosméticas de *A. parviflora*

<b>Formulação</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>
1	Homogêneo; Fluido; sem sinais de instabilidade.	Branca	Característico das essências utilizadas.
2	Homogêneo; Espesso; sem sinais de instabilidade.	Branca	Característico das essências utilizadas.
3	Homogêneo; Fluido; sem sinais de instabilidade.	Branca	Característico das essências utilizadas.
4	Homogêneo; Espesso; sem sinais de instabilidade.	Branca	Característico das essências utilizadas.
5	Muito fluido; com separação de fases.	Branca	Característico das essências utilizadas.
6	Homogêneo; Espesso; sem sinais de instabilidade.	Branca	Característico das essências utilizadas.
7	Homogêneo; Fluido; sem sinais de instabilidade.	Branca	Característico das essências utilizadas.
8	Homogêneo; Espesso; sem sinais de instabilidade.	Branca	Característico das essências utilizadas.

As formulações apresentaram odor com característica das essências utilizadas, consistindo em uma mistura do óleo essencial de *A. parviflora* e essência comercial de açai. Em geral, quando a quantidade de base utilizada estava no seu nível máximo, o aroma das formulações era mais brando em relação às essências utilizadas. Todas as formulações apresentaram ainda aspecto homogêneo, exceto a formulação 5, e coloração branca. Foi observada ainda uma grande diferença de fluidez entre as amostras, que foi avaliada mais detalhadamente com a análise da viscosidade.

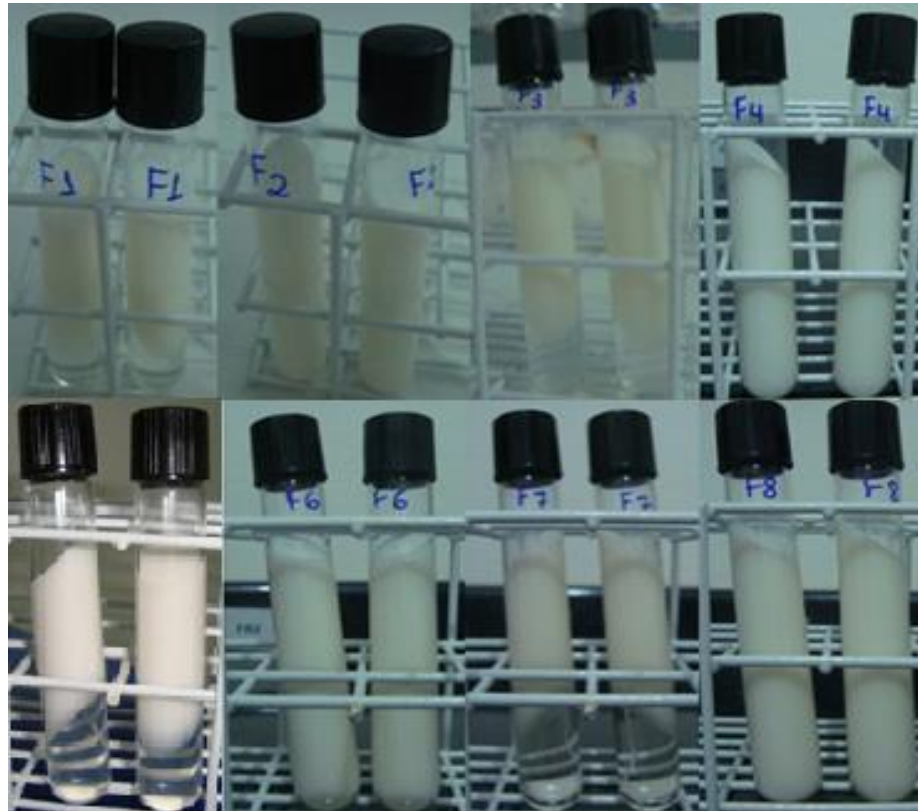
### 5.7.2 Análise de Centrifugação

A força da gravidade atua sobre os produtos de forma que as partículas que os compõem se movam no seu interior (ISAAC et al 2008). Dessa forma, segundo Brasil (2007), a centrifugação promove estresse na amostra pela simulação do aumento da força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade na emulsão, tais como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência. Sinais de instabilidade indicam necessidade de reformulação (ANVISA, 2008).

Após 24 h de preparo das formulações, foi realizado o teste de centrifugação. Foi verificado que somente quatro formulações mantiveram-se estáveis e com aspecto

homogêneo. As formulações 1, 3, 5 e 7 apresentaram separação de fases, sendo reprovadas na triagem das formulações, como pode ser observado na Figura 32.

Figura 32 - Formulações cosméticas após centrifugação: formulações 1, 3, 5 e 7 com separação de fases e formulações 2, 4 e 8 sem sinais de instabilidade.



Todas as formulações foram submetidas às análises físico-químicas, e somente as formulações que se mantiveram estáveis após a centrifugação foram avaliadas no teste preliminar de estabilidade.

Os próximos itens descrevem as respostas obtidas com o planejamento fatorial para as análises físico-químicas das formulações, onde 1 representa o componente Crodabase, 2 representa o componente Glicerina, 3 o componente Extrato glicólico de *A. parviflora* e 4 o componente Óleo vegetal.

### 5.7.3 Avaliação do pH

O pH é o logarítimo negativo da concentração molar de íons hidrogênio e representa convencionalmente a acidez ou a alcalinidade de uma solução (ANVISA, 2008). A determinação dos valores de pH é considerado fundamental no estudo de emulsões, uma vez que alterações bruscas de seu valor ao longo do tempo podem indicar modificações químicas

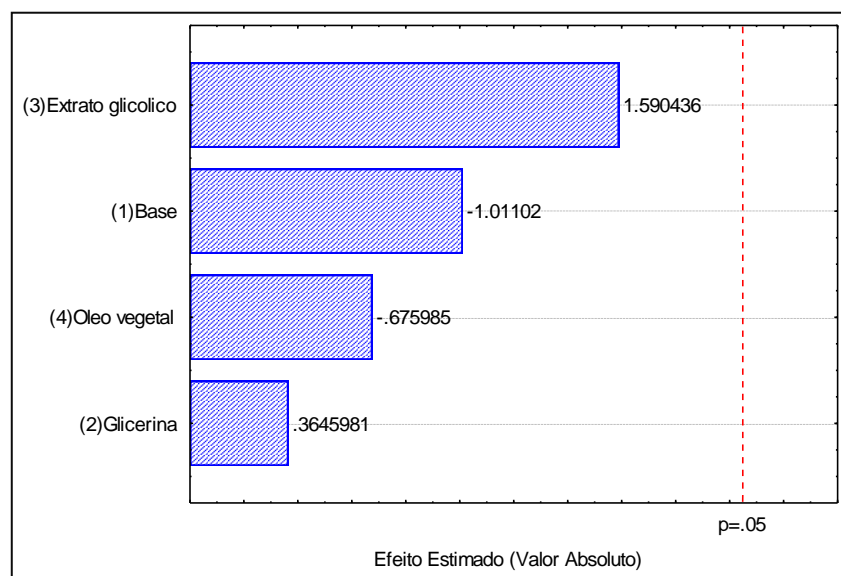
dos componentes presentes nas formulações, sugerindo incompatibilidade entre estes (CASTELI et al., 2008). Podendo-se ainda ajustá-lo ao valor de pH ótimo de ação para os componentes presentes na formulação.

Deve-se levar em conta ainda que a avaliação deste parâmetro em emulsões é importante para correlacioná-lo com o pH do corpo humano. Os valores próximos ao pH pertencente à pele, levemente ácido (4,6 – 5,8), torna as emulsões um meio de restrição ao crescimento de micro-organismos (LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002).

Os valores de pH encontrados variaram entre 3,65 para a formulação 2 e 5,01 para a formulação 5. Em média, os valores se aproximam do pH encontrado na pele, o que é uma característica importante para um cosmético. A formulação 2, embora tenha se mostrado estável nos teste de centrifugação, apresentou valores de pH mais ácidos, podendo este ser prejudicial a pele, uma vez que pode alterar o pH desta, expondo este tecido a uma série de agentes agressores, sendo necessário a correção do pH na formulação (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2001).

Através da análise do diagrama de Pareto, Figura 33, foi possível observar que o pH das emulsões não foi afetado significativamente por nenhum dos fatores avaliados no planejamento experimental, para um nível de confiança de 95%. Dessa forma, é possível afirmar que dentro da faixa de concentração utilizada no planejamento, esses fatores não alteram o pH das formulações.

Figura 33 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  obtido para o pH (a linha vertical define 5% de significância estatística).



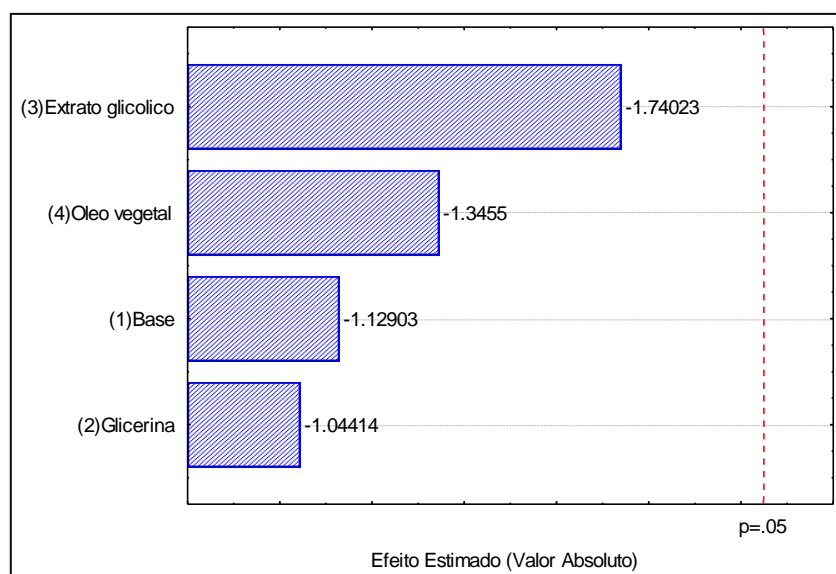
### 5.7.4 Avaliação da Condutividade Elétrica

Utilizada para medir a passagem da corrente elétrica no meio avaliado (ANVISA, 2004), a condutividade elétrica é extremamente sensível às variações do conteúdo iônico da solução. Dessa forma, tem sido amplamente utilizada para estimar o grau de ionização de micelas iônicas, assim como para estudar processos de auto-associação de micelas (MODOLON, 2009). Alteração na condutividade de sistemas dispersos pode ser indicativa de instabilidade, desse modo, o aumento desses valores podem indicar coalescência, enquanto a diminuição, sinalizar processos de agregação das moléculas (ANVISA, 2004).

Os valores de condutividade elétrica encontrados variaram entre 0,66 à 1,37  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para as formulações. Esses valores foram em média superiores aos encontrados por Pianovski et al. (2008) em emulsões cosméticas utilizando o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*), que tiveram valores variando entre 0,68 e 0,96. Apenas a Formulação 6 obteve valores próximos aos encontrados pelo autor.

Através da análise do Diagrama de Pareto (Figura 34) é possível observar que nenhum dos fatores avaliados no planejamento experimental influenciou significativamente a condutividade elétrica das amostras. Portanto, a adição de máximo ou mínimo da concentração dos fatores estudados não interfere na condutividade das formulações.

Figura 34 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  obtido para a condutividade (a linha vertical define 5% de significância estatística).



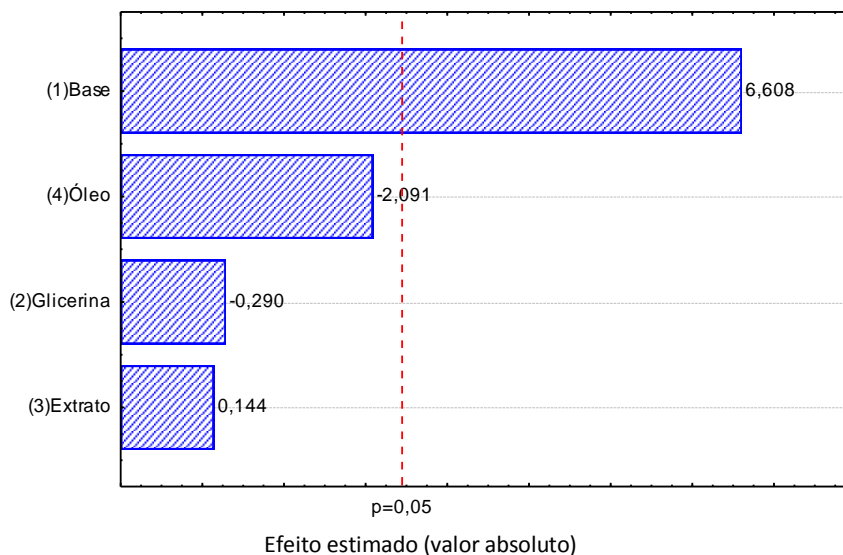
### 5.7.5 Avaliação da Viscosidade Dinâmica

A viscosidade consiste na resistência que o produto oferece à deformação ou ao fluxo (ANVISA, 2008). A avaliação desse parâmetro ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada, podendo indicar se a estabilidade é adequada, sobretudo ao longo do tempo (ANVISA, 2004).

A viscosidade de uma emulsão é influenciada pela composição de lipídios, pela proporção entre fase aquosa e oleosa, pela concentração de doadores de viscosidade e emulsionantes, assim como também, à presença de polímeros (SOUZA e FERREIRA, 2010).

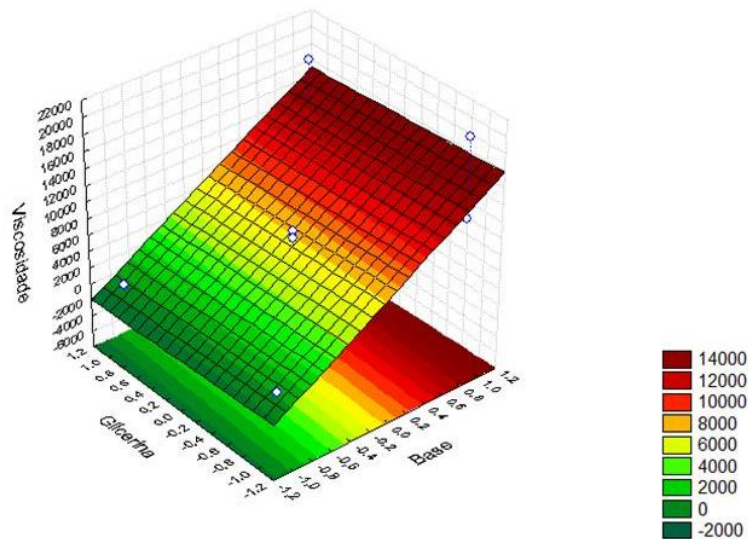
O Diagrama de Pareto, apresentado na Figura 35, para viscosidade dinâmica mostra que apenas o componente Base influenciou significativamente essa resposta, para um nível de confiança de 95%. O fator Base apresentou uma influência positiva sobre a viscosidade das formulações, de forma que o aumento da quantidade de Base causa o aumento da viscosidade dinâmica. Através da ANOVA, foi obtido o valor do coeficiente de determinação  $R^2 = 0,889$ , indicando 88% de linearidade da resposta.

Figura 35 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  obtido para viscosidade dinâmica (a linha vertical define 5% de significância estatística).



A Figura 36 mostra os efeitos das variáveis Base e Óleo vegetal na resposta viscosidade por meio da curva de contorno. O gráfico mostra que o máximo de densidade se encontra com níveis superiores de Base e inferiores de óleo vegetal.

Figura 36 - Superfície de contorno para a resposta viscosidade, variando os fatores Base e óleo vegetal (estatisticamente significativo).



A base não-iônica Croda utilizada para o preparo das formulações, é uma base auto emulsionante que permanece estável em uma ampla faixa de pH, assim como na presença de altas concentrações de eletrólitos (CASTELI et al. 2008). A influência do fator base sobre a viscosidade das formulações está relacionada com o aumento da fase oleosa nas formulações,

Em estudo feito por Andrade et al. (2007) os autores descreveram a influência de produtos emolientes sobre a viscosidade, o que não foi verificado neste trabalho, como demonstrado pelo diagrama de Pareto (Figura 35), onde observa-se que o óleo vegetal não afetou significativamente a viscosidade.

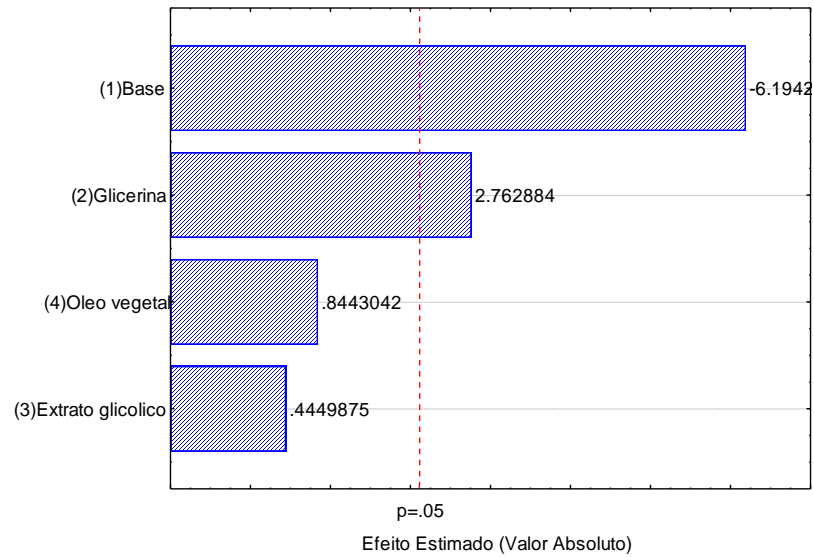
### 5.7.6 Avaliação da Densidade

A densidade específica é a relação entre densidade absoluta da amostra e a densidade de uma substância, no caso, a água (BRASIL, 2007), Além de demonstrar a instabilidade por alterações bruscas, relaciona-se também a sensação ao tato quanto a leveza da emulsão.

O diagrama de Pareto, apresentado na Figura 37, para a resposta densidade relativa mostra que os componentes Base e Glicerina influenciaram significativamente esta resposta, para um nível de confiança de 95%. O fator Base influenciou negativamente a resposta, assim, quanto maior a quantidade de base na formulação, na faixa de quantidade determinada no planejamento experimental, menor foi a densidade. O fator Glicerina, por outro lado, influenciou positivamente a resposta, assim, à medida que a quantidade de glicerina na formulação aumenta, ocorre um aumento da densidade. Através da ANOVA, foi obtido o valor do coeficiente de determinação  $R^2 = 0,671$ , indicando 67% de linearidade da resposta.

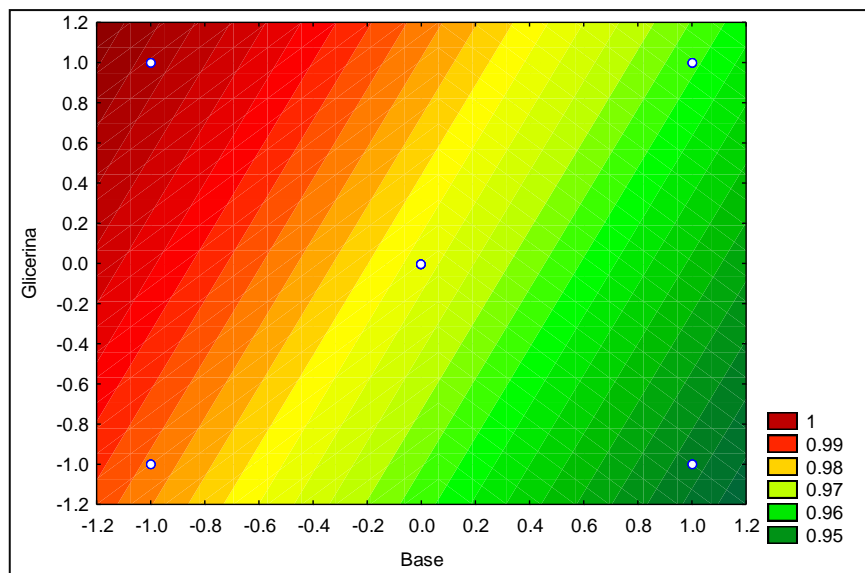


Figura 37 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  obtido para a densidade (a linha vertical define 5% de significância estatística).



A Figura 38 mostra os efeitos das variáveis Base e Glicerina na resposta densidade por meio da curva de contorno. O gráfico mostra que o máximo de densidade se encontra com níveis inferiores de Base e superiores de Glicerina.

Figura 38 - Superfície de contorno para a resposta densidade, variando os fatores Base e Glicerina (estatisticamente significativo).



A densidade de uma emulsão está relacionada à quantidade de água nesta (ISAAC et al. 2007). Assim, o aumento de Base nas formulações pode ter provocado o aumento da fase oleosa em relação à fase aquosa, ou ainda a perda de água, enquanto a glicerina por outro lado, promoveu a retenção da mesma.

### 5.7.7 Teste de Estabilidade Preliminar das Formulações Cosméticas de *A. parviflora*.

As emulsões classificadas como macroscopicamente estáveis após 24 h da formulação (F2, F4, F6 e F8) foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade, por um período de 15 dias (ANVIS, 2004). As amostras foram analisadas macroscopicamente e submetidas aos testes de centrifugação, ciclo gela-degela, estresse térmico, luminosidade e escuro. Foram feitas as análises de pH, condutividade, densidade relativa e viscosidade. Os resultados são descritos na Tabela 22.

Tabela 22 - Resultados dos parâmetros de avaliação do teste de estabilidade preliminar das formulações de *A. parviflora*.

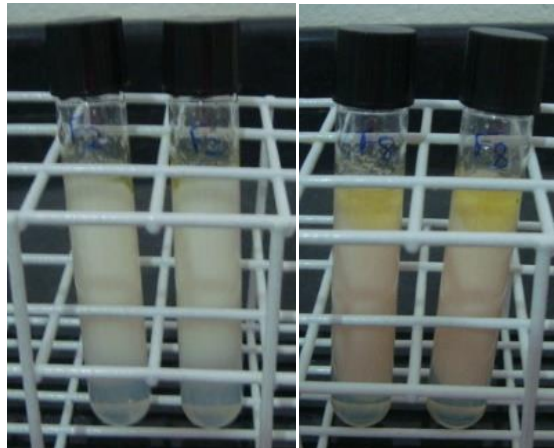
Amostras	Asp.	Cent.	pH	Conduct. (mS/cm <sup>3</sup> )	Dens. (g/mL)	Viscos. (cP)	
Controle (24 h após o preparo)	F2	N	S/S	3,65±0,04	1,31±0,48	0,95±0,03	10167
	F4	N	S/S	4,68±0,46	1,02±0,23	0,96±0,01	18000
	F6	N	S/S	4,40±0,54	0,88±0,09	0,93±0,03	19833
	F8	N	S/S	4,40±0,58	1,06±0,15	0,98±0,01	9567
Estresse Térmico	F2	M	C/S	4,65±0,61	1,61±0,32	0,94±0,02	6333
	F4	M	S/S	5,59±0,43	1,35±0,24	0,99±0,01	11467
	F6	M	S/S	5,50±0,54	1,39±0,17	0,98±0,01	9400
	F8	M	C/S	5,10±1,14	1,28±0,15	0,95±0,02	7067
Ciclo Gela-Degela	F2	M	C/S	5,15±0,91	1,67±0,19	0,97±0,00	10833
	F4	M	S/S	6,21±0,37	1,42±0,37	0,96±0,00	23417
	F6	M	S/S	6,12±0,22	1,65±0,13	0,93±0,00	11333
	F8	M	S/S	5,25±0,13	1,63±0,19	0,98±0,00	11000
Escuro	F2	N	S/S	3,99±0,32	1,12±0,36	0,97±0,01	23917
	F4	N	S/S	4,87±0,67	0,86±0,07	0,94±0,04	23583
	F6	N	S/S	4,85±0,73	0,91±0,05	0,93±0,04	15250
	F8	N	S/S	4,65±0,89	0,97±0,07	0,98±0,01	15167
Luz	F2	M	S/S	3,91±0,25	1,36±0,35	0,96±0,01	13933
	F4	M	S/S	4,65±0,57	0,98±0,09	0,97±0,02	20817
	F6	M	S/S	4,64±0,63	1,01±0,04	0,94±0,02	21500
	F8	M	S/S	4,33±0,75	1,09±0,15	0,98±0,00	20417

Asp. = Aspecto; Cent. = Centrifugação; Conduct. = Condutividade; Resist. = Resistividade; Dens. = Densidade; Visc. = Viscosidade; M = Modificada; N = Normal; S/S = Sem separação de fases; C/S = Com separação de fases.

Todas as emulsões submetidas ao ensaio preliminar de estabilidade (Estresse térmico, Ciclo Gel-Degela, Luz e Escuro) apresentaram mudanças em relação ao aspecto e parâmetros físico-químicos. Somente as formulações que foram submetidas ao Escuro não apresentaram modificações de aspecto. Na centrifugação, no entanto, observaram-se modificações nos parâmetros físico-químicos avaliados.

Quando submetidas à centrifugação, após o teste preliminar de estabilidade, a formulação F2 submetida ao estresse térmico e ciclo gela-degela, e a F8 submetida ao estresse térmico, mostraram-se instáveis, apresentando separação de fases, como pode ser observado na Figura 39. As demais formulações mostraram-se estáveis após a centrifugação.

Figura 39 - Formulação F2 submetida ao teste de estresse térmico (a); Formulação F8 submetida ao estresse térmico (b).



Em relação ao aspecto, as emulsões foram classificadas em normal, sem alteração visível: aspecto homogêneo, coloração branca, sem grumos aparentes, superfície lisa, odor característico da matéria-prima, ou seja, com propriedades iniciais mantidas ao longo das análises; ou modificada: aspecto heterogêneo, coloração amarelada, presença de grumos, separação de fases clara, opacidade, odor indicativo de rancidez, características que evidenciam alterações das propriedades iniciais (SPELLMEIER e HEBERLÉ, 2007). Neste parâmetro somente as formulações que foram submetidas ao escuro, durante os quinze dias de ensaio, mantiveram-se sem modificações em relação à formulação inicial.

Pode-se observar que todas as formulações que foram submetidas ao aumento de temperatura apresentaram modificações no odor, que se tornou característico de rancidez. Alterações no odor estão associadas a reações de oxidação (SOUZA e FERREIRA, 2010), indicando que os antioxidantes utilizados, BHT e extrato glicólico de *A. parviflora*, nas concentrações utilizadas, não foram eficientes para evitar processos oxidativos e consequente

degradação dos componentes das formulações. Processos oxidativos podem ter sido os responsáveis também pela alteração na cor das formulações, que por sua vez, adquiriram uma coloração amarelo/alaranjada (Figura 40).

Figura 40 - Formulações F2, F4, F6 e F8 com variação de coloração após serem submetidas ao ciclo gela-degela.



As formulações com modificação no aspecto apresentaram ao final dos quinze dias de teste preliminar de estabilidade endurecimento da superfície, observado, especialmente, nas formulações submetidas ao estresse térmico (Figura 41).

Figura 41 - Formulações F2, F4, F6 e F8 apresentando endurecimento da superfície após serem submetidas ao estresse térmico.



Segundo Souza e Ferreira (2010), o endurecimento é resultado da perda dos componentes hidrofílicos por evaporação, que ocorre de forma mais intensa na superfície, aumentando, dessa forma, a concentração dos componentes menos voláteis, geralmente mais consistentes. Ainda, segundo os mesmos autores, essa constatação pode ser reforçada pelo acúmulo de gotículas de água na superfície interna da tampa das amostras, o que também foi

observado nas formulações com *A. parviflora*. A ocorrência dessa condição pode ser resultado da ineficiência do umectante na concentração utilizada (FERREIRA, 2002). Deve-se ressaltar que o aumento da temperatura pode acelerar reações químicas nas emulsões, ou ainda causar a perda da atividade antioxidante, principalmente nas submetidas a temperaturas elevadas, como ocorre nas formulações expostas ao estresse térmico, ciclo gela-degela e expostas a luz solar (LANGE, HERBELÉ, MILÃO, 2009).

O aspecto de um cosmético em relação a características organolépticas, tais como, homogeneidade e coloração, é importante do ponto de vista comercial, tendo em vista sua influência sobre consumidor na compra do produto, que não se sente atraído pela aparência deste (ISAAC et al. 2008).

Em relação aos parâmetros físico-químicos foram observadas significativas alterações nos parâmetros avaliados, especialmente nas formulações submetidas aos testes de estresse térmico, ciclo gela-degela e exposição à luz. Vários fatores podem estar relacionados com a instabilidade físico-química de sistema emulsionado, entre estes, a escolha dos componentes, tipo e concentração de emulsificantes, velocidade de agitação, tempo de aquecimento e arrefecimento, quantidade das fases, temperatura e ambiente de estocagem e, ainda, a contaminação microbiológica do produto (IDSON, 1993; RIEGER, 1996; SCHUELLER e ROMANOWSKI, 2000; ALVAREZ et al. 2007).

As formulações apresentaram um comportamento instável em relação a viscosidade ao longo dos testes de estabilidade, com alterações particulares à cada formulação. Alterações na viscosidade podem ser relacionadas à concentração do umectante empregado (SILVA et al. 2013). Por se tratar de um planejamento experimental, com variação dos valores de glicerina, umectante utilizado neste estudo, pode-se inferir que este componente foi o responsável pelas variações de viscosidade encontradas. Pode-se observar a diminuição do valor da viscosidade nas formulações submetidas à temperatura elevada, que está associada à perda dos componentes hidrofílicos (SPELLMEIER e HEBERLÉ, 2007) ou aumento da fase oleosa.

Todas as formulações, ao longo do tempo de análise (15 dias), apresentaram alterações nos valores médios de seus pHs, especialmente as formulações submetidas ao estresse térmico e ciclo gela-degela que apresentaram variações expressivas nesse parâmetro. A avaliação do pH é muito importante no estudo de emulsões, tendo em vista que alterações bruscas nesses valores podem sugerir modificações químicas dos componentes presentes nas formulações (CASTELI et al. 2008). As formulações que permaneceram no escuro por quinze dias podem ser consideradas estáveis em relação ao pH, uma vez que não apresentaram variações expressivas e mantiveram-se na faixa de pH dermatológico (entre 4,6 e 5,8).

Os valores de condutividade variaram em todas as formulações. Observou-se uma tendência no aumento da condutividade nas formulações quando submetidas ao aumento de temperatura.

Em relação à densidade, a variação dos valores entre as formulações e as condições que estavam expostas foi pequena, portanto não há como inferir se esta propriedade promoveu instabilidade nas formulações avaliadas.

As formulações que foram submetidas ao estresse térmico apresentaram redução nos valores de viscosidade, o que não foi observado nos demais ensaios. A elevação da temperatura, comumente, causa redução no valor da viscosidade, o que permite as gotículas da fase interna da emulsão colidirem com maior magnitude, causando modificações físicas na amostra. Dessa forma, este teste permite demonstrar mais rapidamente a tendência dos veículos emulsionados em apresentar sinais de instabilidade como cremeação, sedimentação e separação de fases (RIEGER, 1996).

As formulações que permaneceram no escuro e em temperatura ambiente por quinze dias, apesar de apresentar variações dos parâmetros físico-químicos: pH, condutividade, resistividade, densidade e viscosidade, não foi considerada instável, em razão de ter apresentado estabilidade em relação ao aspecto e centrifugação, e devido as variações não serem tão significativas.

Portanto, analisando os valores encontrados, pode-se sugerir a formulação F4 como a mais estável, uma vez que esta apresentou menores variações nos testes de estabilidade, e os sinais de instabilidade mais brandos em relação as demais. Dessa forma, as concentrações dos componentes desta formulação podem ser utilizadas para a realização da otimização de uma formulação cosmética a partir de *A. parviflora*.

É importante avaliar ainda os efeitos produzidos pelo óleo essencial e extrato de *A. parviflora* nas formulações, a fim de verificar se estes conferiram efeitos desejáveis nas emulsões, uma vez que ambos possuem atividades biológicas comprovadas, antibacteriana e antioxidante, respectivamente.

## CONCLUSÃO

Os resultados indicam a potencialidade do emprego de *Aniba parviflora*, por meio da utilização dos óleos essenciais, extratos etanólicos e partições acetato de etila e hidroalcolico obtidos de suas folhas e galhos para pesquisa visando o desenvolvimento de produtos cosméticos com ativos naturais. Dentro dos limites dos ensaios avaliados, pode-se concluir que:

- Os extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. parviflora* possuem potencial antioxidante, e, portanto, podem ser incorporados em formulações cosméticas que visam o combate a radicais livres. Para obter-se melhores resultados é ideal a realização de partições líquido-líquido obtendo-se uma fase hidroalcolica, que apresentou, neste estudo, os melhores resultados de percentual de inibição do radical DPPH. Os óleos essenciais de folhas e galhos não apresentaram atividade antioxidante apreciável.
- Os óleos essenciais obtidos de folhas e galhos de *A. parviflora* possuem ainda potencial antibacteriano, contra importantes cepas patogênicas, incluindo *S. aureus*, e podem ser utilizados em formulações cosméticas com ativo natural, uma vez que não possuem perfil citotóxico contra células humanas. Não foi verificado potencial antimicrobiano nos extratos e partições.
- O planejamento experimental aplicado para o estudo da formulação de um fitocosmético a partir do óleo essencial e extrato glicólico de *A. parviflora* mostrou que a base foi o fator que mais influenciou as características organolépticas e as propriedades físico-químicas das oito formulações que foram obtidas.
- As formulações cosméticas acrescidas de óleo essencial e extrato glicólico de *A. parviflora* mostraram-se macroscopicamente instável ao serem submetidas aos testes de estabilidade preliminar que utilizaram mudanças de temperatura. Tendo em vista esses resultados, as formulações avaliadas não podem seguir para os testes de estabilidade acelerada, tampouco de prateleira, sendo necessários novos lotes em diferentes composições para o estudo da interação dos componentes da formulação.
- O perfil químico de *Aniba parviflora* mostrou a existência de importantes compostos químicos, entre eles o Linalol,  $\alpha$ -Terpineno, Cinemeno, Cariofileno e  $\beta$ -felandreno, que possuem propriedades biológicas descritas na literatura. Portanto, esta espécie pode ser utilizada como fonte desses compostos para a indústria cosmeceutica.

Tendo em vista os resultados encontrados neste estudo e o fato de *A. parviflora* ser pouco descrita na literatura, foi possível contribuir para o conhecimento químico e biológico

desta espécie amazônica. Porém, faz-se necessário a realização de novas pesquisas que visem avaliar outras propriedades biológicas dessa espécie, bem como a elucidação de todos os seus componentes químicos.



## REFERÊNCIAS

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1739-1745. 1998.

AFOULOUS, S.; FERHOUT, H.; RAOELISON, E. G.; VALENTIN, A.; MOUKARZEL, B.; COUDERC, F.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 352-362. 2013.

AHMED, S. A.; GOGAL, J. R. R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Jornaul Immunological Methods**, n. 15;170, v. 2, p. 211-24. 1994.

ALBAYRAK, S.; AKSOY, A.; SAGDIC, O.; HAMZAOGLU, E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. **Food Chemistry**, v. 119, p. 114-122. 2010.

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA V. F. J. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.141-145. 2010.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ALLEMANN, I. B.; BAUMANN, L. Botanicals in skin care products. **International Journal of Dermatology**, v. 48, p. 923-934. 2009.

ALVAREZ, D.; CASTILLO, M.; PAYNE, F.A.; GARRIDO, M.D.; BANÓN, S.; XIONG, Y.L. Prediction of meta emulsion stability using reflection photometry. **Jornaul Food Engineering**, v.82, p.310-315. 2007.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA, J. R. A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373. 2000.

ALVES, C. G.; BRANDÃO, H. N. DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos e Ciência**, n.12. 2007.

ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO, P. T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 101-105. 2005.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, L. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679–1687. 2005.

ANDRADE, F. F.; SANTOS, O. D; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Influence of PEG-12 Dimethicone addition on stability and formation of emulsions containing liquid crystal. **International Journal of Cosmetic Science**, 29, p. 211-218. 2007.

ANTIGNAC, E.; NOHYNEK, G. J.; RE, T.; CLOUZEAU, J.; TOUTAIN, H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 324-341. 2011.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília. 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Série: Qualidade. v. 1. Brasília. 2004.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2.ed., Brasília. 2008.

AOUADA, F. A.; MOURA, M. R.; GIROTTO, E. M.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Caracterização de Hidrogéis Condutores Constituídos por PAAm e PEDOT/PSS por meio de Planejamento Fatorial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 126-131, 2008.

AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n.1, p. 76-81, 2007.

BABALOLA, C.P.; PATEL, K.B.; NIGHTINGALE, C.H.; NICOLAU, D. P. Synergistic activity of vancomycin and teicoplanin alone and in combination with streptomycin against *Enterococcus faecalis* strains with various vancomycin susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 343-348. 2004.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 33-42. 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, B.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475. 2008.

BARATTA, M.T.; DORMAM, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour Fragrance**, v. 13, n. 4, p. 235-244, 1998.

BARATA, L. E. S; DISCOLA K. F; OHASHI, L. R. **Análise comparativa do óleo essencial das folhas de macacaporanga e pau-rosa**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS (2). Campinas . Livros de Resumos. Campinas - SP: UNICAMP, p. 142. 2003.

BARBOSA, R. C.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA, J. L. F.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de espécies de *Lauraceae*. **Acta Amazônica**, v. 18, p. 91-94. 1988.

BARCELOS, A. C.; BARATA, L. E. S.; MAGALHÃES, A. **Diferenciação entre as folhas e óleos essenciais de *Aniba parviflora* e de *Aniba roseodora* via RMN e CG-MS**. In 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo. 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 4. ed. Porto Alegre. Bookman. 2010.

BEGNAMI, A. F.; DUARTE, M. C. T.; FURLETTI, V.; REHDER, V. L. G.. Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. **Food Chemistry**, v. 118, p. 74-77. 2010.

BENBELAÏD, F.; KHADIR, A.; ABDOUNE, M. A.; BENDAHOU, M. Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 6, 454-459. 2013.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851. 2001.

BOTTERWECK, A. A.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food Chemistry Toxicology**, v. 38, p. 599-605. 2000.

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

BRANTNER, A.; GREIN, E. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 35-40. 1994.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, M. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, p. 415-421. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Gerência Geral de cosméticos. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2007.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 158p. 2000.

BURGER, W. C. A new genus of Lauraceae from Costa Rica, with comments on problems of generic and specific delimitation within the family. **Brittonia**, v. 40, n. 3, p. 275-282. 1988.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253. 2004.

BUYUKOKUROGLU, M. E; GULCIN, I.; OKTAY, M.; KUFREVIOGLU, O. I. *In vitro* antioxidant properties of *Dantrolene sodium*. **Pharmacological Research**, v. 44, p. 491-494. 2001.

CARROLL, J. F.; PALUCH, G.; COATS, J.; KRAMER, M. Elemol and amyris oil repel the ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in laboratory bioassays. **Experimental and Applied Acarology**, v. 51, p. 383-392. 2010.

CAMPANA, R.; SCESA, C.; PATRONE, V.; VITTORIA, E.; BAFFONE, W. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 301-306. 2006.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, v. 18, p. 261-268. 2001.

CASTELI, V. C.; MENDONÇA, C. C.; CAMPOS, M. A. L.; FERRARI, M.; MACHADO, S. R. P. Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. **Revista Maringá**, v. 30, n. 2, p. 121-128, 2008.

CHANDA, S.; DAVE, R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 981-996. 2009.

CHOI, S. Z.; CHOP, S. U.; BAE, S. U.; PYO, S. N.; LEE, K. R. Immunobiological Activity of a New Benzyl Benzoate from the Aerial Parts of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. **Archives of Pharmacal Reserach**, v. 28, n. 1, p. 49-54. 2005.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: Conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 88, p. 113-118. 2007.

CHUANG CH, SU LH, PERERA J, CARLOS C, TAN BH, KUMARASINGHE G, SO T, VAN PH, CHONGTHALEONG A, HSUEH PR, LIU JW, SONG JH, CHIU CH. Surveillance of antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serotype Typhi in seven Asian countries. **Epidemiol Infect**, v. 137, p. 266-269. 2009.

COLOMBO, R.; YARIWAKEB, J. H.; LANZA, M. R. V. Análise dos produtos de degradação do esfenvalerato por SBSE/CLAE-UV/DAD utilizando planejamento fatorial fracionário. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 535-539. 2014.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. 5ed. Rio de Janeiro: IBDF, 626p. 1974.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, 564-582. 1999.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model

membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 6300-6308. 2007.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p 1250-1318. 2000.

DAVIS, H. M. Analysis of Creams and Lotions. In: SENZEL, A. J. (Ed.) **Newburguer's Manual of Cosmetic Analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 32p. 1977.

DORMAN, H.J.D., S.G. DEANS. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–315. 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da Atividade Antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ENAAM BADER FALEH. Pathological Changes of Immunized Rabbits with *Proteus vulgaris* Fimbriae Antigen. **The Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 35, n. 2, p. 113-122, 2011.

FARIA, A. B.; PERES, D. D.; VLADI, T. M. K.; CONSIGLIERI, O.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para a higiene capilar contendo tensoativos “não-sulfatados”. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 33, n.4, p. 521-527. 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. pt. 2. 4ed. São Paulo: Atheneu, 146p. 2001.

FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (Carapa guianensis)**. 2002. 142p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2002.

Ferreira, A. O. **Guia prático da farmácia Magistral**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks; 1438 p., 2011.

FISHER, K. C. PHILLIPS. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science Technology**, v. 19, 156–164. 2008.

FRANQUILINO, E. Em ritmo de expansão. **Cosmet Toiletries** (ed. Port.), edição temática, 18: 7-10, 2006a.

FRANQUILINO, E. Ativos amazônicos. **Cosmetics Toiletries**, São Paulo, edição temática especial (ed. Port.): Biodiversidade Amazônica, v. 1, p.18-53. 2006b.

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

GALLI, A.; FRANZETTI, L.; BRIGUGLIO, D. Attività antimicrobica in vitro di oli essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare. **Industrie Alimentari**, v. 25, n. 5, p. 463-466. 1985.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L.; GÓMEZ-CANSINO, R.; GARCÍA-ZEBADÚA, J. C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, N. C; REYES-CHILPA, R. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of  $\beta$ -pinene and linalool as active principles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 673-679. 2012.

GOBBO-NETO, L.; N.P. LOPES. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 374-381. 2007.

GONÇALVES, S.; GOMES, D.; COSTA, P.; ROMANO, A. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 465-471. 2013.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the *Lauraceae*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1537-1570. 1972.

GOTTLIEB, O.R; KUBITZKI, K. Chemosystematics of the Aniba. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 9, n. 1, p. 5-12. 1981.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990. 1999.

HULIN, V.; MATHOT, A. G.; MAFART, P.; DUFOSSÉ, L. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sciences des Aliments**, v. 18, p. 563-582. 1998.

ISAAC, V. L. B; CEFALI L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G; SALGADO H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96. 2008.

IDSON, B. Stability testing of emulsions, I. **Drug and cosmetic industry**, v. 142, n. 1, p. 27-30. 1993.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, p. 203-214. 2006.

JIN, M.; LI, L.; XU, C.; WEN, Y.; ZHAO, M. Estrogenic activities of two synthetic pyrethroids and their metabolites. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 290-296. 2010.

KALEMBA, D. A. KUNICKA. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, 813-829. 2003.

KINNULA, V. L., CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 718-744. 2004.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; MCCLOUD, T. G.; TUCKER, K. D.; SHOEMAKER, R. H. A Novel Antimicrobial Indolizinium Alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1732-1735. 2004.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIS, N.; WEIGAND, H. Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests, In: SCHREIER, P. (Ed.), **Bioflavour 87**. Berlin: Walter de Gruyter Co, p. 287-299. 1989.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing** v. 89, p. 217-233. 2011.

KUBITZKI, K.; RENNER, S. Lauracea I (Aniba and Aiouea). *Flora Neotropica*, v. 31, p. 1-124. 1982.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 145-151, 2009.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros Dermatol, Rio de Janeiro**, v. 77, n. 5, p. 563-569. 2002.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal**. Chapecó: Argos, p. 481-501. 2001.

LIMA, A. B.; SANTANA, M. B.; CARDOSO, A.; SILVA, J. Q.; MAIA, J. G.; CARVALHO, J. C.; SOUSA, P. G. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main componente of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine**, v. 16, p. 555-559. 2009.

LOBATO A. M.; ANTONIA, R.; PINHEIRO, M. F. S; MAIA, J. G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 19, p. 355-363. 1989.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A. M.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, p. 1002-1012. 2008.

LOUREIRO, A. P.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, p. 777-790. 2002.

LUO, H.; LI, O.; FLOWERB, A.; LEWITHB, G.; LIU, J. Comparison of effectiveness and safety between granules and decoction of Chinese herbal medicine: A systematic review of randomized clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 555-567, 2012.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e seus Óleos Essenciais**. Belém: Goeldi Editoração, v. 1, p. 52. 2001.

MAIA, S. G. S.; ANDRADE, E. H.; Plant sources of Amazon rosewood oil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1906-1910. 2007.

MAIMOONA, A.; NAEEM I.; SADDIQA Z.; JAMEEL K. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of *French maritime* pine bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 261-277. 2011.

MANHÃES, A. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; WIEDEMANN, L. S. M.; FERNANDES, K. S.; SAMPAIO, P. T. B. Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of *Aniba canelilla* (H.B.K.) (Lauraceae) in the Central Amazon. **Acta Amazônica**, v. 42, n. 3, p. 355-362. 2012.

MARRA, R. A.; BAR, K.; BEARMAN, G. M. L.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M.B. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection**, v. 53, p. 30-35. 2006.

MARRS, C.; ZHANG, L.; FOXMAN, B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? **Microbiology Letters**, v. 252, p. 183-190. 2005.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-60. 2006.

MARTINS, S.; AMORIM, E. L. C.; PEIXOTO, T. J. S.; SARAIVA, A. M.; PISCIOTTANO, M. N. C.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 306-311. 2013.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente** v. 8, n. 1, p. 195-206. 2001.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza, 3º ed., p: 150, 2009

MATTOSO, E. **Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia**. 2005. 85p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2005.

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

MEIXIA, H.; XIURUI, C.; JIANGDONG, X.; GEFU, C.; RUIJIE, G.; XUMING, D.; SHUANG, G.; JINGYUAN, W.; LANAN, W. S.; HAIHUA, F.; DACHENG, W. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. **Jornaul of Surgical Research**, v. 180, p. 47-54. 2013.

MIYASHITA, M.; SADZUKA, YASUYUKI. Effect of linalool as a component of *Humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 174–179, 2013.



MODOLON, S. M.; BÓ, A. G. D.; FELIPPE, A. C.; MINATTI, E.; ZANETTE, D. Auto-associação do dodecilsulfato de sódio (SDS) com o polímero hidrofobicamente modificado etil (HIDROXIETIL) celulose (EHEC). **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2046-2050. 2009.

MOHARRAM, A. M.; MOSTAFA E. M.; ISMAIL, M. A. Chemical profile of *Monascus ruber* strains. **Food Technology Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 490-499. 2012.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal Science and Technology**, v. 26, p. 211-219. 2004.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896. 2005.

MORAIS, A. A.; REZENDE, C. M. A. M.; BÜLOW, M. V. V.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; ROCHA, A. I.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais de espécies do gênero *Aniba*. **Acta Amazonica**, v. 2, n. 1, p. 41-44. 1971.

MORAIS, J. M.; BURGESS, D. J. Micro- and Nanoemulsions (Controlled Release Parenteral Drug Delivery Systems). **Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems**, v. 12, p. 221-238, 2012.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. Emerging infections: a perpetual challenge. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 710-719, 2008.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards – **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**: Norma Aprovada – 8ed., v. 23 n.1 2003(atual CLSI - www.clsi.org).

MUELLER, United States Patent. US 7,790,668 B2. 2010.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards - **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**: Norma Aprovada – 6ed, M7-A6, v. 23, n. 2, 2007(atual CLSI - www.clsi.org).

NEUMAN, K.; COX, D.; BULLOUGH, K. Transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus* among family members: a case study. **Journal Community Health Nursing**, v. 15, n. 1, p. 9-20. 1998.

NOSKIN, G. A.; STOSOR, V.; COOPER, I.; PETERSON, L. R.. Recovery of vancomycin-resistant *Enterococci* on fingertips and environmental surfaces. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.16, n. 10, p. 577-81. 1995.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426. 2000.

OH, J.; BOWLING, J. J.; CARROLL, J. F.; DEMIRCI, B.; BAŞER, K. C.; LEININGER, T. D.; BERNIER, U. R.; HAMANN, M. T. Natural product studies of U.S. endangered plants: Volatile components of *Lindera melissifolia* (Lauraceae) repel mosquitoes and ticks. **Phytochemistry**, v. 80, p. 28-36. 2012.

OKIGBO R. N.; OGBONNAYA, U. O. Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 727-731. 2006.

OLIVEIRA, H. B.; KFFURI, C. W.; CASALI, V. W. D. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 256-260. 2010.

OUCHIKHA, O.; CHAHEDA, T.; KSOURI, R.; TAARIT, M. B.; FALEHB, H.; ABDELLEY, C.; KCHOUKA, M. E.; MARZOUKA, B. The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 103-110, 2011.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1046-1055. 2006.

PARK, S. N.; LIM, Y. K.; FREIRE, M. O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 18, p. 369-372. 2012.

PEREIRA, I. C. **Fitoquímica e aspectos morfofisiológicos de Aniba parviflora (LAURACEAE) cultivadas no município de Santarém-PA**. 2012. 92p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia), Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém. 2012.

PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, G. C.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. F.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M.. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 249-259. 2008.

PIEROZAN, M.K.; PAULETTI, G.F.; ROTA, L.; SANTOS, A.C.A.; LERIN, L.A.; LUCCIO, M.; MOSSI, A.J.; ATTI-SERAFIN, L.I; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 764-770. 2009.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042. 2000.

PIETRO, R. C. L. R.; SALVAGNINI, L. E.; MIGLIATO, K. F.; RANGEL, V. L. B. I.; CORREA, M. A.; MARONA, H. R. N. Efficacy evaluation of preservatives associated to *Achillea millefolium* extract against *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 75-77. 2006.

POLATOGLU, K.; KARAKOC, O.C.; GÖRENC, N. Phytotoxic, DPPH scavenging, insecticidal activities and essential oil composition of *Achillea vermicularis*, *A. teretifolia* and proposed chemotypes of *A. biebersteinii* (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 35-45, 2013.

RADULOVIC, M.; KNITTELFELDER, O.; CRISTOBAL-SARRAMIAN, A.; KOLB, D.; WOLINSKI, H.; KOHLWEIN, S. D. The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches. *Current Genetics*, v. 59, n. 4, p. 231-42. 2013.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, p. 755-760, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 856p. 2001.

RAO, B. G.; RAO, P. U.; RAO, E. S.; RAO, T. M.; PRANEETH, V. S. D. Evaluation of in-vitro antibacterial activity and anti-inflammatory activity for different extracts of *Rauvolfia tetraphylla* L. root bark. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. 818-821. 2012.

RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 1-5. 2008.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 9, n. 2, p. 67-70. 2007.

RIBEIRO, J. E.; HOPKINS, M.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.; COSTA, M.; BRITO, J.; SOUZA, M.; MARTINS, L.; LOHMAM, L.; ASSUNÇÃO, P.; SILVA, C.; MESQUITA, M.; PROCOPIO, L. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 816p. 1999.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. *Cosmetics Toiletries*, v. 8, n. 5, p. 47-53. 1996.

RODENAK, B. K.; POLO, M.; VILLEGAS, S. M.; GALLE, M.; CRESPO, R.; GARCÍA, M. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines. *Chemico-Biological Interactions*. 2014.

RODRIGUES, R. M. Cosméticos verdes: uma tendência mundial. *Revista Racine*, v. 65, p. 28-30. 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª Ed. Campinas, SP: Caso do Pão Editora, 326 p. 2005.

ROGERO, S. O. ; LUGÃOA, A. B.; IKEDAB, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6 n. 3, p. 217-220. 2003.

ROSATO, A.; PIARULLI, M.; CORBO, F.; MURAGLIA, M.; CARONE, A.; VITALI, M.E.; VITALI, C. *In vitro* synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 3289-3295. 2010.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999.

SAHOO, S.; GHOSH, G.; DAS, D.; NAYAK, S. Phytochemical investigation and in vitro antioxidant activity of an indigenous medicinal plant *Alpinia nigra* B.L. Burtt. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 11, p. 871-876. 2013.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276. 1998.

SANTOS, O. D. H.; MORAIS, M. J.; ANDRADE, F. F.; AGUIAR, T. A.; ROCHA, P. A. Development of vegetable oil emulsions with lamellar liquid-crystalline structures. **Jornal Dispersion Science Technology**, v. 32, n. 3, p. 433-438. 2011.

SCHELZ, Z.; J. HOHMANN; J. MOLNAR. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. *In: Chattopadhyay, D. Research Signpost*, v. 37, n. 2, p. 180-201. 2010.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. **Fitoterapia racional: Um guia para as ciências da saúde**. Barueri: Manole, 386p. 2002.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Emulsões. **Cosmetic Toiletries**, v. 12, n. 3, p.71-74. 2000.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 153-166. 2007.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. K.; Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103. 1992.

SILVA, D. D.; CHIERICE, G. O.; GALHIANE, M. S.; CHAAR, J. S.; MOUCHREK FILHO, V. E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans utilizando uma nova coluna capilar Polyh4-Md em cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 26, p. 461-465. 2003.

SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9422-9426. 2007.

SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S., YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p. 180–188. 2007b.

SILVA, G. F. **Estudo do potencial biotecnológico de *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez para obtenção de cosméticos**. 2012. 119p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

SILVA, S. A. M.; RIGON, R. B.; VALARINI, M. F. C.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R. Análise da influência do agente umectante na estabilidade reológica e avaliação de cristais

líquidos em formulações cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94 n. 3, p. 199-210. 2013.

SIMIC, A.; SOKOVIC, M. D.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVI, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. D. The Chemical Composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 713-717. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC. 1104 p. 2006.

SINGH, G.; MAURYA, S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1650-1661, 2007.

SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiology**, v. 13, p. 129-142. 2006.

SIMIC, A.; SOKOVIC, M. D.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVI, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. D. The Chemical Composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 713-717. 2004.

SMITH, M. A., ROTTKAMP, C. A., NUNOMURA, A., RAINA, A. K., PERRY, G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1502, 139-144. 2000.

SMITH-PALMER, A.; J. STEWART L. FYFE. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food. Microbiology**, v. 18, n. 4, 463-470. 2001.

SPELLMEIER, F.; HEBERLÉ, G. Bases Emulsionadas: Comparativo de Estabilidade Acelerada. **Cosmetic Toiletries (Brasil)**, v. 19, p.68-70. 2007.

SOARES, T.V; FABRI, R. L. Composição química e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) Mcleish (candeia). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 41-52, 2011.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 649-662. 2004.

SOEUR, J.; MARROT, I.; PEREZ, P.; IRAQUI, I.; KIENDA, G.; DARDALHON, M.; MEUNIER, J.; AVERBECK, D.; HUANG, M. Selective cytotoxicity of *Aniba rosaeodora* essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 718, p. 24-32. 2011.

SOUZA, K. S; CHAAR, J. S.; OLIVEIRA, K. M. T.; GOMES, E. O.; PORTELA, C. N.; POHLIT, A. M., QUIGNARD, E. L. J.; NUNOMURA, S. M.; TADEI, W. P.; MOUCHREK FILHO, V. E.; SILVA, D. D.; GALHIANE, M. S.; CHIERICE, G. O. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do

linalol no hidrolato de folhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p.1-7. 2007.

SOUZA, V. B.; FERREIRA, J. R. N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 217-222, 2010.

SOUZA, G. H. B; MELLO, J. P. C.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Ouro Preto: ed. UFOP, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TASSANEEYAKUL, W.; RAZZAZI-FAZELI, E.; PORASUPHATANA, S.; BOHM, J. Contamination of aflatoxins in herbal medical products in Thailand. **Mycopathologia**, v. 158, p. 239-244. 2004.

TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 525-532. 2007.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia** 5ed., Sao Paulo: Atheneu, 760 p. 2005.

TRANCHIDA, P. Q.; SOUZA, R. C. Z.; BARATA, L. E. S.; MONDELLO, M.; DUGO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Analysis of Macacaporanga (*Aniba parviflora*) leaf essential oil by using comprehensive two-dimensional Gas Chromatography combined with rapid-scanning Quadrupole Mass Spectrometry. **Chromatography Today**, v. 95, p. 5-9. 2008.

TSUNEKI, H.; MA, E.; KOBAYASHI, S.; SEKIZAKI, N.; MAEKAWA, K.; SASAOKA, T.; WANG, M.; KIMURA, I. Antiangiogenic activity of  $\beta$ -eudesmol in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, p. 105-115. 2005.

TÓFOLI, D.; VIOLANTE, I. M P.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. **Estudo químico e atividade antifúngica do óleo essencial das folhas de *Aniba heringerii***. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2012.

THOMSON, J.; BOMONO, R.A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 518-524. 2005.

TORTORA, G; FUNKE, B. R.; CASE, C. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed. 2005.

UNIYAL, S.K.; SINGH, K.N.; JAMWAL, P.; LAL, B. Traditional use of medicinal plants among the tribal communities of *Chhota bhanestern* Himalayan. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, p. 1-14. 2006.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384-387. 2007.

VOGTA, V.; CIFUENTEB, D.; TONNB, C.; SABINIC, L.; ROSAS, R. Antifungal activity in vitro and in vivo of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 583-586. 2013.

YOON, C.; MOON, S; JEONG, J.; SHIN, Y.; CHO, S.; AHN, K.; YANG, J.; KIM, G. Repellency of lavender oil and linalool against spot clothing wax cicada, *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) and their electrophysiological responses. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, p. 411-416, 2011.

YU, X.; ZHAO, M.; LIU, F.; ZENG, S.; HU, J. Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4- one as a strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. **Food Research International**, v. 51, p. 397-403. 2013.

WANG, J; ZHAO, J; HAO, L; ZHOU, LIGANG; LIU, ZHILONG; WANG, J; HAN, J; YU, ZHU; YANG, FUYU. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. **Molecules**, v. 15, p. 6411-6422, 2010.

WERFF. H. V. D. A key to the genera of Lauraceae in the new world. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 78, p. 377-387. 1991.