

UEA

UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT**

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Aniba canelilla*
(H.B.K) MEZ PARA OBTENÇÃO DE COSMÉTICOS**

GEVERSON FAÇANHA DA SILVA

Orientadora: Dr^a. Patrícia Melchionna Albuquerque

Coorientador: Dr. Lauro Euclides Soares Barata

Manaus
2012

GEVERSON FAÇANHA DA SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Aniba canelilla*
(H.B.K) MEZ PARA OBTENÇÃO DE COSMÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Dr^a. Patrícia Melchionna Albuquerque

Coorientador: Dr. Lauro Euclides Soares Barata

Manaus
2012

GEVERSON FAÇANHA DA SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Aniba canelilla*
(H.B.K) MEZ PARA OBTENÇÃO DE COSMÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Banca Examinadora

.....
Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque – EST/UEA - Orientadora

.....
Dra. Cecília Verônica Nunez – CPPN/INPA

.....
Dra. Marise Margareth Sakuragui– UFSCAR

Conceito:

Manaus, 24 de julho de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais e toda
minha família que me apoiou
ao longo deste caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e capacidade que me dá para lutar e vencer todos os obstáculos e alcançar os meus objetivos.

Ao meu pai, seu Genésio, que sempre me incentivou a estudar e ir mais além.

A minha avó, dona Alexandrina, que me deu uma excelente criação formando meu caráter e personalidade me tornando um cidadão de bem.

A minha mãe, dona Raimunda, que mesmo estando distante, torce pela minha vitória e festeja minhas conquistas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, que dentre altos e baixos, está aí firme formando cada vez mais mestres competentes para desempenhar seus trabalhos.

Ao curso de Engenharia Química e ao coordenador do curso Dr. Sergio Duvoisin Jr., pela infra-estrutura tornando possível a realização do meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa concedida e aos programas institucionais financiados por ela (PCE e POSGRAD).

À minha orientadora Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque que acreditou no meu trabalho e na minha capacidade me incentivando a ir mais além, sempre presente na resolução dos problemas enfrentados.

À professora Dra. Antônia Queiroz da Escola Superior de Ciências da Saúde, por me permitir realizar as atividades antimicrobianas em seu laboratório.

À professora Dra. Cláudia Silva do grupo Crowfoot de Métodos de Raio-X pela inauguração do seu laboratório liofilizando meus extratos.

A todos os meus colegas de laboratório, Esp. Andrea Fischborn, MSc. Renah Boanerges, MSc. Rafael Lopes, que me auxiliaram de forma direta ou indireta na execução das minhas atividades e pelos momentos de descontração no “camarão”, Kapellas e muitos outros que

ficarão na lembrança, e aos gaúchos que passaram a fazer parte da minha vida Rogério e Leocádia (bah).

Agradeço também aos meus alunos Fernanda Tatiara, Dayvison Coelho, Ricardo Alexandre, Marta Juliana, Larissa Ipuchima e Edmundo Oliveira, por me “aturarem” e estarem sempre dispostos a aprender cada vez mais.

Agradeço aos membros da minha banca de qualificação, em especial a Dra. Cecília Verônica Nunez, que me deu ótimas orientações na discussão dos meus resultados.

Agradeço também a todos os meus amigos que de algum modo fizeram parte da minha vida e contribuíram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Obrigado!

“Cada um escolhe sua felicidade!”

RESUMO

A pressão do extrativismo sobre as principais espécies de Lauráceas produtoras de óleos essenciais tem levado a uma redução drástica de suas propriedades naturais. Diante do aumento da demanda pelas indústrias de cosméticos, perfumaria e fármacos, o valor de mercado desses óleos tem aumentado, impulsionando dessa forma, o extrativismo predatório sobre essas espécies. Neste sentido, este trabalho tem por objetivo avaliar atividades biológicas de *Aniba canelilla*, seu potencial tóxico e oferecer alternativas sustentáveis de aproveitamento dos resíduos gerados pela indústria de óleos essenciais para obtenção de cosméticos, aproveitando os recursos naturais da Amazônia com potencial biotecnológico. A extração do óleo foi realizada em laboratório em aparelho tipo Clevenger. Nos destilados (óleo e hidrolato), bem como nos extratos etanólicos de folhas e galhos de *Aniba canelilla*, foram realizados ensaios para verificação de atividades antibiótica (antifúngica e antibacteriana) frente aos fungos *Candida albicans* (patógeno humano), *Corynespora cassiicola* (fitopatógeno do tomate), *Didymella bryoniae* (fitopatógeno da melancia), e às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativo) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo). Os resultados foram quantificados pelo tamanho do halo de inibição em relação à solução controle. Avaliou-se também a atividade antioxidante frente à capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) com o monitoramento do decréscimo da absorvância. Os extratos foram submetidos à partição líquido-líquido e novamente testados a fim de se obter uma semi-purificação das substâncias ativas. Foram avaliados também a toxicidade do hidrolato e seu consequente impacto ambiental através de ensaios citotóxicos frente à *Artemia salina* pela determinação da CL₅₀ e frente ao *Colossoma macropomum* (tambaqui), observando os parâmetros genotóxicos e hematológicos. Por fim, foi avaliada a estabilidade preliminar de um cosmético formulado a partir do hidrolato, óleo essencial e extratos de preciosa. Os extratos etanólicos de folhas e galhos mostraram-se com elevado potencial antioxidante, e após partição líquido-líquido, a fase hidroalcoólica demonstrou-se ainda mais promissora. Os óleos essenciais não apresentaram percentual de inibição significativo do DPPH. O hidrolato apresentou inibição do radical, apresentando potencial biotecnológico para utilização em cosméticos. Por outro lado, os óleos essenciais mostraram-se altamente tóxicos contra *C. albicans* e *D. bryoniae*, sendo provavelmente responsável por tal atividade o composto majoritário 1-nitro-2-feniletano. Ao avaliar a citotoxicidade do hidrolato em *A. salina*, percebeu-se sua alta toxicidade, indicado pelo baixo valor de CL₅₀ ≈ 5% (v/v). Levando em consideração esses dados, ao avaliar as respostas fisiológicas em *C. macropomum*, utilizou-se a concentração de hidrolato a 1%, que promoveu danos genotóxicos e alterações na concentração de hemoglobina e hematócrito, indicando dificuldades respiratórias nos peixes. Por fim foi elaborado um creme hidratante corporal, o qual foi submetido aos testes de estabilidade preliminar onde foi aprovado nos ensaio de refrigeração e centrifugação, e reprovado nos ensaios de estresse térmico e ciclos gela-degela, sendo necessária a elaboração de nova formulação. Com este trabalho, pode-se concluir que *A. canelilla* apresenta um bom potencial biotecnológico a ser explorado pela indústria de cosméticos, como na elaboração de cremes anti-idade e antifúngicos.

Palavras-chave: Antifúngico, Antibacteriano, Antioxidante, Toxicologia, Fitocosmético.

ABSTRACT

The pressure of the exploitation over the main species of Lauraceae that produce essential oils has led to a drastic reduction of its natural properties. Given the increasing demand of the cosmetic, perfume and pharmaceutical industries, the market value of these oils has increased, thus boosting the predatory exploitation of these species. Therefore, this work aims to evaluate on *Aniba canelilla* some biological activities, its toxic potential and offer an alternative for the sustainable utilization of byproducts generated by the essential oils industry, in order to produce cosmetic formulations, taking advantage of the Amazon's natural resources which present biotechnological potential. The oil extraction was carried out in a Clevenger type apparatus. On the distillates (oil and hydrolate) and on ethanol extracts of leaves and branches of *Aniba canelilla*, were verified the antibiotic activity (antifungal and antibacterial) against the fungi *Candida albicans* (a human pathogen), *Corynespora cassiicola* (tomato pathogen), *Didymella bryoniae* (pathogen of watermelon), and the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negative) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive). The results were quantified by the size of the inhibition zone in relation to the control solution. It was also evaluated the antioxidant activity, according to the ability of the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH·) scavenger by monitoring the decrease in the absorbance. The extracts were subjected to liquid-liquid partition and tested again in order to obtain a semi-purification of its compounds. The toxicity of hydrolate and its consequent environmental impact were also evaluated, through cytotoxic assays on *Artemia salina* by determining the LC₅₀ and the monitoring of genotoxic and hematological parameters on *Colossoma macropomum*. Finally, it was evaluated the primary stability of a cosmetic formulated from hydrolate, essential oil and extracts of *Aniba canelilla*. The ethanolic extract from leaves and branches demonstrated an outstanding antioxidant potential, and after liquid-liquid partition, the hydroalcoholic phase showed to be even more promising. The essential oils showed no significant inhibition percentage of DPPH. The hydrolate showed inhibition of the radical, and has biotechnological potential for use in cosmetics. Moreover, essential oils were highly toxic against *C. albicans* and *D. bryoniae* being probably the responsible for this activity, the major compound 1-nitro-2-phenylethane. In evaluating the cytotoxicity of hydrolate on *A. salina*, it was verified its high toxicity, indicated by lower LC₅₀ value $\approx 5\%$ (v/v). Considering these data, to evaluate the physiological responses in *C. macropomum* was used a hydrolate concentration of 1%, which promoted genotoxic damage and changes in hemoglobin and hematocrit, indicating respiratory distress on fishes. Finally, it was designed a body moisturizer, which was subjected to preliminary stability tests, being approved in cooling and centrifugation test, but disapproved on tests of thermal stress and freeze-defrost cycles. Hence, it is necessary to elaborate a new formulation. With this work, it can be concluded that *A. canelilla* have a promising potential to be exploited by the biotech industry in the preparation of cosmetic anti-aging creams and antifungal formulations.

Keywords: Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, Toxicology, Phytocosmetics.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Aniba canelilla</i> (preciosa)..... | 29 |
| Figura 2. Alexander von Humboldt e Aimé Bonpland na Floresta Amazônica..... | 29 |
| Figura 3. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano..... | 30 |
| Figura 4. Estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de <i>A. canelilla</i> | 30 |
| Figura 5. Fotografia de <i>Artemia salina</i> | 42 |
| Figura 6. Tubo capilar com amostras sanguíneas antes e após centrifugação - Micro-hematócrito..... | 48 |
| Figura 7. <i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui). | 49 |
| Figura 8. Imagem da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD). | 52 |
| Figura 9. Fluxograma das etapas de extração, partição e ensaios biológicos de <i>A. canelilla</i> . . | 53 |
| Figura 10. Extração de óleo essencial de folhas e galhos de <i>A. canelilla</i> em aparelho tipo Clevenger..... | 54 |
| Figura 11. Esquema da partição líquido-líquido dos extratos. | 55 |
| Figura 12. Aparelho liofilizador em (a) vista frontal e (b) vista do painel digital, indicando as condições de operação..... | 55 |
| Figura 13. (a) Soluções testes preparadas em DMSO e água. (b) Inoculação de microrganismo em Câmara de Fluxo. | 56 |
| Figura 14. (a) Placa com meio de cultura Saboraud sendo preparados os poços para inoculação das soluções teste. (b) Verificação da presença de halo de inibição em placa contendo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 57 |
| Figura 15. Ensaio de atividade antimicrobiana. | 57 |
| Figura 16. Estrutura do DPPH reduzindo-se na presença de um antioxidante..... | 58 |
| Figura 17. Esquema de diluições sucessivas. | 59 |
| Figura 18. Esquema da metodologia para avaliação da atividade sequestrante do radical livre DPPH•. | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. Sistema operacional para realização dos experimentos de citotoxicidade frente às larvas de <i>Artemia salina</i> | 62 |
| Figura 20. Fazenda de piscicultura Extra Beth localizada na AM-010 km 47..... | 63 |
| Figura 21. Câmaras individuais de 4 L para exposição dos tambaquis ao hidrolato de <i>A. canelilla</i> . Tampa branca é o grupo Controle 1 (água do poço), tampa verde Controle 2 (água e DMSO 0,025%), e tampa laranja Tratamento (hidrolato 1%)..... | 64 |
| Figura 22. Retirada do sangue por punção da veia caudal. (a) vista frontal. (b) vista lateral. . | 65 |
| Figura 23. Preparação de extensões sanguíneas em lâminas de vidro..... | 65 |
| Figura 24. Células eritrocíticas com anormalidades nucleares. MN = Micronúcleo; NS = Núcleo Segmentado; NL = Núcleo Lobado; NR = Núcleo em Forma de Rim. | 66 |
| Figura 25. Centrifuga de microhematócrito. | 67 |
| Figura 26. Área de contagem de eritrócitos (em vermelho) utilizando câmara de Neubauer. . | 68 |
| Figura 27. Aparelho medidor de glicose sanguínea (marca Performa). | 69 |
| Figura 28. Preparação das emulsões cosméticas em misturador mecânico. (a) aparelho em funcionamento e (b) emulsão cosmética. | 70 |
| Figura 29. Curva analítica do ácido ascórbico utilizada para determinação da Concentração Eficiente (CE ₅₀). | 73 |
| Figura 30. Curva analítica da quercetina utilizada para determinação da Concentração Eficiente (CE ₅₀). | 74 |
| Figura 31. Concentração Eficiente (CE ₅₀) em µg/mL dos extratos das folhas de <i>A. canelilla</i> e dos antioxidantes padrão..... | 74 |
| Figura 32. Concentração Eficiente (CE ₅₀) em µg/mL dos extratos dos galhos de <i>A. canelilla</i> e dos antioxidantes padrão..... | 76 |
| Figura 33. Concentração Eficiente (CE ₅₀) em µg/mL dos extratos do resíduo de folhas de <i>A. canelilla</i> e dos antioxidantes padrão. | 76 |
| Figura 34. Concentração Eficiente (CE ₅₀) em µg/mL dos extratos do resíduo de galhos de <i>A. canelilla</i> e dos antioxidantes padrão. | 77 |
| Figura 35. Curvas das atividades antioxidantes em função da concentração dos extratos etanólicos brutos de (a) folhas e (b) galhos de <i>A. canelilla</i> | 79 |

| | |
|--|----|
| Figura 36. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração dos extratos etanólicos brutos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos de <i>A. canelilla</i> | 79 |
| Figura 37. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hexânicas dos extratos de (a) folhas e (b) galhos de <i>A. canelilla</i> | 80 |
| Figura 38. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hexânicas dos extratos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos de <i>A. canelilla</i> | 81 |
| Figura 39. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases diclorometânicas dos extratos de (a) folhas e (b) galhos de <i>A. canelilla</i> | 82 |
| Figura 40. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases diclorometânicas dos extratos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos <i>A. canelilla</i> | 82 |
| Figura 41. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hidroalcoólicas dos extratos de (a) folhas e (b) galhos de <i>A. canelilla</i> | 83 |
| Figura 42. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hidroalcoólicas dos extratos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos de <i>A. canelilla</i> | 84 |
| Figura 43. Ensaio antimicrobiano frente à <i>C. albicans</i> apresentando halos de inibição nos poços contendo óleos essenciais e cetoconazol (controle positivo)..... | 88 |
| Figura 44. Ensaio antimicrobiano frente ao fungo <i>D. bryoniae</i> apresentando halos de inibição nos poços contendo os óleos essenciais (a) após 24 h e (b) após 48 h. OE = óleo essencial..... | 89 |
| Figura 45. Ensaio antimicrobiano frente à bactéria <i>P. aeruginosa</i> apresentando halo de inibição apenas para o controle positivo..... | 89 |
| Figura 46. Curva apresentando o percentual de mortalidade de <i>A. salina</i> em função das concentrações do hidrolato de <i>A. canelilla</i> mostrando a equação da reta utilizada para o cálculo da CL ₅₀ | 91 |
| Figura 47. Emulsão cosmética apresentando aspectos homogêneo, brilhante e fino, após a preparação..... | 97 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Utilização de espécies de Lauraceae na medicina popular (RAGGI, 2008)..... | 26 |
| Tabela 2. Composição química do óleo essencial e extratos metanólicos de <i>A. canelilla</i> (SILVA et al., 2007). | 32 |
| Tabela 3. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração dos extratos etanólicos brutos de <i>A. canelilla</i> . . | 78 |
| Tabela 4. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração das fases hexânicas dos extratos de <i>A. canelilla</i> | 80 |
| Tabela 5. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração das fases diclorometânicas dos extratos de <i>A. canelilla</i> | 81 |
| Tabela 6. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração das fases hidroalcoólicas dos extratos de <i>A. canelilla</i> | 83 |
| Tabela 7. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração do óleo essencial das folhas de <i>A. canelilla</i> | 84 |
| Tabela 8. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração do óleo essencial dos galhos de <i>A. canelilla</i> | 85 |
| Tabela 9. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração do hidrolato de <i>A. canelilla</i> | 85 |
| Tabela 10. Resultado dos ensaios antimicrobianos das soluções de <i>A. canelilla</i> | 87 |
| Tabela 11. Resultados do percentual de mortalidade das larvas de <i>A. salina</i> em função das concentrações do hidrolato de <i>A. canelilla</i> | 90 |
| Tabela 12. Características físico-químicas das águas dos aquários experimentais utilizados durante os experimentos de exposição aguda ao hidrolato de <i>A. canelilla</i> | 93 |
| Tabela 13. Resultados de Anormalidade Nucleares Eritrocíticas (ANE) de <i>Colossoma macropomum</i> após 96 h de exposição ao hidrolato de <i>A. canelilla</i> expressos em média ± desvio padrão da média. | 93 |
| Tabela 14. Resultados dos parâmetros hematológicos de <i>Colossoma macropomum</i> após 96 h de exposição ao hidrolato de <i>A. canelilla</i> expressos em média ± desvio padrão da média... | 94 |

| | |
|---|----|
| Tabela 15. Valores dos parâmetros físico-químicos observados durante os ensaios de estabilidade preliminar da emulsão cosmética. | 96 |
|---|----|

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

| | |
|------------------|---|
| [Hb] | Concentração de Hemoglobina |
| AA% | Atividade Antioxidante em Porcentagem |
| Abs | Absorbância |
| AH | Antioxidante |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| ANE | Anormalidade Nuclear Eritrocítica |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| Catec | Câmara Técnica de Cosméticos |
| CE ₅₀ | Concentração Eficiente a 50% |
| CG-EM | Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa |
| CHC | Hemoglobina Corpuscular |
| CHCM | Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média |
| CL ₅₀ | Concentração Letal a 50% |
| Cm | Centímetro |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| dL | Decilitro |
| DMSO | Dimetil-sulfóxido |
| DOU | Diário Oficial da União |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazila |
| DVB | Divinilbenzeno |
| EBF | Extrato Bruto Etanólico das Folhas |
| EBFR | Extrato Bruto Etanólico das Folhas após a Hidrodestilação |
| EBG | Extrato Bruto Etanólico dos Galhos |
| EBGR | Extrato Bruto Etanólico dos Galhos após a Hidrodestilação |
| FAO | Food Agriculture Organization |
| g | Gramma |
| h | Hora |
| Hb | Hemoglobina |
| HCM | Hemoglobina Corpuscular Média |
| Ht | Hematócrito |
| kg | Quilograma |
| km | Quilometro |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| µg | Micrograma |
| Min | Minuto |
| µL | Microlitro |
| mL | Mililitro |

| | |
|--------|--|
| MN | Micronúcleo |
| MtHb | Metahemoglobina |
| NL | Núcleo Lobado |
| nm | Nanometro |
| NR | Núcleo em Forma de Rim |
| NS | Núcleo Segmentado |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| R | Radical |
| RBC | Red Blood Cell (Contagem de Células Vermelhas Sanguíneas) |
| RPM | Rotação por minuto |
| SCGE | Single-Cell Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Células Individuais) |
| SEBRAE | Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequenas Empresas |
| SPME | Solid Phase Micro Extration (Microextração em Fase Sólida) |
| Tween | Monooleate Sorbitan Ethoxylate |
| UE | União Européia |
| VCM | Volume Corpuscular Médio |
| WBC | White Blood Cell (Contagem de Células Brancas Sanguíneas) |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 21 |
| 2.1 FITOCOSMÉTICOS..... | 21 |
| 2.1.1 Origem dos Cosméticos..... | 21 |
| 2.1.2 Definição de Cosméticos..... | 22 |
| 2.1.3 Cosméticos à Base de Produtos Naturais..... | 23 |
| 2.1.4 Cosméticos Naturais..... | 24 |
| 2.2 FAMÍLIA LAURACEAE..... | 26 |
| 2.2.1 O Gênero <i>Aniba</i> Aubl..... | 27 |
| 2.2.2 <i>Aniba canelilla</i> (H.B.K.) Mez..... | 28 |
| 2.3 CONTROLE MICROBIANO..... | 31 |
| 2.3.1 Bactérias..... | 33 |
| 2.3.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 34 |
| 2.3.1.2 <i>Escherichia coli</i> | 35 |
| 2.3.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> | 35 |
| 2.3.2 Fungos..... | 36 |
| 2.3.2.1 <i>Candida albicans</i> | 37 |
| 2.3.2.2 <i>Aspergillus niger</i> | 37 |
| 2.4 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES..... | 38 |
| 2.5 TOXICOLOGIA..... | 39 |
| 2.5.1 <i>Artemia salina</i> Leach..... | 40 |
| 2.6 ECOTOXICOLOGIA..... | 42 |
| 2.6.1 Bioindicadores..... | 44 |
| 2.6.2 Parâmetros Genotóxicos..... | 45 |
| 2.6.3 Parâmetros Hematológicos..... | 47 |
| 2.6.4 <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818)..... | 49 |
| 3 OBJETIVOS..... | 51 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 51 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 51 |
| 4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... | 52 |

| | |
|--|----|
| 4.1 COLETA DE MATERIAL VEGETAL..... | 52 |
| 4.2 SECAGEM E TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL..... | 53 |
| 4.3 OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E HIDROLATO..... | 53 |
| 4.4 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE <i>A. canelilla</i> | 54 |
| 4.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS..... | 56 |
| 4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... | 57 |
| 4.6.1 Preparo de Soluções Estoque..... | 58 |
| 4.6.2 Preparo das Soluções de Ácido Ascórbico e Quercetina..... | 59 |
| 4.6.3 Preparo da Solução de DPPH..... | 59 |
| 4.6.4 Ensaio da Atividade Antioxidante..... | 59 |
| 4.6.5 Avaliação dos Resultados..... | 60 |
| 4.6.6 Análise Estatística..... | 61 |
| 4.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> | 61 |
| 4.7.1 Preparo das Soluções Teste..... | 61 |
| 4.7.2 Preparo do Meio de Cultivo..... | 61 |
| 4.7.3 Exposição dos Náuplios de <i>A. salina</i> | 62 |
| 4.7.4 Avaliação dos Resultados..... | 62 |
| 4.8 ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE AO <i>Colossoma macropomum</i> | 63 |
| 4.8.1 Obtenção dos Animais e Aclimação..... | 63 |
| 4.8.2 Acompanhamento da Qualidade da Água..... | 63 |
| 4.8.3 Preparação da Solução-teste de <i>A. canelilla</i> | 64 |
| 4.8.4 Protocolo Experimental..... | 64 |
| 4.8.6 Hematócrito (Ht)..... | 66 |
| 4.8.7 Concentração de Hemoglobina (Hb)..... | 67 |
| 4.8.8 Concentração de Metahemoglobina (MtHb)..... | 67 |
| 4.8.9 Contagem de Eritrócitos (RBC)..... | 68 |
| 4.8.10 Índices Hematimétricos..... | 68 |
| 4.8.11 Concentração de Glicose Sanguínea..... | 69 |
| 4.8.12 Análise Estatística..... | 69 |
| 4.9 FORMULAÇÃO COSMÉTICA..... | 69 |
| 4.9.1 Preparo das Emulsões..... | 69 |
| 4.9.2 Análise Macroscópica das Formulações..... | 70 |

| | |
|---|-----|
| 4.9.3 Teste de Estabilidade Preliminar | 70 |
| 4.9.3.1 Teste de Centrifugação | 71 |
| 4.9.3.2 Estresse Térmico..... | 71 |
| 4.9.3.3 Ciclo Gela-Degela | 71 |
| 4.9.3.4 Determinação do Valor do pH..... | 71 |
| 4.9.3.5 Análise dos Resultados | 72 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 73 |
| 5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 73 |
| 5.2 ENSAIO ANTIMICROBIANO | 87 |
| 5.3 CITOTOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> | 90 |
| 5.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS | 92 |
| 5.4.1 Parâmetros físico-químicos | 92 |
| 5.4.2 Parâmetro genotóxico | 93 |
| 5.4.3 Parâmetros hematológicos | 94 |
| 5.5 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR DA EMULSÃO COSMÉTICA | 96 |
| 6 CONCLUSÕES | 100 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 102 |

1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, plantas e produtos naturais de origens diversas vêm sendo utilizados com finalidades medicinais. Inicialmente, o emprego de plantas se dava na forma de tinturas, chás, cataplasmas e pós, entre outras formulações farmacêuticas (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Ao conhecimento tradicional agregou-se, posteriormente, uma base científica sólida, resultando no desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento de diferentes doenças humanas (LEE, 2004).

A Amazônia dispõe de uma rica biodiversidade que pode ser explorada como opção de investimento principalmente pela indústria de cosméticos e de medicamentos. Além de trazer divisas, oferece oportunidade para geração de emprego não só na zona urbana, mas, sobretudo, na zona rural, contribuindo para a descentralização de renda e, conseqüentemente, para a interiorização do desenvolvimento. De fato, os empreendimentos que utilizam matérias-primas naturais têm como fornecedores a população rural que necessariamente precisa se conscientizar de que a extração ou cultivo desses produtos tem que estar associado aos cuidados de conservação desses recursos para que se tenha continuidade, por muitos anos, de mais uma opção de renda para o sustento de suas famílias. No entanto, as informações disponíveis ainda são insuficientes para atrair investidores, dando-lhes garantia de que esses empreendimentos são rentáveis economicamente, ao mesmo tempo, ambientalmente sustentáveis e socialmente mais justos (SEBRAE, 2008).

Uma forma de agregar valor a um produto natural, utilizando-se dos recursos naturais da Amazônia, é transformando-o em um fitocosmético que pode ser definido como um cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal, seja um extrato, óleo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto (ISAAC et al., 2008).

Sendo assim, o presente estudo justifica-se devido ao fato de que a utilização de óleos, extratos ou do hidrolato da preciosa (*Aniba canelilla*) em uma formulação cosmética contribui para verificar o potencial destes compostos, vislumbrando uma aplicabilidade de interesse industrial. Portanto, o desenvolvimento deste projeto sinaliza para o aproveitamento dos recursos naturais da região Amazônica, primando pelo desenvolvimento sustentável e consequente desenvolvimento regional, a partir de um estudo químico, biológico e toxicológico de uma planta amazônica para subsidiar a elaboração de produtos biotecnológicos assegurando sua eficácia e qualidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FITOCOSMÉTICOS

2.1.1 Origem dos Cosméticos

A palavra *cosmético* origina da palavra grega *kosmeticós*, que significa “hábil em adornar”. O uso de cosméticos remonta há, pelo menos, 30 mil anos. Os povos primitivos tinham o hábito de pintar o corpo para fins ornamentais e religiosos. Muitos cosméticos se originaram na Ásia, mas os primeiros registros de seu uso estão no Egito, onde, segundo registros da época, a famosa Cleópatra se banhava com leite de cabra para obter uma pele mais suave e mais macia (SEBRAE, 2008).

Na Bíblia, é possível encontrar muitos relatos do uso de cosméticos pelos israelitas e por outros povos do antigo Oriente Médio, como: a pintura dos cílios (de Jezebel) com um produto à base de carvão; os tratamentos de beleza e banhos com bálsamos que Ester tomava para amaciar sua pele; e a lavagem com vários perfumes e óleos de banho dos pés de Jesus, por Maria - irmã de Lázaro.

Os gregos e romanos foram os primeiros povos a produzir sabões, que eram preparados a partir de extratos vegetais muito comuns no Mediterrâneo, como o azeite de oliva e o óleo de pinho, e também a partir de minerais alcalinos obtidos a partir da moagem de rochas. Atores do teatro romano eram grandes usuários de maquiagem para poderem incorporar diferentes personagens ao seu repertório. Pastas eram produzidas misturando óleos com pigmentos naturais extraídos de vegetais (açafraão ou a mostarda) ou de rochas. Mortes por intoxicação eram comuns entre os atores, pois muitos dos pigmentos minerais da época continham chumbo ou mercúrio em sua composição (GALEMBECK e CSORDAS, 2009).

Mais ou menos no ano de 180 d.C., na era Romana, um médico grego chamado Claudius Galeno realizou sua própria pesquisa na manipulação de produtos cosméticos, iniciando, assim, a era dos produtos químico-farmacêuticos. Ele desenvolveu um produto chamado *Unguentum refrigerans*, uma espécie de creme frio, composto de cera de abelha e bórax (SEBRAE, 2008).

A Idade Média reprimiu o uso de cosméticos, pois o Cristianismo proibia o culto à higiene e exaltação da beleza. Assim, o uso de cosméticos desapareceu completamente na

Europa. Somente no período das Cruzadas houve o ressurgimento dos cosméticos, tendo como meta cultivar a beleza. Neste período ainda persistiam os costumes de não tomar banho regularmente e para mascarar o odor corporal, muitas pessoas utilizavam perfumes criados para este fim, proporcionando o crescimento de perfumes em Paris (CAMPANHOLO, 2009).

No final do século XVIII, o uso de cosméticos ficou fora de moda. O Parlamento Inglês, na ocasião, pregava que a utilização de cosméticos e outros produtos do gênero eram atos de bruxaria e quem fizesse uso de tais produtos seria punido pela lei contra a bruxaria. Este período foi um dos mais amargos na história dos cosméticos. O retorno dos cosméticos ocorreu por volta do século XIX, já na Idade Contemporânea, quando cosmético não mais era associado com bruxaria e os produtos desse gênero eram vistos com os seus reais propósitos. Donas de casa, então, começaram a fabricá-los em suas próprias residências e entre os ingredientes utilizados incluíam-se sopas, limonadas, leite, água de rosas, creme de pepino, e outros elementos que constituíam receitas exclusivas de cada família (SEBRAE, 2008).

As indústrias de cosméticos surgiram no início do século XX, em função da necessidade de as mulheres comprarem produtos prontos, pois muitas delas já trabalhavam fora de casa (KLEPACKI, 2006).

2.1.2 Definição de Cosméticos

Atualmente, conforme a Câmara Técnica de Cosméticos (Catec), na Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005 (ANVISA, 2008), a definição de cosméticos no Brasil é a seguinte:

“Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, 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”.

A definição adotada pelo Mercosul, através da Resolução nº 07 de 2005 é essencialmente a mesma definição de cosmético adotada pela União Européia (UE): “Produtos para higiene pessoal, cosméticos, perfumes e as substâncias ou preparados formados por substâncias naturais e sintéticas, e suas misturas, para uso externo em diversas partes exteriores do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos genitais

externos, dentes e as membranas mucosas da cavidade bucal, com o exclusivo ou principal objetivo de limpar, perfumar, alterar a aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los e mantê-los em boas condições.”

De acordo com a Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, os produtos cosméticos são classificados em dois tipos:

- **Produtos Grau 1:** são produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com a definição adotada no item 1 do Anexo I desta Resolução e que se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requeiram informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto:

- **Produtos Grau 2:** são produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com a definição adotada no item 1 do Anexo I desta Resolução e que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso.

2.1.3 Cosméticos à Base de Produtos Naturais

Um importante conceito se associa aos cosméticos naturais: trata-se dos “produtos orgânicos”. Pesquisas indicam que o conceito de produtos orgânicos ainda está muito associado à alimentação e, principalmente, às leguminosas. Entre esses produtos menos conhecidos estão os cosméticos, que não são exatamente orgânicos, e sim *naturais* (SEBRAE, 2008).

Os cosméticos são produzidos com extratos de plantas cultivadas com métodos orgânicos, e elaborados em um ambiente industrial semelhante ao de um laboratório químico-farmacêutico. Nesse caso, a diferença entre o natural e orgânico é pequena, mas as semelhanças são grandes (ANVISA, 2008).

Entretanto, há diferenças significativas entre cosméticos naturais e cosméticos com ingredientes naturais em sua formulação. Isto quer dizer que não basta haver um ingrediente natural na fórmula para fazer do cosmético um produto natural. Para que os cosméticos sejam considerados naturais, devem seguir rígidos padrões em seu processo de formulação e não conter qualquer ingrediente químico entre seus componentes.

Desse modo, empresas como Natura, Boticário, Chamma da Amazônia e outros, que construíram a força de suas marcas a partir da ênfase da presença de ingredientes naturais e/ou provenientes da floresta amazônica em suas fórmulas, não produzem cosméticos puramente naturais. São cosméticos com formulação química tradicional, que contêm alguns ingredientes ativos de origem natural, mas também contêm conservantes e outros aditivos químicos em sua composição. Os ingredientes naturais, devido aos baixos percentuais nas formulações, são fortes apelos promocionais para o mercado consumidor, mas não bastam para enquadrar legalmente esses cosméticos na categoria de cosméticos naturais (ANVISA, 2008).

Por outro lado, o uso de conservantes e outros ingredientes químicos é o que viabiliza a venda desses produtos, já que a total ausência deles resultaria em um tempo de validade (*shelf life*) tão curto que tornaria impossível a produção e a comercialização em nível nacional ou internacional (ANVISA, 2004).

Assim, devem-se considerar duas importantes propriedades de qualquer cosmético, que são a estabilidade e a durabilidade do produto. A opção pelo não-uso de conservantes em cosméticos orgânicos torna sua validade muito menor e o crescimento microbológico (deterioração do produto pelo crescimento de microorganismos) tende a ser mais acelerado (CEFALI, et al., 2008).

Sob o ponto de vista do mercado, os consumidores que preferem usar cosméticos naturais ou com apelo natural, entendem que a pele merece um cuidado especial, o mesmo cuidado que é empregado na produção do próprio cosmético. Outra associação interessante que vem à tona quando se fala em produtos naturais e orgânicos é a valorização da harmonia. Os cosméticos naturais não são preparados apenas para manter a pele bonita e sadia, eles procuram estender seus efeitos a todo o organismo, buscando um equilíbrio saudável. Os resultados estéticos finais dependerão, portanto, da saúde total do corpo (SEBRAE, 2008).

2.1.4 Cosméticos Naturais

Em relação à origem dos cosméticos naturais, especificamente, o uso de extratos, mel, resinas, corantes e óleos essenciais na indústria de cosméticos vem da Antigüidade. Na China, na Índia e no Oriente Médio, as plantas aromáticas, os óleos, as águas perfumadas e as preparações cosméticas eram utilizadas na cozinha, cosmética, na medicina e nas práticas religiosas (GALEMBECK e CSORDAS, 2009).

Com o desenvolvimento da química orgânica no final do século XIX, começa-se a desvendar a composição química dos óleos e dos extratos naturais. Como resultado destas pesquisas, a indústria de perfumes passou de 500 a mais de 1.000 fragrâncias sintetizadas. O desafio na continuidade da sintetização de novos perfumes consistia na volatilidade do odor que se modificava ao cortar ou transportar as plantas. Nos anos 70, os métodos de análise instrumental (cromatografia e espectrometria) permitiam captar as fragrâncias de plantas cortadas, reproduzindo sinteticamente sua composição (BARROS, 2007).

Apesar de facilidades na bioprospecção, a expansão da demanda por produtos naturais, reorientou parte da indústria de cosméticos para extratos e óleos essenciais. Os óleos essenciais, também chamados óleos voláteis, são misturas de substâncias orgânicas voláteis, formados por uma mistura de componentes, de consistência semelhante ao óleo. São insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos e obtidos por hidrodestilação das plantas. A extração dos óleos por destilação, apesar de conhecida por séculos, se torna industrial no início do século vinte com o desenvolvimento da indústria de perfumaria e da agroindústria. Estes óleos são encontrados em diversas partes das plantas, principalmente folhas e flores, em estruturas especializadas, como os pelos glandulares e bolsas secretoras. A maioria deles possui cheiro ou aroma agradável (SEBRAE, 2008).

A aromaterapia, terapia através da essência das plantas, tem sido utilizada pela medicina e na automedicação. Os óleos essenciais são ativos e eficazes principalmente para a pele, cabelos, digestão, stress, dor e revitalização do organismo e o mel entra nesta categoria (ARAÚJO-JÚNIOR, 2009).

A indústria de cosméticos moderna foi, então, buscar na sabedoria milenar da fitoterapia as receitas para rejuvenescimento, hidratação e relaxamento da pele e do cabelo. Os óleos essenciais transformaram-se em gel e ganham novas embalagens (LEITE, 2009).

Neste contexto, as plantas amazônicas ganham um destaque especial pois, com uma rica biodiversidade, possui plantas aromáticas, produtoras de óleos essenciais, que podem ser empregadas em diversas indústrias biotecnológicas. As plantas da família Lauraceae, conhecidas pela ampla utilização no setor de perfumaria, tem sido estudada por seu grande potencial econômico, como o caso do linalol extraído do pau-rosa. Seus estudos químico-biológicos apontam para um elevado potencial para bioprospecção de novos bioprodutos, alavancando a indústria biotecnológica.

2.2 FAMÍLIA LAURACEAE

Lauraceae é uma família com distribuição tropical e subtropical, concentrada em florestas pluviais da Ásia e Américas. A família inclui cerca de 50 gêneros e 2.500 a 3.000 espécies (WERFF e RICHTER, 1996), sendo que no Brasil ocorrem 25 gêneros e cerca de 400 espécies. A grande maioria são árvores e arbustos, com cheiro característico nas folhas, quando esmagadas, devido à presença de óleos essenciais.

As Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica seja no uso da madeira, na culinária e na medicina popular (Tabela 1) (RAGGI, 2008). É conhecida por possuir espécies aromáticas, que produzem óleos essenciais e alcançam alto valor no mercado, pois são frequentemente usadas como fonte de matéria prima nas indústrias (BRITO, 2009).

Tabela 1. Utilização de espécies de Lauraceae na medicina popular (RAGGI, 2008).

| Espécie | Emprego na medicina popular |
|------------------------------|---|
| <i>Aniba canelilla</i> | Problemas estomacais |
| <i>Cinnamomum cássia</i> | Resfriados |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i> | Resfriados e problemas estomacais |
| <i>Cryptocarya moschata</i> | Dores no estômago e cólica |
| <i>Laurus nobilis</i> | Sudorífico e contra flatulências |
| <i>Nectandra grandiflora</i> | Anti-reumática, digestiva e diurética |
| <i>Ocotea aciphylla</i> | Tônico e estomáquico |
| <i>Ocotea cajumari</i> | Inapetência e males intestinais |
| <i>Ocotea odorífera</i> | Sudorífera, anti-reumática, anti-sifilítica e diurética |
| <i>Ocotea pretiosa</i> | Reumatismo |
| <i>Ocotea pulchella</i> | Estomáquico, emenagogo e tônicos do útero |
| <i>Persea americana</i> | Diurético |

Após séculos de exploração desordenada na região Amazônica, as espécies da família Lauraceae continuam tendo interesse comercial, mas com poucos estudos químicos e farmacológicos (ALCÂNTARA et al., 2010). Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém a maioria das espécies tem seu uso

restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

A maioria dos membros da família são caracterizados por uma hábito lenhoso e são de grande importância econômica em todo o mundo por fornecerem também madeira de boa qualidade além de aromática. As substâncias importantes e os óleos são amplamente empregados nas indústrias farmacêutica e de alimentos, com ênfase nos gêneros *Aniba*, *Licaria*, *Nectandra* e *Ocotea* (MARQUES, 2001; SILVA et al., 2009).

Espécies produtoras de óleos essenciais como o de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), casca preciosa (*Aniba canelilla*) e sassafrás (*Ocotea odorifera*) estão em extinção, ou próximas dela, mas ainda agregam grande valor econômico para as comunidades da região, abastecendo os mercados nacionais e internacionais de cosméticos e perfumes (SILVA et al., 2009).

2.2.1 O Gênero *Aniba* Aubl.

As espécies do gênero *Aniba* Aubl. destacam-se pelo alto valor econômico, devido à constituição do óleo essencial, encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca. O primeiro registro de que se tem conhecimento é de Aublet, em uma viagem de estudos à Guiana Francesa, no período de 1762 – 1764, que registrou a espécie com o nome de *Licaria guianensis* Aubl., devido a mesma ser conhecida pelo nome de “Licari”, pelos indígenas. Sua importância econômica teve início em 1875 quando Samarin, na França, obteve o óleo essencial por destilação. Em 1881, Morim, também na França, separou o óleo essencial de um álcool e o chamou de linalol. Sua primeira exportação para a Europa aparece registrada na Guiana Francesa em 1883. Anos mais tarde, Koeller sugeriu que a espécie fosse denominada *Ocotea caudata* Koeller. Posteriormente, Mez sugeriu o nome *Aniba parviflora* (Meiss.) Mez. Contudo, Ducke em 1926 passou a chamá-la *A. rosaeodora* Ducke. O próprio autor, neste mesmo ano, verificou que havia diferenças entre as espécies da Amazônia e das Guianas, daí passou a chamá-la *A. rosaeodora* var. *amazonica* Ducke. A última mudança foi feita em 1938, quando Kostermans propôs a alteração para *A. duckei* Kosterm. (SUDAM, 1972).

A *A. fragans* Ducke é a espécie que mais produz óleo essencial, segundo observações de técnicos da Food and Agriculture Organization (FAO). De acordo com Ducke, a exploração comercial torna-se impossibilitada pela escassez de matéria-prima (SUDAM,

1972). Outras espécies, como *A. canelilla* (H.B.K.) Mez e *A. parviflora* (Meissn) Mez também são usadas em perfumaria. Porém, esta última, é de ocorrência muito rara, o que restringe sua exploração.

Os caboclos geralmente distinguem três tipos de pau-rosa, conforme a coloração do lenho: “pau-rosa mulatinho”, que é mais escuro, de densidade elevada, e que submerge quando as toras são cortadas e atiradas na água; “pau-rosa itaúba”, de cor amarelado, menos denso, e “pau-rosa imbaúba”, muito leve e quase branco. O primeiro é mais rico em essência e o último, mais pobre (BASTOS, 1943). O óleo de pau-rosa já chegou a ocupar o terceiro lugar na pauta de exportação da região Amazônica, cabendo à borracha e à castanha, o primeiro e segundo lugares, respectivamente. A exploração dos paus-rosa, fez com que essas espécies fossem levadas à beira da extinção (MARQUES, 2001).

As 41 espécies de *Aniba*, aproximadamente, ocorrentes no Brasil, cujos representantes encontram-se em sua maioria na Amazônia (MELO et al., 2006) podem ser divididas em 3 grupos, de acordo com a natureza química do constituinte predominante no óleo essencial: o grupo do linalol (*A. roseodora*, *A. duckei*); o grupo do benzoato (*A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri* (Meiss.) Mez, *A. burchelli* Kosterm., *A. parviflora*, *A. permolis* (Nees) Mez e *A. guianensis* Aubl.) e o grupo do alibenzeno (*A. canelilla*, *A. hostmanniana* (Nees) Mez e *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm.) (MORAES et al., 1972; GOTTLIEB et al., 1981). Alvarenga et al. (1977) afirmam que *A. burchelli* apresenta, além do benzoato de benzila, alto teor de alibenzenos e até um propenilbenzeno, sendo que o benzoato de benzila foi anteriormente localizado em *C. zeylanicum* (GOTTLIEB, 1972) e *O. teleiandra* (NAVES et al., 1961).

2.2.2 *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez

A espécie *Aniba canelilla* (Figura 1) é nativa da região Amazônica, distribuindo-se amplamente nas matas pluviais do interior da Guiana Francesa no leste, ao longo do escudo das Guianas, atravessando Suriname, Venezuela e Colômbia até à Amazônia peruana. No Brasil, ocorre nos estados do Pará e Amazonas (LUPE, 2007). Seus sinônimos botânicos são *Aniba elliptica* A.C. Sm. e *Cryptocarya canelilla* Kunth. É popularmente conhecida como: casca-do-maranhão, canela-cheirosa, folha-preciosa, arapaima, amapaiama, pereiorá, pau-precioso, pau-rosa; *rosewood*, *brazilian rosewood* (inglês); *legno di rose*; *rosenholzbaum*; *bois de rose*; *palo de rosa* (MAIA et al., 2000; MORS et al., 2000).



Figura 1. *Aniba canelilla* (preciosa).

Aniba canelilla (H.B.K.) Mez tem importância histórica na região amazônica por inicialmente ter sido confundida com árvores de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) durante a viagem em 1540 de Pizarro e Orellana dos Andes até a foz do Amazonas e durante a expedição de Humboldt e Bonpland (Figura 2) em 1800 no Rio Orinoco para encontrar a famosa “canela Amazônica” (SILVA et al., 2007).



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Humboldt_and_Bonpland_in_the_Jungle.jpg

Figura 2. Alexander von Humboldt e Aimé Bonpland na Floresta Amazônica.

Esta árvore fornece madeira de ótima qualidade, apropriada para mobiliário e construção civil (LUPE, 2007) e é enormemente utilizada na medicina popular contra artrite, esgotamento nervoso, como redutora da albumina no sangue (SILVA, 1977), hidropsia, catarro crônico, sífilis, leucorréia, aerofagia, males do coração (INTERAMINENSE et al., 2010), dor após extração de dentes (MORS et al., 2000), anemia, anti-desentérico, anti-espasmódico e anti-inflamatório, digestivo, eupéptico, peitoral e estimulante (MAIA et al., 2000), bem como resfriados, dor de cabeça e náuseas (SILVA, 1977; LUPE, 2007).

Os óleos essenciais das folhas e galhos finos foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-EM) por Lima (2004) e por CG-EM e Microextração em Fase Sólida (HS-SPME¹) por Lupe (2007), identificando como composto majoritário o 1-nitro-2-feniletano (Figura 3), uma molécula rara em produtos naturais, derivada da fenilalanina.

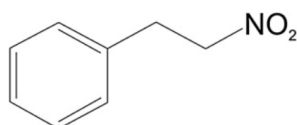


Figura 3. Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano.

Outras substâncias presentes no óleo essencial de *A. canelilla* são eugenol, linalol, metileugenol (Figura 4), anabasina, anibina e tanino (LORENZI e MATOS, 2002) α - pineno, β -pineno, β -felandreno, β -cariofileno, β -sesquifelandreno, *p*-cimeno, linalol, α -copaeno e espatulenol (MAIA et al., 2000).

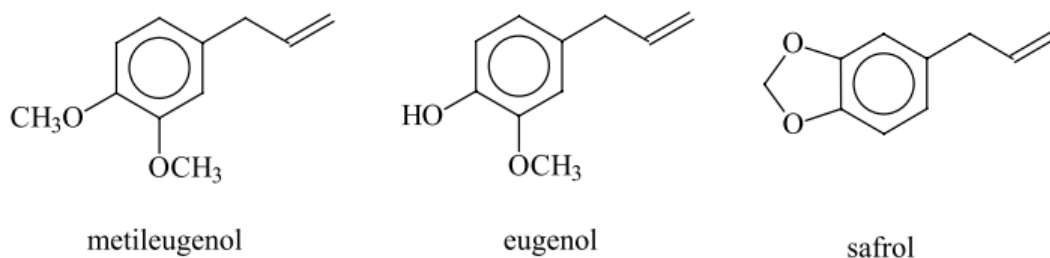


Figura 4. Estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial de *A. canelilla*.

¹ A Microextração em Fase Sólida (SPME) usa uma fibra de sílica fundida revestida por um filme fino de polímeros puros ou dispersões de adsorventes sólidos tais como polidimetilsiloxano (PDMS) e PDMS / divinilbenzeno (PDMS / DVB), respectivamente, pois ambos são capazes de adsorver analitos a partir de diferentes matrizes. SPME é normalmente preferível a outras técnicas, porque é simples, relativamente barato e não utilizam solventes.

Em outro estudo (MAIA et al., 1996) foram identificados sesquiterpenos no óleo essencial das folhas, bem como a presença de moléculas precursoras da biossíntese de 1-nitro-2-feniletano como benzonitrila, benzoacetaldeído e benzoacetoneitrila. Nas cascas do caule o óleo essencial apresenta os alcalóides benziltetrahydroisoquinolina (LORENZI e MATOS, 2002), tetrahydroprotoberberina (TAVEIRA et al., 2003), (*R*)-(+)-noranicanina, anicanina (OGER et al., 1992), canelila, norcanelilena (LUPE, 2007), (-) norcanelilina, (+) canelilina e canelilinoxina (OGER et al. 1994a). A Tabela 2 apresenta a composição química do óleo essencial e extratos metanólicos de *A. canelilla* (SILVA et al., 2007).

2.3 CONTROLE MICROBIANO

Existe a necessidade crescente no desenvolvimento de métodos analíticos específicos para quantificar os metabólitos secundários de plantas, sendo os teores destes utilizados como parâmetros para se avaliar a qualidade e padronização de extratos vegetais. O teor de componentes ativos é fator imprescindível para a eficácia do fitocosmético. Baixos teores em substâncias ativas representam menor biodisponibilidade desses componentes, afetando, assim, sua eficácia e terapêutica.

Um dos grandes problemas relacionados com a qualidade de cosméticos a base de produtos naturais e matérias-primas, principalmente em seu estado cru, é a sua contaminação microbiológica. A contaminação microbiológica do material vegetal pode se tornar um sério risco para os usuários de plantas medicinais, pois pode compreender a contaminação inclusive com agentes potencialmente patogênicos (TASSANEEYAKUL et al., 2004). Material contaminado pode representar falta de cuidado nas etapas de plantio, colheita e processamento do material (MARTINS et al., 2001). A própria água de irrigação pode ser uma fonte de contaminação microbiana.

Em princípio, a carga microbiana de uma planta é o resultado de uma série de influências causadas por fontes animadas e inanimadas, podendo ser facilmente transferida por vetores aéreos ou pelo solo (KNEIFEL et al., 2002). No entanto, certas plantas contêm barreiras naturais e metabólitos com ação antimicrobiana que exercem efeito inibitório no crescimento de microrganismos (DORMAN e DEANS, 2000; SANTOS et al., 2007).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial e extratos metanólicos de *A. canelilla* (SILVA et al., 2007).

| N. | Componente | RI ^a | LSOA (%) ^b | LSOB (%) ^b | TWOA (%) ^b | TWOB (%) ^b | BWOB (%) ^b |
|--------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | α -pineno | 937 | 0,4 | 0,2 | | | |
| 2 | benzaldeído | 961 | | 1,1 | 0,4 | | |
| 3 | β -pineno | 978 | 0,3 | 0,2 | | | |
| 4 | Mirceno | 989 | 0,1 | 0,9 | | | 0,1 |
| 5 | α -felandreno | 1003 | | 0,1 | | | |
| 6 | <i>p</i> -cimeno | 1026 | | 0,3 | | | |
| 7 | Limoneno | 1029 | | 1,2 | | | |
| 8 | β -felandreno | 1030 | 0,6 | | | | |
| 9 | δ -3-careno | 1031 | | 0,2 | | | |
| 10 | (<i>Z</i>)- β -ocimeno | 1037 | | 0,2 | | | |
| 11 | Fenilacetaldéido | 1040 | 0,3 | | | | |
| 12 | (<i>E</i>)- β -ocimeno | 1050 | | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 1,2 |
| 13 | Linalol | 1097 | 0,8 | 7,6 | | | |
| 14 | trans- <i>p</i> -menth-2-en-1-ol | 1141 | | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,3 |
| 15 | α -terpineol | 1189 | | 0,2 | | | |
| 16 | Safrol | 1286 | | | | 0,5 | |
| 17 | 1-nitro-2-feniletano | 1327 | 91,8 | 74,0 | 92,1 | 70,2 | 90,3 |
| 18 | Eugenol | 1359 | | 0,9 | 1,2 | 0,8 | 1,7 |
| 19 | α -copaeno | 1377 | 0,4 | 1,3 | | | |
| 20 | β -elemeno | 1390 | 0,1 | | | | |
| 21 | Metileugenol | 1403 | | | 4,3 | 25,8 | 2,0 |
| 22 | Longifoleno | 1405 | 0,4 | | | | |
| 23 | α -gujuneno | 1410 | | 0,3 | | | |
| 24 | β -cariofileno | 1418 | 1,6 | 3,5 | | | |
| 25 | Aromadendreno | 1441 | | 0,1 | | | |
| 26 | α -humuleno | 1454 | 0,3 | 0,4 | | | |
| 27 | β -selineno | 1488 | 0,1 | 0,8 | | | |
| 28 | α -selineno | 1497 | 0,1 | | | | |
| 29 | β -bisaboleno | 1005 | 0,3 | | | | |
| 30 | δ -cadineno | 1522 | 0,1 | | | | |
| 31 | β -sesquifelandreno | 1523 | | 0,6 | | | |
| 32 | Spatulenol | 1578 | 0,1 | 0,3 | | | |
| 33 | Óxido de cariofileno | 1583 | 0,3 | 1,6 | | | |
| 34 | Guaiol | 1600 | 0,1 | | | | |
| 35 | humuleno epóxido II | 1607 | 0,1 | | | | |
| 36 | 1-epi-cubenol | 1642 | | 0,3 | | | |
| 37 | epi- α -muurulol | 1642 | | 0,2 | | | |
| 38 | selil-11-en-4- α -ol | 1660 | 1,3 | 1,7 | 0,4 | 1,2 | 3,5 |
| 39 | Bulnesol | 1670 | 0,1 | | | | |
| Total | | | 99,7 | 99,3 | 99,5 | 99,3 | 99,0 |

^aÍndices de retenção calculados para todos os constituintes voláteis usando séries homólogas de *n*-alcanos. ^bPercentagem média das três corridas obtidas da integração eletrônica por FID. LSOA e LSOB = óleo das folhas e galhos, respectivamente. TWOA e TWOB = extratos metanólicos da madeira do tronco, amostras A e B, respectivamente. BWOB = extratos metanólicos da casca do tronco.

Produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos, permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiência e outras doenças (ANGÉLICO, 2011). Extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias.

O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencentes às diferentes classes de metabólitos secundários, tais como, cumarina, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (COWAN, 1999). Várias pesquisas realizadas com plantas demonstraram que os compostos fenólicos como os flavonóides possuem potente ação antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2000).

O uso de plantas aromáticas na medicina popular é bastante difundido, em especial no tratamento de infecções microbianas, inflamações, dores, eczemas, etc. Entre as propriedades farmacológicas encontradas em óleos voláteis estão as atividades antifúngica (TULLIO et al., 2007), antimicrobiana (WALLACE, 2004; DORMAN e DEANS, 2000; DUARTE, 2007), inseticida (SAMARASEKERA e KALHARI, 2006), antiinflamatória (JUERGENS et al., 1998), analgésica (SILVA, 2003), antioxidante (SILVA et al., 2007), etc. Os óleos essenciais também podem ser utilizados na indústria alimentícia por suas atividades antimicrobianas e antifúngicas como aditivos nos alimentos e na ração animal (WALACE, 2004). Alguns mono e sesquiterpenos, como mirceno, canfeno, α -pineno e longifoleno retardam o crescimento de fungos decompositores (DELL e MCCOMB, 1979; KELSEY et al., 1984).

2.3.1 Bactérias

A pesquisa de novos agentes antibacterianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas à AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001). O estudo de agentes antibacterianos faz parte do primeiro *screening* na descoberta de atividades biológicas de fármacos e cosméticos, sendo de extrema importância, principalmente no Brasil que dispõe de uma imensa biodiversidade (OSTROSKY et al., 2008).

As bactérias são organismos unicelulares procariotos que apresentam, quase sempre, um envoltório rígido, a parede celular, responsável por sua forma e proteção. A maioria das bactérias desidrata-se e morre em ambientes de alta salinidade, pois perde água por osmose. É por isso que se costuma salgar certos alimentos, como carnes e peixes para preservá-los do ataque de bactérias. A penicilina e alguns outros antibióticos impedem que certas bactérias produzam substâncias componentes de sua parede celular, levando-a a morte.

Na parte interna da parede celular encontra-se a membrana plasmática, de composição semelhante às células eucarióticas. No citoplasma há milhares de grânulos, os ribossomos, responsáveis pela síntese de proteínas. A célula da bactéria *Escherichia coli*, por exemplo apresenta cerca de 15 mil ribossomos, cada um capaz de produzir uma molécula de proteína por minuto, o que nos dá uma ideia da capacidade de crescimento e multiplicação das bactérias (AMABIS e MARTHO, 2010).

Na indústria de cosméticos o *Challenge test* é utilizado para verificar se o agente conservante da formulação cosmética está adequado (ANVISA, 2004). As bactérias que compõem o Teste Desafio do Sistema Conservante são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2.3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, baciliforme. Seu ambiente de origem é o solo, mas sendo capaz de viver mesmo em ambientes hostis, sua ocorrência é comum em outros ambientes. É um patógeno oportunista, ou seja, que raramente causa doenças em um sistema imunológico saudável, mas explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. Essa característica, associada à sua resistência natural a um grande número de antibióticos e antisépticos a torna uma importante causa de infecções hospitalares (MURRAY, 2004).

Patógeno de indivíduos com sistema imunológico comprometido, a *P. aeruginosa* normalmente infecta o aparelho respiratório, aparelho urinário, queimaduras, e também causa outras infecções sanguíneas. Em raras circunstâncias pode causar pneumonia por contágio entre humanos (FINE et al., 1996). É a causa mais comum de infecções no ouvido e por queimaduras, e é a mais frequente colonizadora de equipamentos médicos. Se a infecção ocorrer em áreas vitais ela pode ser fatal.

A piocianina é um dos fatores de virulência da bactéria, conhecido, em teste de laboratório, por causar morte em *Caenorhabditis elegans* por estresse oxidativo. No entanto, pesquisas indicam que o ácido salicílico pode inibir a produção de piocianina (PRITHIVIRAJ et al., 2005).

2.3.1.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa, que, juntamente com o *Staphylococcus aureus* é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiotes do homem. O seu descobridor foi o alemão-austríaco Theodor Escherich, em 1885. A *E. coli* assume a forma de um bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. São aeróbias e anaeróbias facultativas. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos dispostos em volta da célula (MURRAY, 2004).

A *E. coli* é um dos poucos seres vivos capazes de produzir todos os componentes de que são feitos, a partir de compostos básicos e fontes de energia suficientes. Ela é lactase positiva, uma enzima fermentadora de açúcares que é grandemente responsável pela flatulência de cada pessoa, especialmente após o consumo de leite e seus derivados.

Possuem fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação, impedindo o arrastamento pela urina ou diarreia. Muitas produzem exotoxinas. São susceptíveis aos ambientes secos, aos quais não resistem. Possuem lipopolissacarídeo (LPS), como todas as bactérias Gram-negativas, que ativa o sistema imunitário de forma desproporcionada e a vasodilatação excessiva provocada pelas citocinas produzidas, podendo levar ao choque séptico e morte em casos de septicemia (MURRAY, 2004).

2.3.1.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, também conhecido como estafilococo-dourado, é uma espécie de estafilococo coagulase-positivo. É uma das mais antigas bactérias simbiotes do homem. Porém, em grandes quantidades, pode ser uma virulenta espécie do seu gênero, devido à presença de toxinas.

Têm forma esférica (são cocos), cerca de 1 micrômetro de diâmetro, e formam grupos com aspecto de cachos de uvas com cor amarelada, devido à produção de carotenóides, sendo daí o nome de "estafilococo dourado". Cresce bem em ambientes salinos (MURRAY, 2004).

2.3.2 Fungos

Uma grande quantidade de fármacos obtida por meio da síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções micóticas. Entretanto, com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à aquisição de resistência por parte de seus agentes etiológicos frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO et al., 2004).

São poucas as formulações cosméticas que resistem à primeira inoculação do Teste de Desafio do Conservante (*Challenge test*). Por tal motivo remete-se à pesquisa de produtos naturais que possam apresentar atividade frente a microrganismos patogênicos, sendo estes compostos de grande valor para a indústria cosmética (OLIVEIRA et al., 2006).

Raggi (2008) constatou que o óleo essencial de *Ocotea nectandrifolia* foi ativo frente aos fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Oliveira et al. (2006) verificaram que os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* podem apresentar sinergismo com ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina com relação a *S. epidermidis*. Os autores também verificaram que houve diminuição da atividade inibitória de gentamicina, cloranfenicol e gentamicina contra *S. aureus* na presença do óleo essencial.

Os fungos são organismos eucarióticos que possuem células com parede de quitina, um polissacarídeo nitrogenado que também constitui o esqueleto dos insetos. Pode apresentar também hemicelulose e, mais raramente, celulose. No citoplasma ficam dispersos muitos grânulos de reserva de glicogênio. Além disso, em cada célula pode haver um só núcleo, ou dois pareados, além de ribossomos e mitocôndrias (SILVA-JÚNIOR et al., 2010).

Normalmente, as longas hifas formam um denso emaranhado que cresce irregularmente no interior do substrato, constituindo o micélio. Nos fungos superiores, o micélio se organiza produzindo corpo de frutificação, com forma bem definida, que caracteriza as diferentes espécies.

Atualmente, são conhecidos mais de 70 mil espécies de fungos e, a cada ano são descritas entre 1,5 e 2 mil novas espécies. Em algumas estimativas constam mais de 1,5 milhão de espécies de fungos vivos, número só superado pelo de espécies de insetos

(AMABIS e MARTHO, 2010). Os fungos que compõem o Teste Desafio do Sistema Conservante (*Challenge test*) são: *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

2.3.2.1 *Candida albicans*

Candida albicans é uma espécie de fungo diplóide que causa, oportunamente, alguns tipos de infecção oral e vaginal nos seres humanos. As infecções causadas por fungos emergiram como uma das principais causas de morte em pacientes com algum tipo de imunodeficiência (como é o caso dos portadores da AIDS e das pessoas que estão passando por algum tipo de quimioterapia). Além disso, esse fungo pode ser perigoso para pacientes cuja saúde já esteja enfraquecida, como por exemplo os pacientes de uma unidade de tratamento intensivo. Devido a estes fatores, a *C. albicans* tem despertado grande interesse das pesquisas na área de saúde e da medicina.

A *C. albicans* está entre os muitos organismos que vivem na boca e no sistema digestivo humano. Sob circunstâncias normais, pode ser encontrada em 80% da população humana sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais a sua saúde, embora o excesso resulte em candidíase (MURRAY, 2004).

A virulência e patogenicidade da *C. albicans* estão ligadas a diversos fatores, sendo a formação de hifas, a estrutura da sua superfície celular (que, durante o contato com células do hospedeiro, se adapta, sendo determinante para uma eficaz adesão e penetração), alterações fenotípicas (transição espontânea entre a forma típica de levedura, branca e circular, e uma forma opaca, em forma de pequenos bastões) e produção de enzimas extracelulares hidrolíticas, os mais estudados ao longo dos últimos anos (LOPES e ROSSO, 2010).

2.3.2.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é uma das espécies fúngicas mais comuns do gênero *Aspergillus*. Este fungo provoca uma doença chamada mofo-preto em algumas frutas e legumes como uva, cebola e amendoim, e é um contaminante comum de alimentos. Ele é encontrado no solo e é comumente relatado em ambientes internos, onde suas colônias pretas podem ser confundidas com as de *Stachybotrys* (cujas espécies são também chamadas de "bolor-negro"). Tem sido

relatado que algumas cepas de *A. niger* produzem potentes micotoxinas chamadas ocratoxinas (SAMSON et al., 2001).

2.4 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

A formulação para obtenção de cosméticos naturais significa dar a preferência, sempre que possível, aos derivados vegetais, evitando a sua substituição por substâncias sintéticas. É extremamente importante realizar um balanceamento lógico e coerente entre as matérias-primas sintéticas e naturais, maximizando a ação farmacológica, a fim de alcançar melhores efeitos (RODRIGUES, 2001; PIETRO et al., 2006). A presença de substâncias naturais antioxidantes e anti-radicais livres em formulações cosméticas tem favorecido as propriedades curativas e de prevenção relativas a envelhecimento precoce, pois esses compostos possuem baixa toxicidade em relação aos sintéticos e elevam a qualidade do produto minimizando os fenômenos de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem.

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzida para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's), as quais abrangem moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, também conhecidas como Radical Livre (RL), tornando-o muito instável, extraordinariamente reativo, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (GASPARRI, 2005).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, pois reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (MELO et al., 2006).

O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O₂ e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988).

A maioria dos radicais livres age muito rapidamente, podendo ser produzidos com a mesma velocidade com que desaparecem, sendo que quando atacam podem transformar a molécula atacada em outro radical livre, gerando reações em cadeia bastante danosas (YOUNGSON, 1995; CHORILLI et al., 2007a). Se estes radicais atacarem o DNA, ocorrem reações em cadeia causando danos e mutações no material genético ou até mesmo o rompimento dos filamentos de DNA (BUCHILI, 2002; HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000; CHORILLI et al., 2007b). Em termos gerais, o dano provocado pelos radicais livres apresenta uma reação química conhecida como oxidação, e os ataques dos radicais livres sobre o tecido são conhecidos como estresse oxidativo (CHORILLI et al., 2007a).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Formam um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição (SHAHIDI e NACZK, 2003). Outros oxidantes podem reparar o dano oxidativo a biomoléculas ou podem influenciar as enzimas que catalisam os mecanismos de reparação.

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos devem-se principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (MILIAUSKAS et al., 2004).

2.5 TOXICOLOGIA

Os produtos cosméticos são raramente associados com sérios danos à saúde. Entretanto, isto não significa que produtos cosméticos sejam sempre seguros, especialmente considerando os efeitos em longo prazo. Partindo do pressuposto de que estes produtos podem ser usados extensivamente durante um amplo período de nossa vida, é extremamente

necessário garantir a segurança e eficácia dos mesmos, através do controle da toxicidade do produto final e dos seus ingredientes (ROMANOWSKI e SCHUELLER, 1996; ANVISA, 2003; CHORILLI et al., 2007b).

Os ingredientes para uso em produtos cosméticos devem ser avaliados em termos de risco e não de dano, conseqüentemente a avaliação do risco deve relacionar o dano com o nível de exposição. A avaliação de segurança deve atender o conhecimento dos parâmetros toxicológicos de interesse dos ingredientes com base em dados correntes, observadas as condições de uso do produto cosmético e o perfil do consumidor alvo (ANVISA, 2003)

A utilização de bioensaios para monitoramento da atividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas têm sido incorporada à pesquisa fitoquímica com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994). A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica (MEYER et al., 1982), onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

2.5.1 *Artemia salina* Leach.

Um dos organismos que tem sido utilizado nestes bioensaios é uma espécie de microcrustáceo marinho, *Artemia salina* Leach. O primeiro trabalho relativo ao uso do camarão marinho em bioensaios foi publicado em 1956 (MICHAEL et al., 1956) e, a partir daí, inúmeros artigos têm sido reportados na literatura em estudos ambientais (PRICE et al., 1974; SORGELOOS et al., 1978), utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas, e têm sido proposto como teste padrão por Van Haecke e Persoone em 1982 (CAVALCANTE et al., 2000) e útil como teste preliminar biomonitorado para triagem da atividade biológica (SARTORI, 2005). Devido ao baixo custo, simplicidade e eficiência, o teste de toxicidade com *Artemia salina* Leach vem sendo cada vez mais reconhecido como uma alternativa para a busca de compostos candidatos a novas drogas (MEYER et al., 1982).

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antimicrobiana (MACRAE et al., 1988), parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), tripanossomicida (ZANI et al., 1995), entre outras. McLaughlin e colaboradores (MCLAUGHLIN et al., 1991a; 1991b; RUPPRECHT et al., 1990; COLMAN-SAZARBITORIA, et al., 1995) têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais. As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação.

As *Artemias* são pequenos crustáceos da ordem Anostraca, têm tamanho e coloração variadas que vão do rosa pálido ao avermelhado, branco ou esverdeado, dependendo do tipo de alimento que elas consumirem. Vivem em regiões de água salgada concentrada (Salinas), ambiente extremo no qual poucas espécies desenvolvem-se, de forma que há poucos predadores. Por serem ricas em proteínas, vitaminas (principalmente a vitamina A e o Caroteno) e sais minerais, é um dos melhores alimentos vivos que pode se fornecer aos peixes. Acelera a recuperação de doenças (artêmia em grego significa saúde) e seus náuplios são indispensáveis na alimentação de alevinos, cavalos-marinhos e corais, entre outras espécies que se alimentam quase que exclusivamente de náuplios de *Artemia* (ASEN, 2008).

A *Artemia salina* (Figura 5) está em constante estado de locomoção, pois são animais filtradores e dependem disso para alimentar-se e respirar. Possui 11 pares de pernas torácicas, que variam um pouco no tamanho. Cada perna possui 7 enditos ("galhinhos") com finíssimos cílios que atuam na filtragem e coleta de alimentos. Quando as pernas se movimentam para frente, formam as "caixas filtradoras", nas quais, por meio das cerdas, coletam micro algas, bactérias, diatomáceas, flagelados, além dos detritos orgânicos em suspensão no corpo aquático (ASEN, 2008).

De fácil dimorfismo sexual atinge a fase adulta por volta dos 20 dias de vida. A fêmea adulta possui uma bolsa incubadora no último segmento torácico e, ao contrário do macho, não apresenta apêndices abdominais. Durante a cópula, o macho utiliza as segundas antenas, semelhantes a bigodes, para fixar-se à fêmea. Pode reproduzir-se de duas maneiras distintas: viviparamente, na qual ocorre liberação direta de náuplios, ou oviparamente na qual os embriões se desenvolvem até a fase de gástrula e se encapsulam nesse estágio dentro de

uma casca interrompendo seu metabolismo, podendo permanecer como cisto durante longo período de tempo (ASEN, 2008).



Fonte: <http://www.flickr.com/photos/neongolden/3152940562/>

Figura 5. Fotografia de *Artemia salina*.

2.6 ECOTOXICOLOGIA

Toxicologia Ambiental e Ecotoxicologia são termos empregados para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados sobre os organismos vivos pelas substâncias químicas liberadas no ambiente. No ambiente natural, um grande número de xenobióticos potencialmente tóxicos estão presentes. Cada um deles pode estar em um nível em que, por si só, não consegue causar malefícios, mas a sua interação com outras substâncias pode acarretar um dano (AZEVEDO e CHASIN, 2004).

Ecotoxicologia pode ser entendida como a junção de ecologia e toxicologia onde a ecologia é o estudo da interação dos seres vivos entre si e com o meio ambiente em que vivem, e a toxicologia é uma ciência que procura entender os tipos de efeitos causados por substâncias químicas, bioquímicas e os processos biológicos responsáveis por tais efeitos, levando em conta a sensibilidade de diferentes tipos de organismos à exposição de substâncias

químicas e as relativas toxicidades de diferentes substâncias. O objetivo da ecotoxicologia seria então entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais (CHAPMAN, 2006).

O crescimento das cidades nas últimas décadas tem sido responsável pelo aumento da pressão das atividades antrópicas sobre os recursos naturais. Em todo o planeta, praticamente não existe um ecossistema que não tenha sofrido influência direta e/ou indireta do homem, como por exemplo, contaminação dos ambientes aquáticos, desmatamentos, contaminação de lençol freático e introdução de espécies exóticas, resultando na diminuição da diversidade de habitats e perda da biodiversidade. O que se observa é uma forte pressão do sistema produtivo sobre os recursos naturais, através da obtenção de matéria-prima, utilizada na produção de bens que são utilizados no crescimento econômico. O desenvolvimento gerado retorna capital para o sistema produtivo que devolve rejeitos e efluentes, além da degradação (muitas vezes irreversível) ao meio ambiente e poluição (GOULART e CALLISTO, 2003). A indústria de óleos essenciais, por exemplo, geralmente descarta seus resíduos líquidos diretamente nos rios, como o hidrolato, que pode conter substâncias ativas tornando-se tóxicas ao meio ambiente.

Já há alguns anos, a ecotoxicologia tem sido usada também como parâmetro legal de regulamentação de qualidade de água, de efluentes e de sedimento. A Resolução Conama nº 344/04 instituiu testes ecotoxicológicos para casos de disposição de sedimento a ser dragado quando a concentração de algumas substâncias pode oferecer risco (BRASIL, 2004). Já a Resolução Conama nº 357/05 instituiu o uso de testes ecotoxicológicos tanto como parâmetro de qualidade das águas como de efluentes (BRASIL, 2005).

A Resolução Conama nº 357/05 estabelece que as possíveis interações entre substâncias e a presença de contaminantes não listados na mencionada resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos. São importantes ferramentas nos estudos ambientais, devido às limitações existentes nos estudos baseados em evidências puramente químicas, das quais se destacam: a elevada variedade de substâncias presentes em efluentes líquidos; baixa capacidade de detecção analítica; as interferências pelos fenômenos químicos de antagonismo e sinergismo que dificultam, sobretudo, no processo de interpretação de resultados.

Através dos testes de toxicidade, determinam-se o tempo e as concentrações em que o agente químico é potencialmente prejudicial, pois para qualquer produto o contato com a membrana ou sistema biológico pode não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa, ou o tempo de contato for insuficiente. Concentração e tempo de exposição estão diretamente relacionados e, portanto, altas concentrações poderão ter efeitos prejudiciais em tempos de exposição extremamente curtos (FONSECA, 1991; CESAR et al., 1997). Um dos métodos de análise de toxidades é a utilização de bioindicadores como forma de estudo ecotoxicológico.

2.6.1 Bioindicadores

Bioindicadores são fatores bióticos empregados para o reconhecimento de condições (passadas, presentes ou futuras) de ecossistemas. As espécies estão adaptadas para sobreviver, se reproduzir e realizar relações ecológicas em condições ambientais específicas. A presença de cada tipo de ser vivo indica características físicas, químicas e estruturais do ambiente em que se encontra. De maneira geral, as características dos melhores bioindicadores são limites de tolerância estreitos (sensíveis a pequenas mudanças ambientais), abundância, identificação fácil e rápida, que sejam bem conhecidos (biologia e ecologia) e tenham pouca mobilidade (ZAMONER, 2011).

A avaliação do risco exige identificação de perigos e as estimativas das prováveis exposições a um perigo. Todas as avaliações de risco ecológico devem ser assumidas para cada comunidade ou ecossistema. Há uma série de condições associadas ao funcionamento normal, sustentável (análoga à homeostase em um organismo individual) e há um risco quantificável, em que a comunidade ou ecossistema se desviará da normalidade quando os produtos químicos poluentes são adicionados. Com relação ao componente de previsão, isto requer o conhecimento de como as populações que compõem o ecossistema irão responder a uma carga de determinado poluente (HYNE e MAHER, 2000).

Os organismos bioindicadores, apesar de não morrerem por alterações do ambiente, respondem a elas por meio de reações comportamentais ou metabólicas mensuráveis, que indicam e refletem alguma mudança no ambiente onde eles vivem. Um indicador é definido como um índice ou uma medida final para avaliar a saúde de um sistema, seja ele econômico, físico ou biológico. O bioindicador é como a biota ou o componente biótico de um

ecossistema, que é utilizado como indicador da qualidade do ambiente e aponta a probabilidade de um agente estressor (contaminante, alterações das condições físicas, etc.) de causar efeito adverso no ambiente e nas populações. São também utilizados para caracterizar a saúde do ambiente; indicar o grau de perigo e dar suporte às determinações dos possíveis riscos ecológicos de mudanças na saúde do ambiente (ANDRÉA, 2008).

A vantagem do uso de bioindicadores sobre os métodos convencionais de avaliação da qualidade ambiental está em seu baixo custo, podendo, inclusive, serem utilizados para a avaliação cumulativa de eventos ocorridos num determinado período de tempo, resgatando um histórico ambiental não passível de detecção ou medição por outros métodos (CETESB, 2011).

Os parâmetros avaliados mais utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental em peixes são os parâmetros químicos, genotóxicos, hematológicos, bioquímicos, histopatológicos, imunológicos, reprodutivos e endócrinos (JESUS e CARVALHO, 2008).

2.6.2 Parâmetros Genotóxicos

Alguns tipos de xenobióticos podem atuar no ciclo redox, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) (STOHS e BAGCHI, 1995). Essas espécies, EROs, e o estresse oxidativo gerado por estas, induzem a peroxidação de lipídios, danos ao DNA, e alteram a homeostasia de diversos minerais essenciais. Adicionalmente, o estresse oxidativo afeta diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas envolvidas no reparo do DNA, conhecidos como efeitos genotóxicos (PRÁ et al., 2006).

O emprego de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos, como forma de avaliação da qualidade hídrica, permite avaliar os efeitos dos poluentes no meio hídrico, bem como alterações de seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o meio ambiente (JESUS e CARVALHO, 2008).

Para identificar esses efeitos, dois ensaios podem ser feitos, ao nível celular, atuando como bioindicadores: o ensaio cometa (SCGE, *Single-Cell Gel Electrophoresis*, eletroforese em gel de células individuais) e a avaliação de micronúcleos (ANE, Anormalidade Nuclear Eritrocítica (ANE)).

O ensaio cometa tem sido proposto para estudos de toxicologia devido às suas vantagens quando comparado a outros testes que detectam substâncias genotóxicas, sendo

uma ferramenta fundamental de investigação em estudos de reparo de DNA, biomonitoramento ambiental e teste de genotoxicidade (ROSS et al., 1995). O ensaio não é utilizado para verificar mutações, mas sim lesões genômicas que se não forem corrigidas, podem ser processadas levando às mutações (GONTIJO e TICE, 2003) o que caracteriza as lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001).

O ensaio cometa possui uma ampla utilização para avaliar agentes genotóxicos de efluentes industriais, domésticos e agrícolas quanto à indução de danos e reparo no DNA e biomonitoramento de populações (WHITE e RASMUSSEN, 1998). A principal vantagem do ensaio de cometa é sua alta sensibilidade a vários tipos de danos de DNA (BÜCKER et al., 2006), sendo considerado em alguns casos mais sensível à ação de agentes genotóxicos do que o teste de micronúcleo (MATSUMOTO et al., 2006; BÜCKER et al., 2006). Este ensaio pode ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada, necessitando de uma pequena quantidade de células sendo possível mensurar danos em células individuais (LEE e STEINERT, 2003).

Schimid (1975) desenvolveu o teste de micronúcleo, sendo recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar tanto agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), como aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000; RIBEIRO, 2003).

Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com o aspecto de pequenos núcleos, constituídos principalmente por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos retardados durante a migração anafásica (PORTO et al., 2005). São formados durante a divisão celular quando a membrana nuclear está sendo reconstituída ao redor dos cromossomos das células-filhas, e são decorrentes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Como se trata de material genético que foi separado do núcleo principal, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou numérico (cromossomo inteiro) ou ainda dano no aparelho mitótico. A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células e só apareceram após um ciclo de divisão celular (SALVADORI et al., 2003).

Segundo Fenech (2000), durante o teste de micronúcleos, outros tipos de anormalidades podem ser visualizados as quais se relacionam aos erros que ocorrem durante a mitose ou meiose, com os processos de morte celular (necrose e apoptose) além da própria

genotoxicidade e mutagenicidade. Entre as anormalidades o autor recomenda que sejam analisadas as células com brotos nucleares. Os brotos nucleares, assim como os “broken-eggs”, seriam o resultado do procedimento de expulsão do micronúcleo do núcleo principal da célula (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002). Outra análise reportada por Carrasco et al. (1990) considera alterações da morfologia do núcleo, chamadas de “blebbed”, “lobed” e “notched”, tendo como possível causa a ação mutagênica, embora o mecanismo de formação ainda não tenha sido esclarecido. Núcleos “blebbed” apresentam uma pequena invaginação da membrana e da cromatina, enquanto que os “lobed” apresentam uma invaginação maior da membrana e da cromatina, formando lobos e o núcleo “notched” apresenta profundas invaginações ou ainda lacunas que não contém cromatina.

2.6.3 Parâmetros Hematológicos

A hematologia é voltada principalmente para o estudo dos elementos formadores do sangue, os eritrócitos, os leucócitos, plaquetas, dentre outros. Os testes podem ser qualitativos, como observação e registro da morfologia da célula do sangue, ou quantitativos, como contagem de leucócitos, eritrócitos ou determinação do hematócrito. Os testes hematológicos fornecem informações importantes sobre o bem estar do indivíduo bioindicador. Vários testes são comumente executados para o monitoramento da saúde do indivíduo tais como: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem diferencial de leucócitos, dentre outros (ESTRIDGE e REYNOLDS, 2011).

O hematócrito fornece ao analista uma estimativa do volume de células vermelhas do indivíduo e, assim, da capacidade do transporte de oxigênio do sangue. O método comumente usado para determinação de hematócrito é denominado muitas vezes de micro-hematócrito, porque necessita de pequena quantidade de sangue. É um procedimento simples no qual o sangue total é centrifugado em tubos capilares delgados (Figura 6) (BAKER et al., 2001).

A medida da hemoglobina do sangue é um dos testes clínico-laboratoriais mais comuns que existem. É usado de forma indireta, para avaliar a capacidade do sangue de transportar oxigênio (KAMPEN e ZIJLSTRA, 1964). É uma importante informação na detecção e na avaliação das perdas sanguíneas e no diagnóstico e tratamento da anemia. A concentração de hemoglobina pode ter seus valores afetados na presença de algum xenobiótico dependendo da concentração e tempo de exposição. A dieta deve ter quantidades

adequadas de ferro para que as células vermelhas sintetizem hemoglobina (ESTRIDGE e REYNOLDS, 2011). Se o xenobiótico interfere na biodisponibilidade de ferro, haverá uma diminuição na taxa de hemoglobina e uma consequente anemia pode se desenvolver. A determinação da hemoglobina pode ser realizada usando tanto sangue capilar como venoso, e para tal, é comumente utilizado o método da cianometahemoglobina. Nesse método, o sangue reage com o reagente de Drabkin, que contém ferro, potássio, cianeto e bicarbonato de sódio. O reagente de Drabkin e a hemoglobina combinam-se para formar um produto final, colorido e muito estável, cianometahemoglobina, também chamado hemiglobincianeto (HiCN). Esse produto é medido espectrofotometricamente (KAMPEN e ZIJLSTRA, 1964).

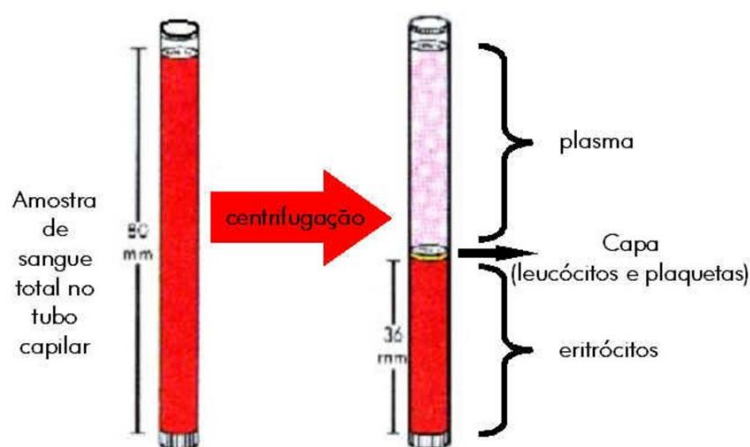


Figura 6. Tubo capilar com amostras sanguíneas antes e após centrifugação - Micro-hematócrito.

As células vermelhas são as mais numerosas no sangue, e sua contagem (RBC) fornece então, uma estimativa indireta da capacidade de transporte de oxigênio no sangue. As células brancas são menos numerosas do que as vermelhas e desempenham papéis importantes na imunidade, capacidade do organismo de resistir a doenças. A contagem de células brancas (WBC) dá informação sobre a capacidade de determinado organismo de lutar contra uma infecção (ESTRIDGE e REYNOLDS, 2011).

Os índices hematimétricos ou eritrocitários são cálculos que estimam o Volume Corpuscular Médio (VCM), a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Esses cálculos são realizados a partir da contagem dos eritrócitos e dos valores de hemoglobina para definir o tamanho celular e a concentração da hemoglobina dentro da célula. Ainda que algumas informações sobre o tamanho e o conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos possam ser obtidas a partir do exame

microscópico do esfregaço corado, os índices hematimétricos fornecem uma medida quantitativa do volume e da concentração de hemoglobina dos eritrócitos, que pode ser comparada com os valores de referências normais ou um grupo controle. A CHCM expressa a concentração de hemoglobina nos eritrócitos em relação ao seu tamanho e volume. Seus valores abaixo do normal indicam hipocromia (ESTRIDGE e REYNOLDS, 2011).

2.6.4 *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Os peixes são considerados excelentes ferramentas no monitoramento de ambientes aquáticos impactados, servindo como importantes bioindicadores de contaminação. Estes estão no topo da cadeia trófica dos sistemas aquáticos e respondem de várias maneiras à contaminação. Os biomarcadores podem ser usados para diagnosticar a saúde dos organismos e para obter respostas iniciais de advertência a riscos ambientais (BRANDÃO et al., 2009). Um dos peixes usados como bioindicadores, avaliando-se os parâmetros bioquímicos e toxicológicos é o *Colossoma macropomum* (tambaqui).

O tambaqui é uma das espécies de peixes mais importantes da ictiofauna amazônica (Figura 7). Vivendo em lagos e áreas marginais alagadas associadas às calhas dos rios principais, é considerado o segundo maior peixe de escamas da bacia amazônica (GOULDING e CARVALHO, 1982; VEINTEMILLA, 2006).

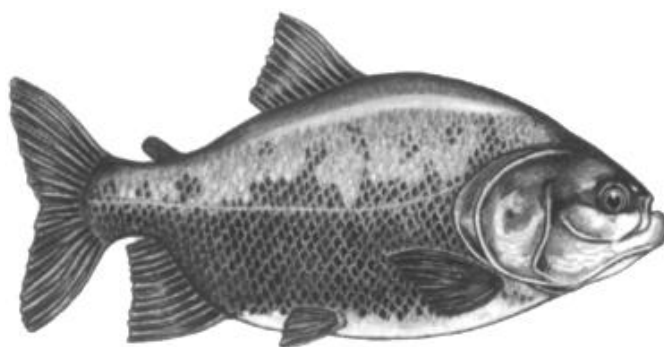


Figura 7. *Colossoma macropomum* (tambaqui).

Na sua forma anatômica é um peixe de escamas com corpo romboidal e possui nadadeira adiposa curta com raios na extremidade. Seus dentes são de forma molariformes e seus rastros branquiais são longos e numerosos. A coloração geralmente é parda na metade

superior e preta na metade inferior do corpo, mas pode variar para mais clara ou mais escura dependendo da cor da água. Os tambaquis em seu estágio alevino são cinza-claros com manchas escuras espalhadas na metade superior do corpo. Seu tamanho alcança cerca de 90 cm de comprimento total, onde antigamente era possível serem capturados exemplares com até 45 kg. Hoje, devido à causa da sobrepesca, praticamente não existem indivíduos desse porte, onde são encontrados no máximo com 30 kg (VEINTEMILLA, 2006).

Dessa forma, o uso do tambaqui como bioindicador surge como estratégia metodológica para avaliar o efeito tóxico do resíduo líquido da indústria de óleos essenciais, o hidrolato. Esse resíduo, que contém traços do óleo essencial, vem sendo descartado indiscriminadamente em rios e cursos d'água, e pode acarretar um dano ao ambiente aquático.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar atividades biológicas do óleo essencial, hidrolato e extratos de *Aniba canelilla* e potencial tóxico do hidrolato visando a formulação de um fitocosmético.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar no óleo essencial e em extratos obtidos com solventes orgânicos de diferentes polaridades a existência de atividade antioxidante e antimicrobiana;

2. Investigar atividade antioxidante e antimicrobiana em extratos obtidos de folhas e galhos de *A. canelilla* após a extração de óleos essenciais, bem como no hidrolato, visando o aproveitamento de resíduos da indústria de óleos essenciais na indústria biotecnológica.

3. Avaliar a citotoxicidade do hidrolato de *A. canelilla* frente às larvas de *Artemia salina*;

4. Avaliar a genotoxicidade do hidrolato de *A. canelilla* em *Colossoma macropomum*;

5. Avaliar os parâmetros hematológicos do *C. macropomum* exposto ao hidrolato de *A. canelilla*;

6. Avaliar a estabilidade preliminar de um fitocosmético contendo óleo essencial, hidrolato e extrato glicólico de *A. canelilla*.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 COLETA DE MATERIAL VEGETAL

Folhas e galhos foram coletados da base da copa de onze árvores de *Aniba canelilla*. O material vegetal de dez árvores foi utilizado para extração de óleo essencial e obtenção do resíduo líquido (hidrolato) e resíduo sólido. O material vegetal de uma árvore, devidamente identificada, foi utilizado para obtenção de extratos etanólicos. A coleta foi realizada no período chuvoso (abril de 2011) na Reserva Florestal Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, localizada no Km 26 da Rodovia AM-010 (Figura 8), Manaus – Itacoatiara, no município de Manaus, Amazonas, no período matutino. Após a coleta, o material vegetal foi enviado ao laboratório de Engenharia Química da Universidade do Estado do Amazonas – UEA para secagem.

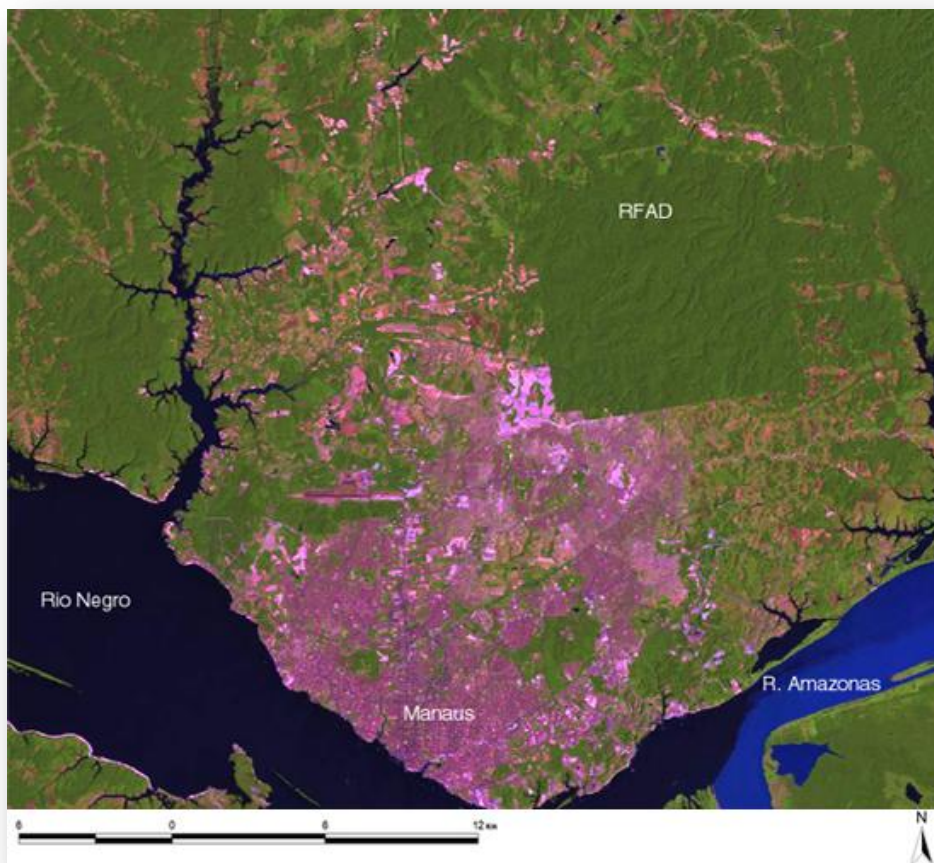


Figura 8. Imagem da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD).

4.2 SECAGEM E TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi seco em temperatura ambiente por 10 dias e após este período foi moído em moinho elétrico de facas com tela de 3 mm, constituindo o material utilizado nas etapas seguintes, segundo o fluxograma apresentado na Figura 9.

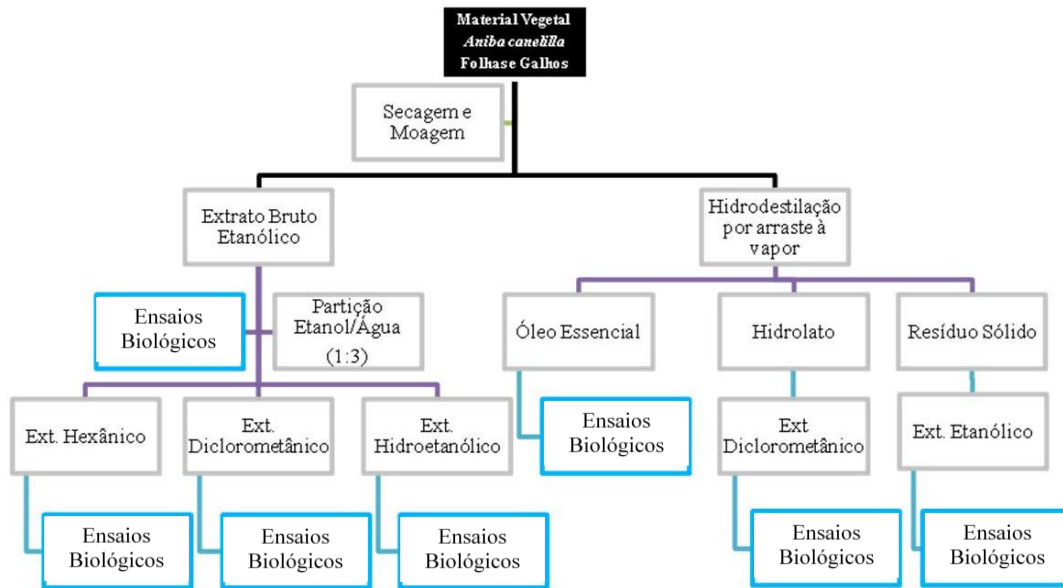


Figura 9. Fluxograma das etapas de extração, partição e ensaios biológicos de *A. canelilla*.

4.3 OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E HIDROLATO

O óleo essencial foi obtido por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger modificado (Figura 10), onde 100 gramas de material vegetal foram destilados com 1000 gramas de água destilada a temperatura de 100 °C durante três horas e 30 minutos para folhas e seis horas para galhos. Posteriormente os óleos foram separados do hidrolato por decantação e secos por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro (CHAAR, 2000). O rendimento dos óleos foi calculado a partir da massa do material seco e da massa do óleo extraído segundo a Equação 1.

$$R_{end.} = \left(\frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{planta}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Onde:

$m_{\text{óleo}}$ = Massa do óleo (g)

m_{planta} = Massa da planta seca (g)

$R_{\text{end.}}$ = Rendimento em porcentagem (%m/m)



Figura 10. Extração de óleo essencial de folhas e galhos de *A. canelilla* em aparelho tipo Clevenger.

Os óleos essenciais e o hidrolato resultante da hidrodestilação de galhos e folhas das dez árvores foram reunidos em frascos de vidro âmbar, um frasco contendo óleo essencial e outro hidrolato, e foram armazenados na geladeira para posteriores ensaios de atividade biológica. O resíduo sólido foi utilizado para obtenção de extratos etanólicos.

4.4 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE *A. canelilla*

As folhas e galhos secos e triturados foram macerados com álcool etílico de cereais 92,8° INPM à temperatura ambiente por 72 horas, filtrando-os em seguida e adicionando-se novo solvente deixando o material vegetal macerar por mais 72 horas seguido de nova filtragem e maceração totalizando um período de nove dias.

Os extratos obtidos foram filtrados e o solvente evaporado sob pressão reduzida a 45 °C. O rendimento foi determinado e retirado uma alíquota para ensaios biológicos. O extrato bruto resultante foi ressuspensionado em etanol-água (1:3) e submetido à partição líquido-líquido, utilizando primeiro o solvente orgânico *n*-hexano, segundo, diclorometano (Figura 11).

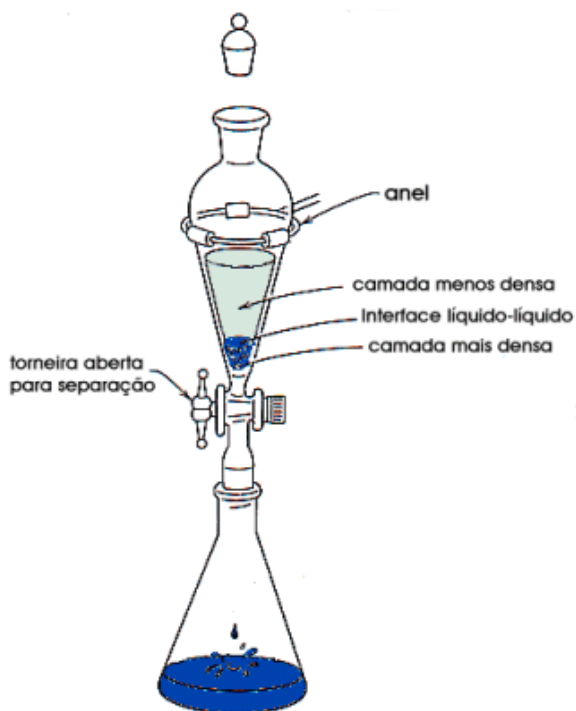


Figura 11. Esquema da partição líquido-líquido dos extratos.

Deste procedimento resultou uma fração solúvel em *n*-hexano e uma em diclorometano, que novamente foram levados ao evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40 °C para a retirada do solvente, restando ainda uma fração hidroalcoólica que foi liofilizada com o equipamento da marca Christ, modelo Alpha 1 – 2 LD plus (Figura 12). As condições utilizadas foram de pressão de 0,04 mbar, temperatura de – 45 °C, tempo de liofilização de 93 h e 10 min. Ao final do tempo a amostra se encontrava com coloração marrom claro, aspecto vítreo, quebradiça, indicando sua completa liofilização.

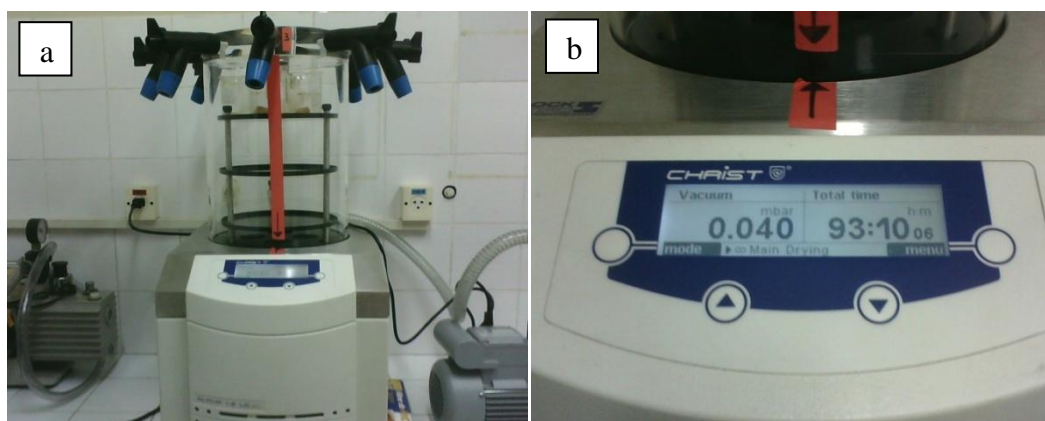


Figura 12. Aparelho liofilizador em (a) vista frontal e (b) vista do painel digital, indicando as condições de operação.

4.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

As soluções obtidas a partir dos extratos na concentração de 2 mg/mL foram ressuspensas em dimetil-sulfóxido (DMSO 1%) e dos óleos essenciais e hidrolatos em Tween 80 1%, as quais foram testadas em microrganismos que compõe o teste desafio (*Challenge Test*) proposto pela ANVISA, utilizando as cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 12.031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9.027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6.538). Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia na Escola Superior de Ciências da Saúde da UEA (Figura 13).

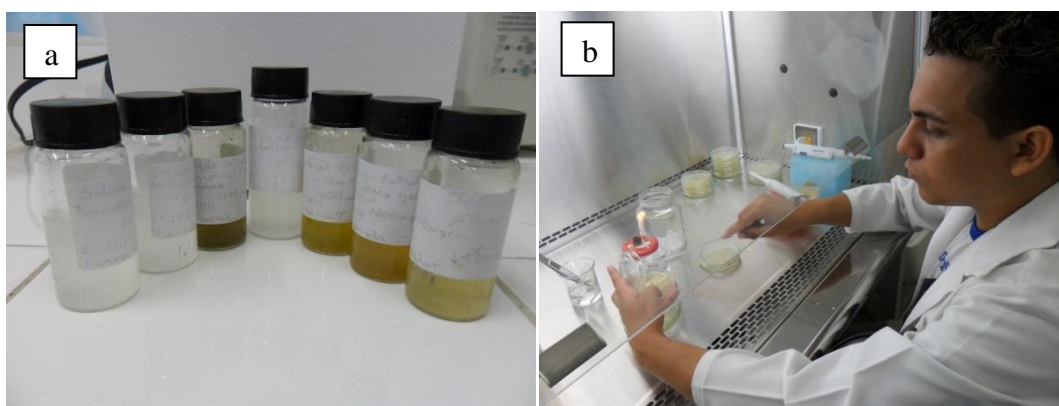


Figura 13. (a) Soluções testes preparadas em DMSO e água. (b) Inoculação de microrganismo em Câmara de Fluxo.

4.5.1 Ensaio Antimicrobiano

Outros fungos também foram utilizados, tais como os fitopatógenos isolados da melancia e do tomate, *Didymella bryoniae* e *Corynespora cassicola*, respectivamente. Estes ensaios foram realizados no laboratório Núcleo de Química do grupo de Química Aplicada à Tecnologia.

Os testes qualitativos de atividade antimicrobiana dos extratos brutos etanólicos e fases hexânicas e diclorometânicas foram realizados segundo a metodologia de cavidade-placa. Os microrganismos foram inoculados em câmara de fluxo através da técnica de *spread-plate*, em placas de Petri contendo o meio de cultura Saboraund para fungos e Müller-Hinton para bactérias, onde foram feitas cavidades circulares de 6 mm de diâmetro (BANHOS, 2011) (Figura 14). Em seguida, adicionam-se nas cavidades as soluções teste de *Aniba canelilla*,

utilizando como controle negativo de atividade antimicrobiana DMSO e Tween 80 e como controle positivo um antibiótico comercial de referência.

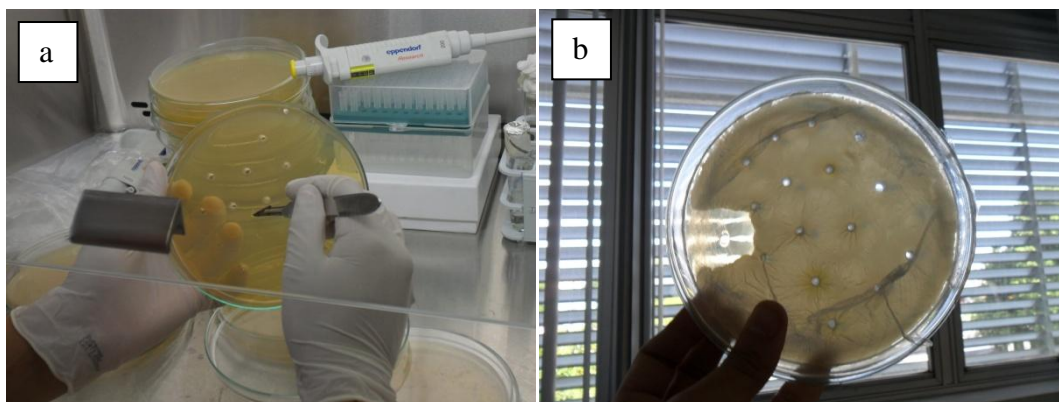


Figura 14. (a) Placa com meio de cultura Sabouraud sendo preparados os poços para inoculação das soluções teste. (b) Verificação da presença de halo de inibição em placa contendo *Pseudomonas aeruginosa*.

Após 24 horas de incubação a 30°C em estufa tipo BOD, procede-se a verificação da formação dos halos de inibição de crescimento e, em caso de atividade positiva, a verificação do diâmetro do halo com o auxílio de um paquímetro (Figura 15).

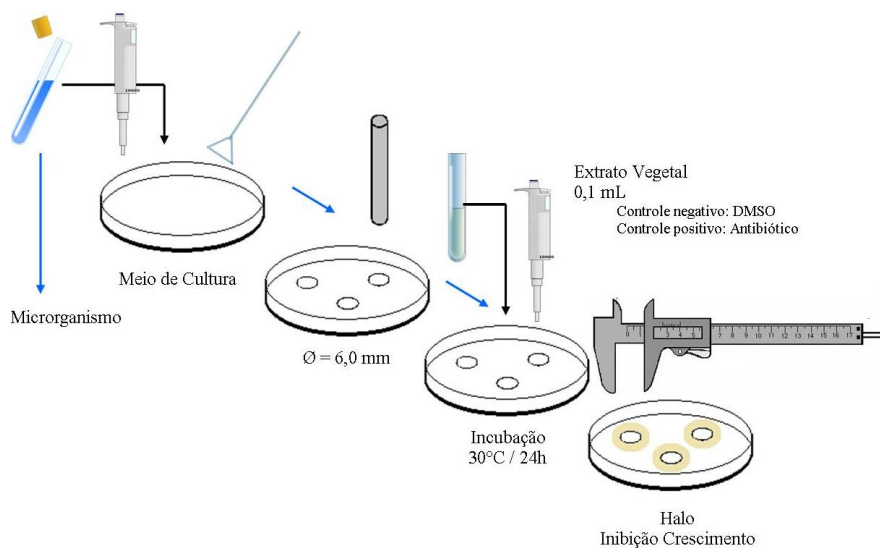
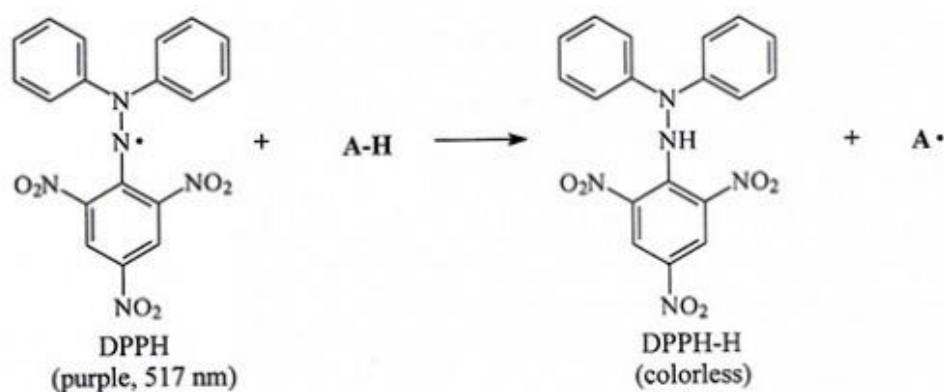


Figura 15. Ensaio de atividade antimicrobiana.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante. Um dos mais usados consiste em avaliar a capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-

hidrazila (DPPH \cdot), de coloração púrpura que possui absorção máxima em 517 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH \cdot é reduzido formando difenilpicril-hidrazina, de coloração amarela (Figura 16), com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH \cdot remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998; 2002).



Fonte: grupiv.wordpress.com

Figura 16. Estrutura do DPPH reduzindo-se na presença de um antioxidante.

A metodologia abaixo foi descrita por Brand-Williams et al. (1995) modificado por Sánchez-Moreno et al. (1998), Mensor et al. (2001), Silva et al. (2007), Rufino et al. (2007) e adaptado pelo autor para o desenvolvimento deste trabalho.

4.6.1 Preparo de Soluções Estoque

Para o preparo da solução estoque foram pesados 0,0128 g de extrato seco ou de óleo essencial e solubilizados em metanol P. A., avolumando-se para 10 mL em balão volumétrico. A partir da solução estoque foram feitas diluições sucessivas em progressão geométrica com razão igual a 0,5 utilizando como solvente metanol P. A., em microtubos eppendorf, até a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

Para o hidrolato foi retirada uma alíquota de 1000 μL , considerada como solução estoque e foram feitas diluições sucessivas conforme o procedimento descrito no item 4.7.1.

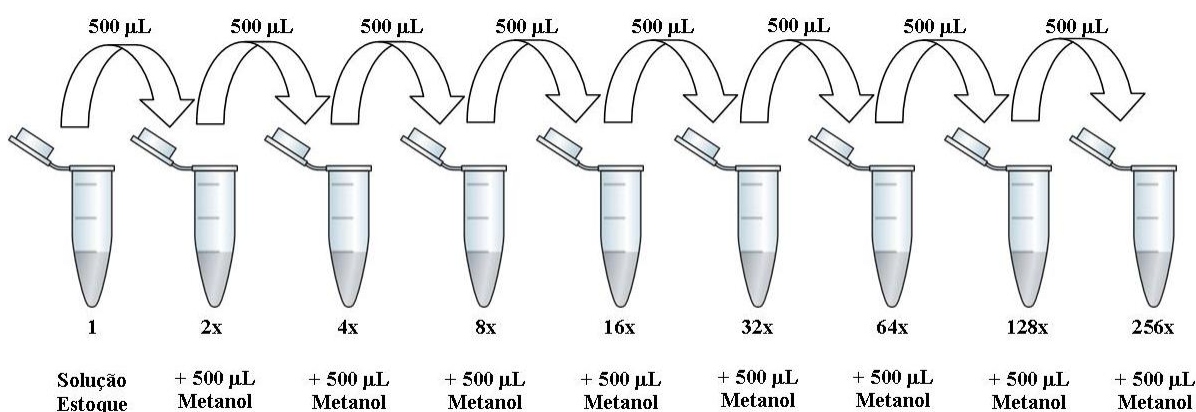


Figura 17. Esquema de diluições sucessivas.

4.6.2 Preparo das Soluções de Ácido Ascórbico e Quercetina

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

4.6.3 Preparo da Solução de DPPH•

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

4.6.4 Ensaio da Atividade Antioxidante

Foram transferidos 50 µL de cada concentração da amostra teste, 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. mais 50 μL da solução-teste contendo a mesma concentração de cada ensaio para a calibração do espectrofotômetro. Após 30 minutos de reação, verificou-se a absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm (Figura 18). Para os óleos essenciais e hidrolato de *A. canelilla* foi verificada a absorbância também após 60 e 90 minutos de reação.

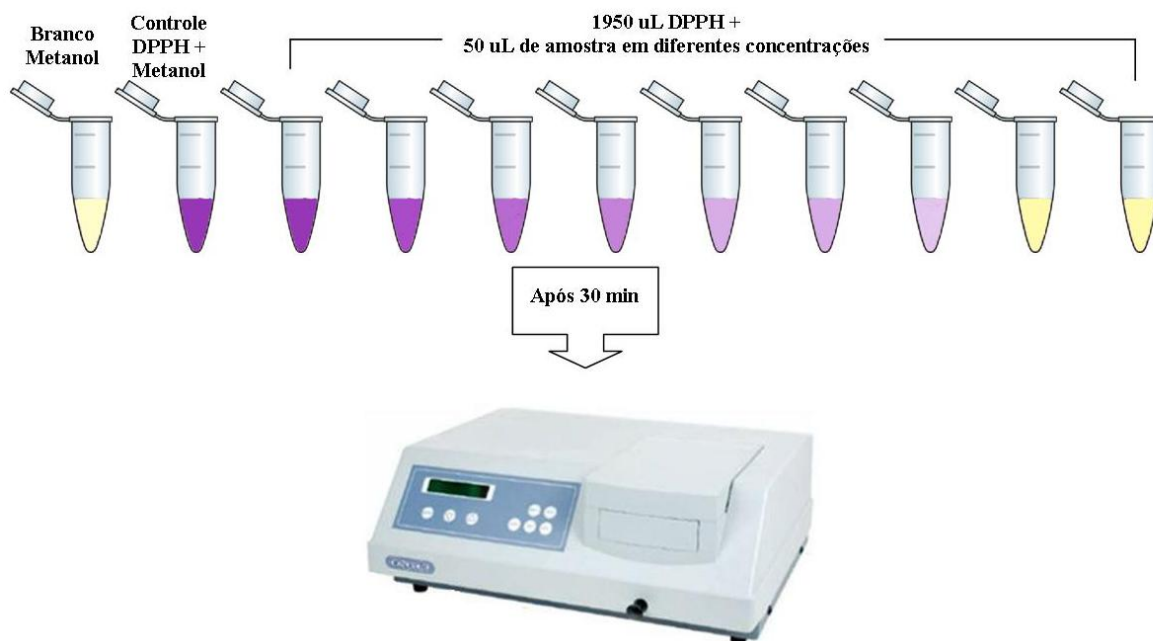


Figura 18. Esquema da metodologia para avaliação da atividade sequestrante do radical livre DPPH•.

4.6.5 Avaliação dos Resultados

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição de DPPH• conforme a Equação 2, e por meio de regressão linear foi determinado a Concentração Eficiente (CE_{50}), concentração de amostra necessária para o seqüestro de 50% dos radicais livres DPPH• (SILVA et al., 2007).

$$AA\% = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (2)$$

4.6.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão da média e aplicados o teste t de Student para comparação entre duas médias e teste ANOVA One Way para análise de variância em mais duas médias. Foram consideradas as diferenças com $p \leq 0,05$ como significativas.

4.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

A atividade citotóxica do hidrolato foi avaliada através de letalidade contra *Artemia salina* Leach, de acordo com o método proposto por Meyer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1991b).

4.7.1 Preparo das Soluções Teste

As soluções foram preparadas a partir do hidrolato oriundo da extração do óleo essencial obtendo-se as concentrações 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0% solubilizando-se em 1% de Tween 80. As soluções foram avolumadas com solução salina na mesma concentração do meio de cultivo.

4.7.2 Preparo do Meio de Cultivo

Foi utilizada, como meio de crescimento, uma solução salina contendo 38 g de sal marinho sintético em água destilada, preparando-se 1 L de solução (3,8%), e para a eclosão, adicionados 10 mg de cistos de *Artemia salina*. O crescimento ocorreu em temperatura ambiente, de 25 a 28°C, sob iluminação em lâmpada fluorescente durante 48 horas e aeração constante.

4.7.3 Exposição dos Náuplios de *A. salina*

Após as 48 h para eclosão, os náuplios foram transferidos para tubos de ensaio, sendo distribuídas 10 larvas de *Artemia salina* para cada tubo. Nos tubos foram adicionados 5 mL das soluções teste, em triplicata. No controle, a solução teste foi substituída pelo solvente utilizado para solubilizar o hidrolato. Para evitar a mortalidade no grupo controle, foi elaborado um sistema de aeração constante e os tubos de ensaio contendo as larvas de *Artemia salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente (Figura 19).



Figura 19. Sistema operacional para realização dos experimentos de citotoxicidade frente as larvas de *Artemia salina*.

4.7.4 Avaliação dos Resultados

Após o período de exposição, foi analisado o número de larvas sobreviventes, tanto nos tubos de controles quanto nos tratamentos. Foram feitas diluições sucessivas do hidrolato

seguindo uma progressão geométrica para a determinação da Concentração Letal que causa morte de 50% de uma população (CL_{50}), que foi obtida por meio de regressão linear.

4.8 ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE AO *Colossoma macropomum*

4.8.1 Obtenção dos Animais e Aclimação

Os exemplares de tambaqui foram adquiridos em fazendas de piscicultura da região (Figura 20) e transportados ao laboratório de Engenharia Química da EST/UEA. No laboratório, os animais receberam um tratamento profilático com NaCl e aclimatados, por no mínimo 20 dias, em tanques de 1000 litros, dotados de sistema de aeração permanente e filtro mecânico, onde foram alimentados com ração comercial durante todo o período pré-experimental. A alimentação dos animais foi suspensa 24 horas antes do início dos experimentos e durante os mesmos.



Figura 20. Fazenda de piscicultura Extra Beth localizada na AM-010 km 47.

4.8.2 Acompanhamento da Qualidade da Água

As medidas das características físico-químicas da água foram efetuadas diariamente durante a execução dos testes experimentais. Os valores de pH foram obtidos com auxílio de um pHmetro e as medidas de temperatura e de oxigênio dissolvido foram realizadas com o auxílio de um oxímetro.

4.8.3 Preparação da Solução-teste de *A. canelilla*

A solução teste foi preparada na concentração de 1% onde 40 mL do hidrolato foram previamente dissolvidos em 1 mL de DMSO completando-se o volume para 4 litros. O mesmo volume de DMSO 0,025% também foi adicionado à água de um grupo controle. Segundo Pacheco e Santos (1998) a concentração até 0,083% de DMSO não promove efeitos tóxicos.

4.8.4 Protocolo Experimental

Para obtenção do objetivo desta proposta, grupos de seis exemplares (n=6) foram transferidos para câmaras individuais com capacidade para 4 L, onde foram expostos a uma determinada concentração sub-letal da solução teste por 96 h. Os aquários foram dotados de sistemas estáticos, sem renovação da solução-teste, aeração constante e com o monitoramento da temperatura, pH e oxigênio dissolvido. O experimento consistiu em dois grupos controles, um não foi adicionado nenhuma substância química poluente e ao outro foi acrescentado DMSO a 0,025% (Figura 21).



Figura 21. Câmaras individuais de 4 L para exposição dos tambaquis ao hidrolato de *A. canelilla*. Tampa branca é o grupo Controle 1 (água do poço), tampa verde Controle 2 (água e DMSO 0,025%), tampa laranja Tratamento (hidrolato 1%).

Ao final das 96 horas de exposição os animais foram coletados, anestesiados com mentol e sacrificados para obtenção das amostras sanguíneas (Figura 22) para avaliar os parâmetros genotóxicos e hematológicos.

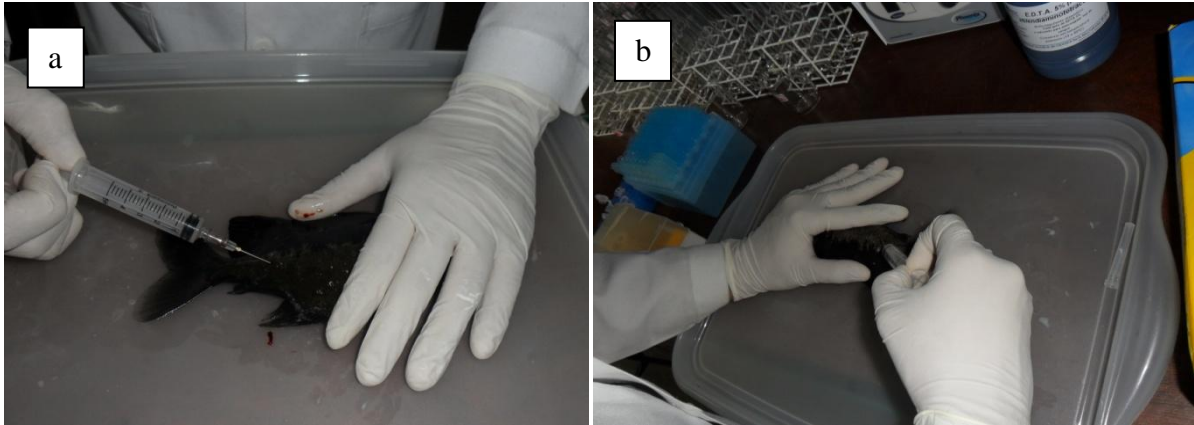


Figura 22. Retirada do sangue por punção da veia caudal. (a) vista frontal. (b) vista lateral.

4.8.5 Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE)

As anormalidades nucleares eritrocíticas foram determinadas de acordo com a metodologia revista e modificada por Pacheco e Santos (1998). Foram preparadas extensões sanguíneas em lâminas de vidro (Figura 23) e fixadas em metanol P.A. por 10 minutos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente.

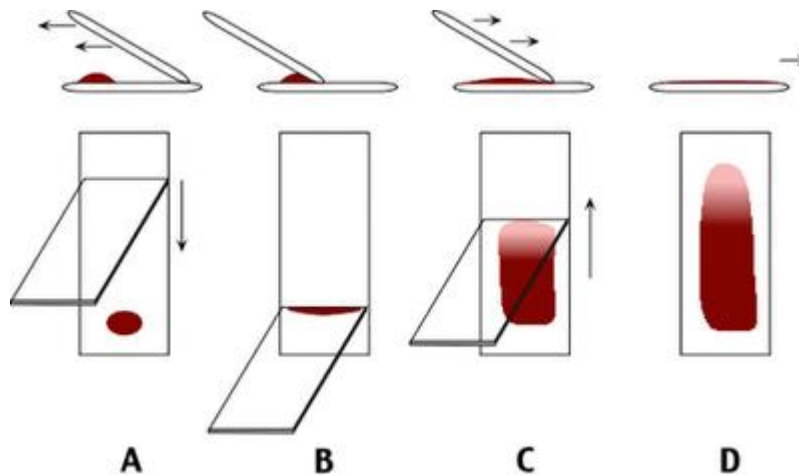


Figura 23. Preparação de extensões sanguíneas em lâminas de vidro.

As extensões foram coradas sucessivamente com (i) uma solução May-Grunwald por dois minutos; (ii) May Grunwald e água destilada (1:1) por 10 minutos; e (iii) Giemsa e água destilada (1:6) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e secas à temperatura ambiente.

A contagem das anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) foi realizada em cada lâmina até atingir 1000 células sanguíneas, com auxílio de um microscópio óptico com aumento resolutivo de 100x. Foi conferido o número de lesões nucleares, que são de quatro tipos (Figura 24): micronúcleo (MN), núcleo lobado (NL), núcleo segmentado (NS) e núcleo em forma de rim (NR). Entre o número de células observadas (1000), foram conferidos o número de ocorrências dessas anormalidades e os resultados expressos em porcentagem (%), considerando a soma de todas as lesões (MN+NL+NS+NR).

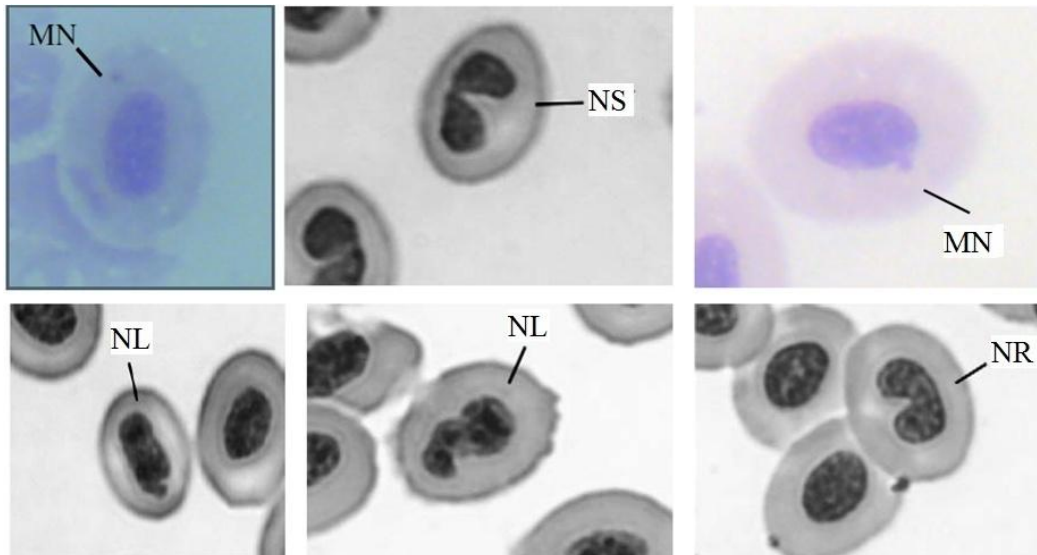


Figura 24. Células eritrocíticas com anormalidades nucleares. MN = Micronúcleo; NS = Núcleo Segmentado; NL = Núcleo Lobado; NR = Núcleo em Forma de Rim.

4.8.6 Hematócrito (Ht)

A amostra de sangue foi colocada em tubo de microhematócrito, que teve uma das extremidades vedada com massa para esta finalidade, sendo, em seguida, centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos (Figura 25). A leitura da porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi realizada com auxílio de cartão padronizado (ESTRIDGE e REYNOLDS, 2011).



Figura 25. Centrífuga de microhematócrito.

4.8.7 Concentração de Hemoglobina (Hb)

A concentração de hemoglobina foi determinada utilizando o método da cianomethohemoglobina (KAMPEN e ZILJSTRA, 1964), que consistiu em colocar 10 μL de sangue em um tubo de ensaio contendo 2 mL de solução Drabkin (KCN 0,5g; KH_2PO_4 1,4g; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 2,0 g em 1 L de água destilada). Após agitação, os tubos permaneceram por 20 minutos em repouso para efetivação da hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de quartzo e a absorbância medida em um espectrofotômetro, em 540 nm. A determinação da concentração de hemoglobina (em gramas por 100 mL de sangue) foi obtida pela Equação 3:

$$[\text{Hb}] \text{ (mg/dL)} = \text{absorbância (540 nm)} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra} \quad (3)$$

Onde: 0,146 = fator de correção.

4.8.8 Concentração de Metahemoglobina (MtHb)

Para a determinação da metahemoglobina foram colocados 15 μL de sangue em um tubo de ensaio contendo 2,0 mL da solução de tampão fosfato 35 mM, pH 7,3, o qual foi agitado em vortex e, em seguida, a leitura foi feita em espectrofotômetro em 560 nm, 576 nm e 630 nm. Os resultados foram calculados de acordo com as Equações 4, 5 e 6, e apresentados em porcentagem (%).

$$\text{OxiHb} = [(\text{Abs.}576 \times 1,013) - (\text{Abs.} 630 \times 0,3269) - (\text{Abs.} 560 \times 0,7353)] \times 10^{-4} \quad (4)$$

$$\text{DeoxyHb} = [(\text{Abs.} 560 \times 1,373) - (\text{Abs.} 576 \times 0,747) - (\text{Abs.}630 \times 0,737)] \times 10^{-4} \quad (5)$$

$$\text{FerriHb} = [\text{Abs.} 630 \times 2,985) - (\text{Abs.} 576 \times 0,194) + (\text{Abs.} 560 \times 0,4023)] \times 10^{-4} \quad (6)$$

4.8.9 Contagem de Eritrócitos (RBC)

A contagem dos eritrócitos foi realizada pelo método usual colocando em um tubo de ensaio uma amostra de 10 μL de sangue diluída em 2 mL de formol citrato (3,8 g de citrato de sódio; 2,0 mL formol e água destilada q.s.p. 100 mL). Após homogeneização, a contagem dos eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$) foi feita em câmara de Neubauer, com objetiva de 40x (Figura 26).

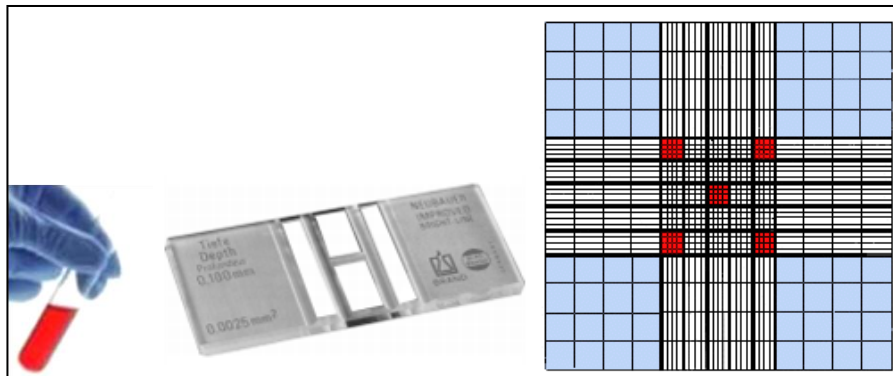


Figura 26. Área de contagem de eritrócitos (em vermelho) utilizando câmara de Neubauer.

4.8.10 Índices Hematimétricos

A partir dos resultados obtidos nas análises hematológicas, os valores foram calculados, de forma indireta segundo Wintrobe (1934), para a obtenção dos valores de Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e Hemoglobina Corpuscular (CHC), conforme as Equações 7, 8 e 9.

$$\text{Volume corpuscular médio (VCM; } \mu\text{m}^3) = \text{Ht} \times 10/\text{RBC} \quad (7)$$

$$\text{Hemoglobina corpuscular média (HCM; } \mu\text{g)} = [\text{Hb}] \times 10/\text{RBC} \quad (8)$$

$$\text{Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM; \%)} = [\text{Hb}] \times 100/\text{Ht} \quad (9)$$

4.8.11 Concentração de Glicose Sanguínea

Os níveis de glicose (mg/dL) foram mensurados por meio de análise eletroquímicas das amostras, em um medidor eletrônico Performa (Figura 27).



Figura 27. Aparelho medidor de glicose sanguínea (marca Performa).

4.8.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão da média (SEM) e submetidos a uma análise de variância (ANOVA, One Way). Havendo indicação de existência de diferença significativa em nível de 5%, foi aplicado o teste de Tukey para discriminação das diferenças.

4.9 FORMULAÇÃO COSMÉTICA

4.9.1 Preparo das Emulsões

As emulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases empregando óleo essencial de preciosa, hidrolato, extrato glicólico de preciosa (obtido a partir do extrato bruto etanólico), propilenoglicol, base emulsificante comercial, conservantes metilparabeno e propilparabeno, miristrato de isopropila e água desionizada. As fases aquosa e oleosa foram aquecidas a 75 °C, vertendo-se posteriormente a fase oleosa à fase aquosa. A mistura foi mantida sob agitação mecânica durante 25 min (Figura 28). Após este tempo, foram

adicionados os conservantes. Todas as formulações foram preparadas e avaliadas em duplicatas (LIMA et al., 2008; ISAAC et al., 2008).

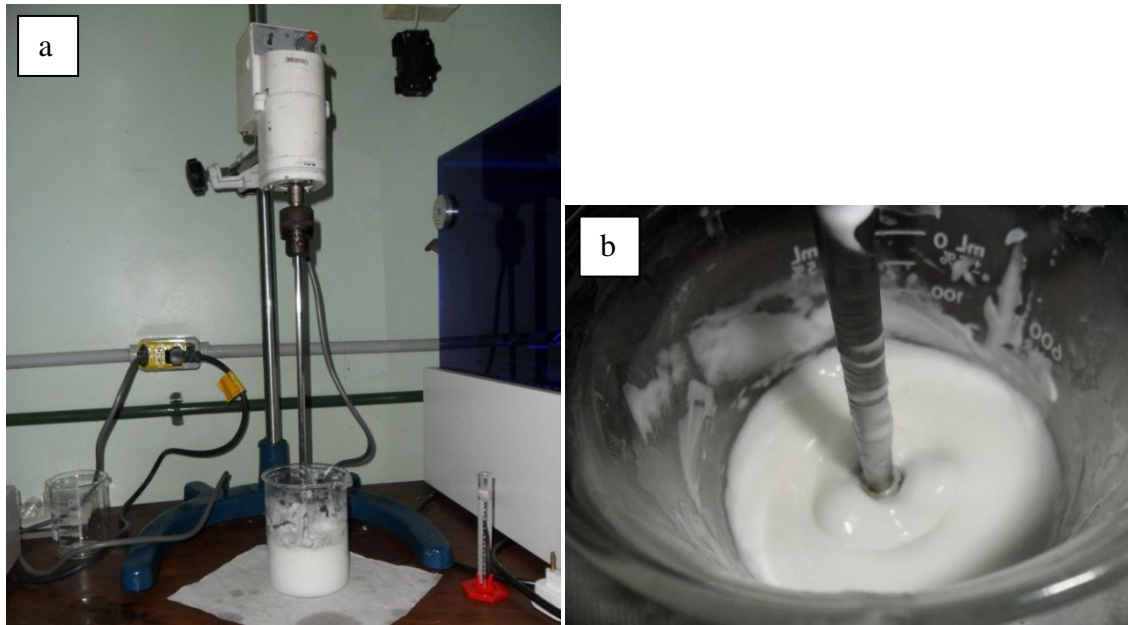


Figura 28. Preparação das emulsões cosméticas em misturador mecânico. (a) aparelho em funcionamento e (b) emulsão cosmética.

4.9.2 Análise Macroscópica das Formulações

Esta etapa foi realizada após 24 h do preparo das amostras e durante as avaliações. Foram observadas as características organolépticas e a homogeneidade das formulações, a fim de identificar algum processo de instabilidade, como cremeação, floculação e coalescência (FERRARI, 1998).

4.9.3 Teste de Estabilidade Preliminar

As emulsões classificadas macroscopicamente como estáveis, após 24 h de sua manipulação, foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade: centrifugação, estresse térmico, ciclo gela-degela e refrigeração (ISAAC et al., 2008; ANVISA, 2004).

4.9.3.1 Teste de Centrifugação

Em um tubo de ensaio cônico graduado foram adicionados 10,0g de cada amostra e submetidas aos ciclos de 1.000, 2.500 e 3.500 rpm (70, 440 e 863g, respectivamente) durante 15 min. em cada rotação à temperatura ambiente (IDSON, 1988; 1993a; 1993b; RIEGER, 1996; FERRARI, 1998).

4.9.3.2 Estresse Térmico

As emulsões foram submetidas ao aquecimento em banho termostático na faixa de temperatura de 40 a 80 °C. O ensaio foi realizado com aumento da temperatura de 5 ± 1 °C em 5 ± 1 °C, mantendo-se por 30 min. em cada temperatura. As leituras foram realizadas ao término do experimento a 80 °C, após o arrefecimento natural das amostras à temperatura ambiente (FERRARI, 1998; 2002). As amostras que permanecerem macroscopicamente estáveis foram avaliadas a partir dos seguintes parâmetros: análise macroscópica; determinação do valor do pH e densidade.

4.9.3.3 Ciclo Gela-Degela

As formulações permaneceram nas temperaturas padronizadas por um período de 12 dias. O 1º dia correspondeu as 24 h após o preparo das formulações. As amostras foram submetidas a 4 ± 2 °C/24 h em geladeira e 45 ± 2 °C/24 h em estufa, completando-se assim, 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, 1998; 2002).

4.9.3.4 Determinação do Valor do pH

Esse valor foi determinado inserindo o eletrodo diretamente na diluição aquosa 1:10 (p/p) das amostras homogeneizadas à temperatura de 25°C (DAVIS, 1977). As leituras foram realizadas em duplicata em cada lote.

4.9.3.5 Análise dos Resultados

Os resultados dos testes de estabilidade preliminar foram submetidos à análise de variância ANOVA para amostras homogêneas e, ao teste de Tukey, para a discriminação das diferenças, considerando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram avaliadas pelo programa BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos de *A. canelilla* foram expressos em percentual de inibição da oxidação frente ao radical DPPH· e por meio de regressão linear foram determinadas as concentrações eficientes (CE_{50}), sendo comparadas às do ácido ascórbico e da quercetina. Segundo Mensor (2001), o ácido ascórbico possui alta atividade antioxidante, e segundo Behling et al. (2004), o flavonóide quercetina sequestra radicais de oxigênio, inibe a xantina oxidase e a peroxidação lipídica. Sendo assim, estes dois compostos podem ser utilizados como antioxidantes de referência.

As Figuras 29 e 30 apresentam as curvas analíticas da atividade antioxidante para diferentes concentrações de ácido ascórbico e quercetina, respectivamente. A partir destas curvas foram determinados os valores de CE_{50} de 113,55 $\mu\text{g/mL}$ e 104,35 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido ascórbico e a quercetina, respectivamente. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção da CE_{50} das amostras de extratos de *A. canelilla*.

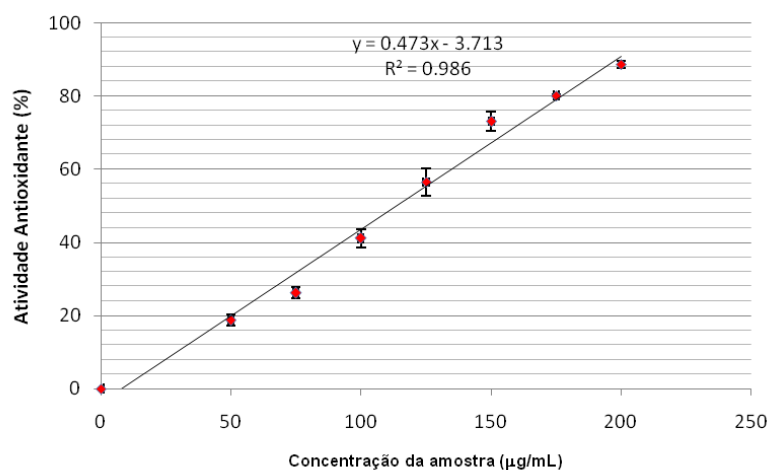


Figura 29. Curva analítica do ácido ascórbico utilizada para determinação da Concentração Eficiente (CE_{50}).

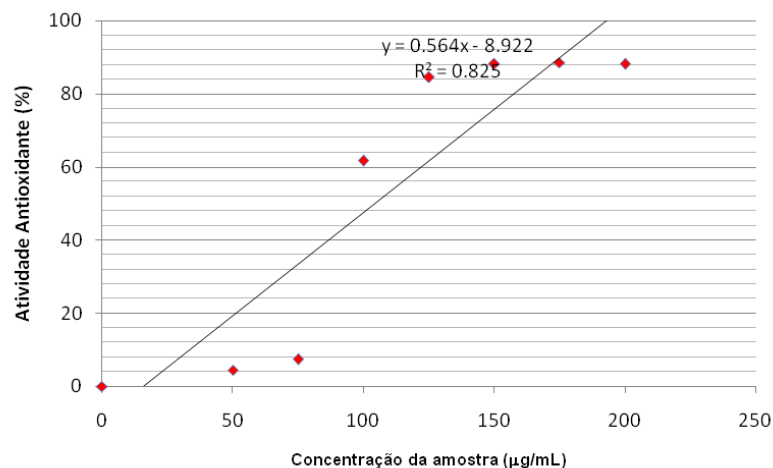


Figura 30. Curva analítica da quercetina utilizada para determinação da Concentração Eficiente (CE_{50}).

A partir dos resultados obtidos na análise dos extratos etanólicos brutos das folhas de *A. canelilla* (Figura 31), pode-se constatar que estes apresentaram uma alta atividade antioxidante, apenas, 2,92 vezes menos eficiente ($CE_{50} = 331,20 \mu\text{g/mL}$) que o padrão ácido ascórbico ($CE_{50} = 113,55 \mu\text{g/mL}$) e 3,18 vezes menos eficiente que a quercetina ($CE_{50} = 104,35 \mu\text{g/mL}$). Verifica-se ainda que a maior parte das substâncias responsáveis por tal atividade foi separada na fase hidroalcoólica ($CE_{50} = 338,20 \mu\text{g/mL}$), que possui o caráter mais polar dos extratos, sendo este resultado de concentração eficiente bem próximo aos antioxidantes padrão, ácido ascórbico e quercetina.

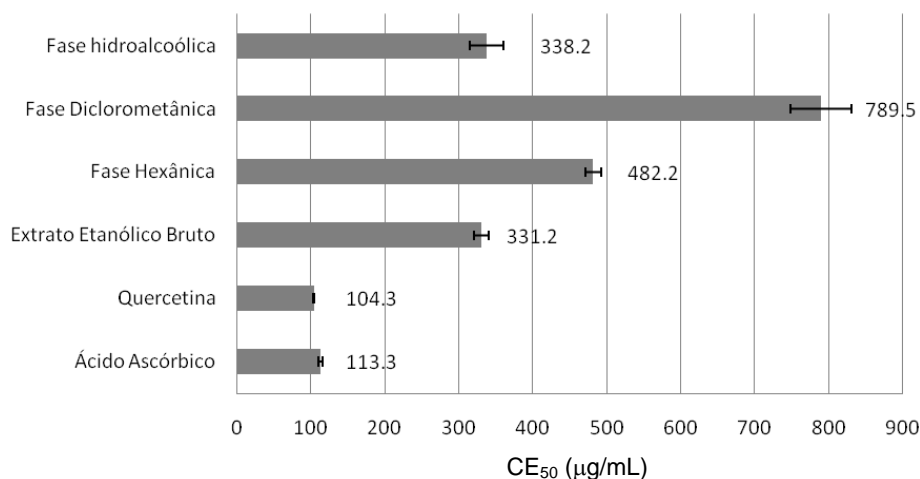


Figura 31. Concentração Eficiente (CE_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos das folhas de *A. canelilla* e dos antioxidantes padrão.

Tal resultado pode ser explicado pela maior solubilidade das substâncias antioxidantes em solvente polares, pois o ensaio utilizando o radical estável DPPH mede a capacidade das substâncias testadas em doar hidrogênio radicalar a este radical, e assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior seu potencial antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). O aumento do número de hidroxilas nas substâncias também aumenta sua polaridade, e conseqüentemente, essas substâncias podem ser extraídas nas fases mais polares da partição.

As substâncias responsáveis pela inibição da oxidação deste extrato, ao doar hidrogênios radicalares para a redução do DPPH, podem possuir a capacidade de deslocalizar o radical por sua estrutura, devido a alta estabilidade do novo radical formado, pois além da redução do DPPH ocorrer no primeiro minuto da reação (observado visualmente), após trinta minutos de reação, a absorbância permaneceu constante.

A fase obtida com diclorometano apresentou a menor atividade antioxidante, com CE_{50} de 789,50 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados corroboram a possibilidade de as moléculas responsáveis pela atividade possuírem várias hidroxilas, pois apesar de ser um solvente mais polar que o *n*-hexano, não pode interagir formando ligações de hidrogênio com outras substâncias, como a água ou o etanol, o que interfere no tipo de substância a ser extraída.

Nota-se também que a fase hexânica apresentou certa atividade antioxidante com CE_{50} de 482,20 $\mu\text{g/mL}$. Com isso, pode-se dizer que no extrato de *A. canelilla* encontram-se substâncias de natureza apolar com atividade antioxidante, mesmo em menor quantidade, pois a fase hexânica foi apenas 1,43 vezes menos eficiente que a fase hidroalcoólica.

Analisando os extratos dos galhos (Figura 32), observa-se que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante possuem o mesmo perfil químico que as das folhas, pois a fase hidroalcoólica apresentou a atividade mais acentuada com a menor CE_{50} (350,5 $\mu\text{g/mL}$), seguida do extrato bruto etanólico ($CE_{50} = 449,4 \mu\text{g/mL}$), o qual apresentou uma atividade 3,97 vezes menos eficiente que a do padrão ácido ascórbico ($CE_{50} = 113,3 \mu\text{g/mL}$), e 4,31 vezes menos eficiente que a quercetina ($CE_{50} = 104,35 \mu\text{g/mL}$).

A fase diclorometânica foi a que apresentou a menor atividade ($CE_{50} = 1078,3 \mu\text{g/mL}$), mesmo perfil observado nas folhas. Estes resultados indicam que as folhas de *A. canelilla* possuem componentes com atividade antioxidante mais pronunciada que os componentes encontrados nos galhos, ou ainda, que as substâncias responsáveis pela atividade são produzidas em maior quantidade nas folhas do que nos galhos. Observou-se também que,

a fase hidroalcoólica de folhas e galhos de *A. canelilla* apresentou valores bem próximos de CE_{50} , mostrando a eficiência do método de extração de tais substâncias tanto em folhas quanto em galhos de *A. canelilla*.

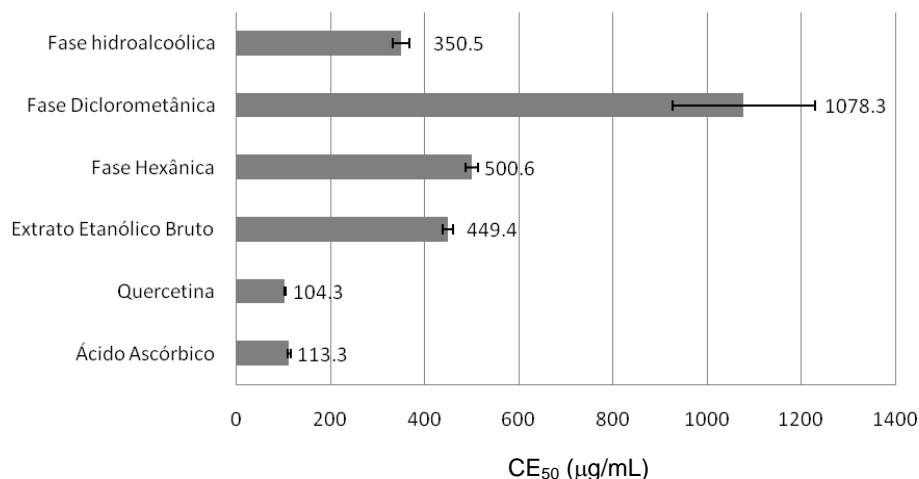


Figura 32. Concentração Eficiente (CE_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos dos galhos de *A. canelilla* e dos antioxidantes padrão.

Analisando os extratos brutos etanólicos do material vegetal obtido após a extração do óleo essencial (resíduo sólido), notou-se que houve uma diminuição significativa da atividade antioxidante (Figura 33).

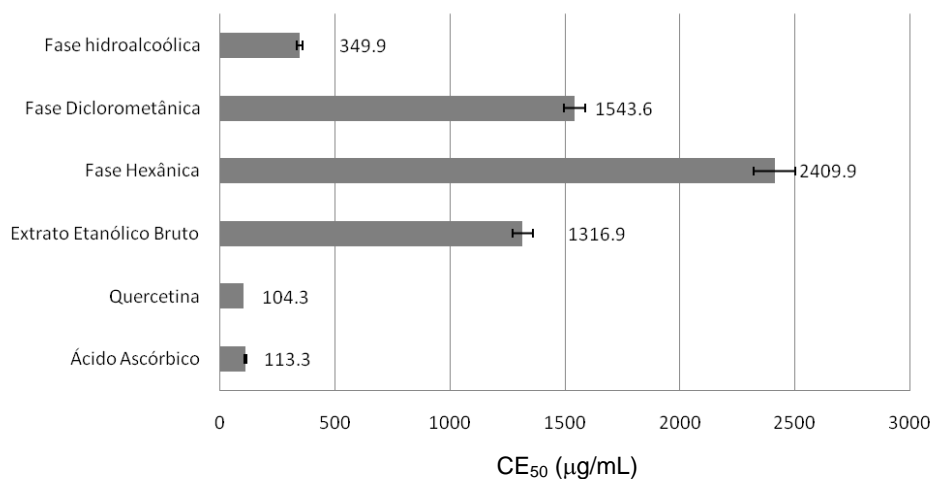


Figura 33. Concentração Eficiente (CE_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos do resíduo de folhas de *A. canelilla* e dos antioxidantes padrão.

No resíduo das folhas de *A. canelilla* (Figura 33), o extrato bruto etanólico apresentou uma atividade 11,62 vezes menos eficiente ($CE_{50} = 1316,9 \mu\text{g/mL}$) que a do padrão ácido ascórbico ($CE_{50} = 113,3 \mu\text{g/mL}$) e 12,62 vezes menos eficiente que o flavonóide quercetina. Comparando-se com a atividade observada para o extrato bruto antes da extração do óleo,

percebe-se que houve uma alteração significativa entre os extratos, pois o extrato etanólico bruto das folhas, antes da extração do óleo ($CE_{50} = 331,2 \mu\text{g/mL}$), mostrou-se aproximadamente quatro vezes mais eficiente que o extrato bruto etanólico obtido após a hidrodestilação ($CE_{50} = 1316,9 \mu\text{g/mL}$).

Observando as fases hidroalcoólicas antes (Figura 31) e depois (Figura 33) da extração do óleo essencial das folhas, nota-se que a atividade antioxidante nestas fases polares permaneceu inalterada, mostrando valores iguais estatisticamente com $p > 0,05$. Nota-se, contudo, que a extração do óleo essencial influenciou diretamente nas fases apolares, pois houve uma queda significativa ($p < 0,05$) na atividade antioxidante.

A partir desses resultados, pode-se inferir sobre a possibilidade de que existem moléculas detentoras de atividade antioxidante no óleo essencial de folhas e galhos de *A. canelilla*, uma vez que após sua extração, as fases menos polares (hexânica e diclorometânica) apresentaram redução significativa da atividade.

Ao analisar os extratos dos galhos de *A. canelilla* após a extração dos óleos essenciais (Figura 34), notou-se o mesmo comportamento quanto à diminuição da atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos antes da hidrodestilação.

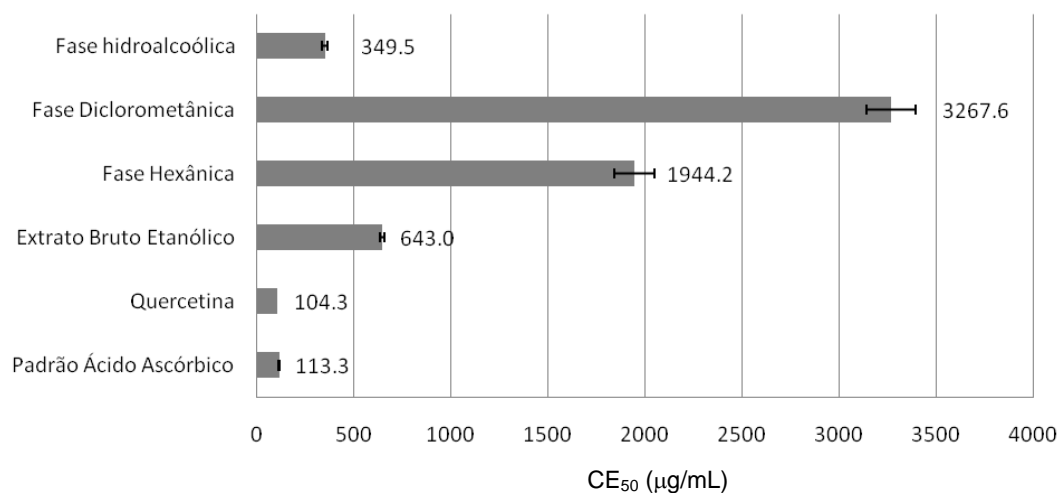


Figura 34. Concentração Eficiente (CE_{50}) em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos do resíduo de galhos de *A. canelilla* e dos antioxidantes padrão.

Antes da extração do óleo, o extrato etanólico bruto obtido a partir dos galhos apresentou uma CE_{50} de $449,4 \mu\text{g/mL}$, e após a hidrodestilação, o extrato bruto do resíduo de galhos apresentou CE_{50} de $643,0 \mu\text{g/mL}$, mostrando diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$. Verifica-se, portanto, que os extratos brutos dos galhos mostraram-se mais

eficientes que os do resíduo (1,4 vezes mais eficientes), resultados semelhantes aos observados em relação às folhas. A variável determinante desta observação é unicamente a extração ou não do óleo essencial, sendo que foi adotada e padronizada a mesma metodologia para a avaliação da atividade antioxidante de ambos os extratos.

Os resultados obtidos da porcentagem de inibição do radical DPPH, para o extrato bruto etanólico, estão listados na Tabela 3. Estes demonstram que o percentual de inibição (%Inib) é diretamente proporcional à concentração do extrato adicionado, atingindo um valor máximo em 1280 µg/mL com 92,65% de inibição para o extrato etanólico bruto das folhas (EBF); 92,07% de inibição para o extrato etanólico bruto dos galhos (EBG); 48,66% de inibição para extrato etanólico bruto do resíduo das folhas (EBRF) e 88,97% para o extrato etanólico bruto do resíduo dos galhos (EBRG).

Tabela 3. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração dos extratos etanólicos brutos de *A. canelilla*.

| Extrato [] µg/mL | % Inibição | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|
| | EBF | | | EBG | | | EBRF | | | EBRG | | |
| 0 | 0.00 | ± | 0.00 | 0.00 | ± | 0.00 | 0.00 | ± | 0.00 | 0.00 | ± | 0.00 |
| 4 | -1.16 | ± | 2.13 | 1.00 | ± | 0.34 | -0.32 | ± | 1.21 | 0.07 | ± | 1.20 |
| 8 | 1.11 | ± | 0.39 | 2.03 | ± | 0.95 | -0.64 | ± | 0.00 | -1.10 | ± | 1.24 |
| 16 | 3.11 | ± | 0.09 | 3.21 | ± | 0.62 | 2.25 | ± | 3.06 | -0.15 | ± | 0.33 |
| 32 | 6.14 | ± | 1.94 | 5.37 | ± | 0.51 | 1.93 | ± | 0.89 | 2.63 | ± | 0.21 |
| 64 | 10.79 | ± | 6.73 | 9.28 | ± | 0.88 | 3.11 | ± | 0.82 | 6.28 | ± | 0.23 |
| 128 | 27.24 | ± | 2.36 | 18.72 | ± | 0.25 | 8.20 | ± | 2.70 | 15.34 | ± | 1.26 |
| 320 | 52.01 | ± | 1.49 | 36.44 | ± | 0.72 | 12.81 | ± | 0.23 | 31.55 | ± | 0.77 |
| 640 | 92.23 | ± | 0.39 | 69.63 | ± | 1.84 | 24.65 | ± | 0.62 | 58.65 | ± | 1.75 |
| 1280 | 92.65 | ± | 0.40 | 92.07 | ± | 0.10 | 48.66 | ± | 1.84 | 88.97 | ± | 2.54 |

EBF = Extrato etanólico bruto das folhas; EBG = Extrato etanólico bruto dos galhos; EBRF = Extrato etanólico bruto dos resíduos de folhas; EBRG = Extrato etanólico bruto dos resíduos de galhos.

Os valores de atividade antioxidante para os extratos etanólicos brutos das folhas (EBF) obtiveram um maior coeficiente de regressão nas concentrações de 8 µg/mL a 640 µg/mL (Figura 35a). Os valores abaixo de 8 µg/mL ficaram abaixo do limite de detecção do método, e os valores acima de 640 µg/mL não apresentaram diferenças significativas entre o percentual de inibição do radical (Tabela 3). Os extratos brutos etanólicos dos galhos (EBG) apresentaram um bom coeficiente de regressão, sendo utilizadas todas as concentrações testadas (Figura 35b).

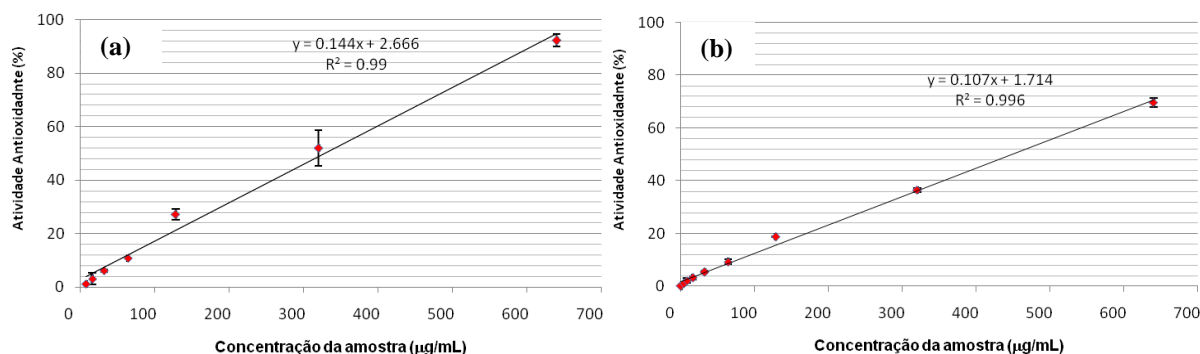


Figura 35. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração dos extratos etanólicos brutos de (a) folhas e (b) galhos de *A. canelilla*.

Analisando os extratos etanólicos brutos dos resíduos, nota-se que, com a diminuição da atividade antioxidante, as análises abaixo de 32 $\mu\text{g/mL}$ ficaram abaixo do limite de detecção do método, sendo necessária uma maior concentração dos extratos para a análise da atividade antioxidante. Os extratos brutos dos resíduos das folhas (Figura 36a) apresentaram uma atividade menor (estatisticamente significativa com $p > 0,05$) que os dos galhos a 1280 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 36b), podendo-se inferir que a hidrodestilação influenciou mais na atividade antioxidante das folhas que dos galhos de *A. canelilla*.

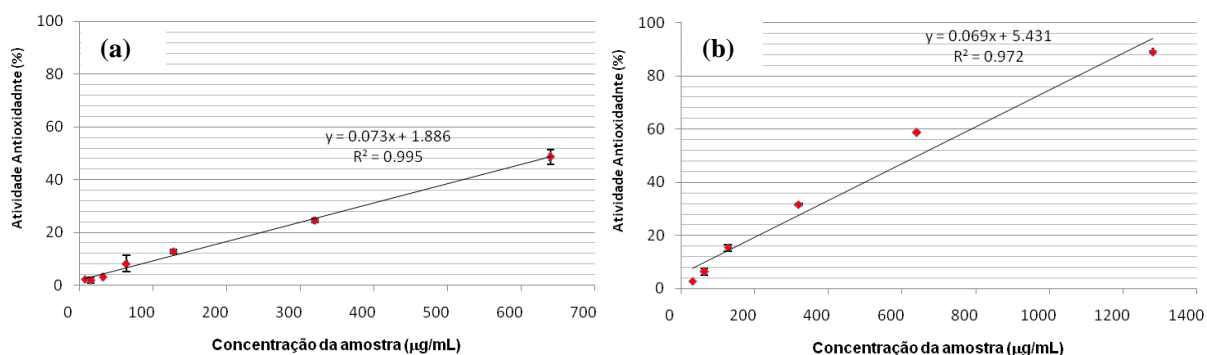


Figura 36. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração dos extratos etanólicos brutos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos de *A. canelilla*.

A Tabela 4 apresenta os resultados de atividade antioxidante para a fase hexânica de folhas e galhos de *A. canelilla*, e de folhas e galhos após a extração de óleo essencial.

Tabela 4. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração das fases hexânicas dos extratos de *A. canelilla*.

| Extrato [] µg/mL | % Inibição | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|-------|---|------|
| | FHF | | | FHG | | | FHRF | | | FHRG | | |
| 0 | 0.00 | ± | 0.00 | 0.00 | ± | 0.00 | 0.00 | ± | 0.00 | 0.00 | ± | 0.00 |
| 4 | -2.70 | ± | 1.42 | -0.52 | ± | 1.01 | 0.98 | ± | 3.24 | 0.11 | ± | 0.15 |
| 8 | 1.07 | ± | 1.26 | -0.47 | ± | 1.22 | 2.84 | ± | 4.78 | -1.74 | ± | 3.20 |
| 16 | 1.21 | ± | 2.12 | -3.10 | ± | 2.58 | -1.96 | ± | 1.29 | -1.59 | ± | 3.14 |
| 32 | 5.71 | ± | 3.05 | 3.34 | ± | 0.59 | -1.32 | ± | 1.56 | -0.27 | ± | 2.70 |
| 64 | 7.86 | ± | 1.31 | 8.32 | ± | 0.74 | -0.07 | ± | 1.70 | 0.89 | ± | 3.12 |
| 128 | 16.62 | ± | 0.86 | 17.38 | ± | 2.14 | 1.56 | ± | 1.44 | 3.50 | ± | 3.26 |
| 320 | 35.57 | ± | 1.89 | 32.13 | ± | 0.76 | 4.76 | ± | 1.48 | 8.60 | ± | 3.23 |
| 640 | 64.44 | ± | 0.86 | 63.20 | ± | 2.01 | 13.29 | ± | 1.94 | 18.16 | ± | 2.55 |
| 1280 | 89.83 | ± | 0.14 | 91.16 | ± | 0.15 | 25.62 | ± | 2.08 | 32.21 | ± | 3.01 |

FHF = Fase hexânica do extrato de folhas; FHG = Fase hexânica do extrato de galhos; FHRF = Fase hexânica do extrato do resíduo de folhas; FHRG = Fase hexânica do extrato do resíduo de galhos.

A fase hexânica das folhas apresentou um percentual de inibição a 1280 µg/mL de 89,8%. Contudo, os resultados de atividade antioxidante apresentaram maior correlação (Figura 37a) nas concentrações de 16 a 640 µg/mL. Resultados parecidos foram observados na fase hexânica dos galhos (Figura 37b), mostrando que as atividades em ambas as fases foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

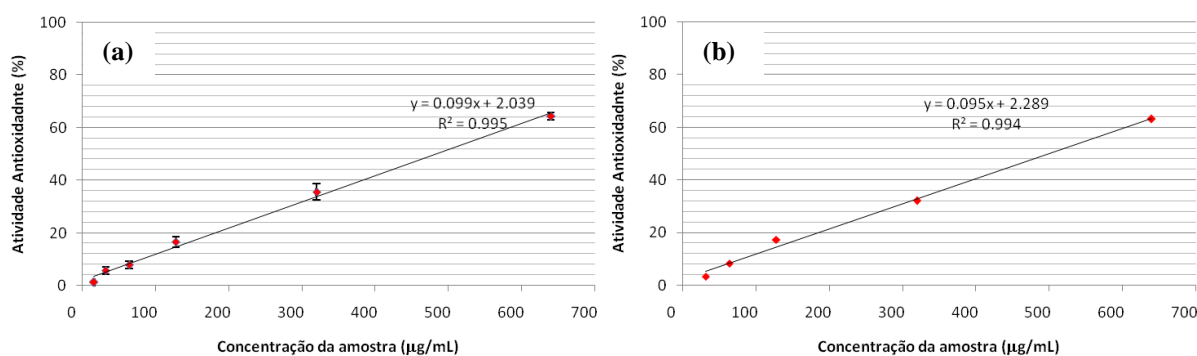


Figura 37. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hexânicas de (a) folhas e (b) galhos de *A. canelilla*.

A fase hexânica dos extratos dos resíduos das folhas (Figura 38a) apresentou um percentual de inibição bem inferior aos encontrados nas folhas antes da extração de óleo essencial, chegando a um percentual de inibição de apenas 25,62%. Analisando a fase hexânica dos extratos dos resíduos dos galhos (Figura 38b) percebeu-se o mesmo comportamento da fase hexânica dos resíduos das folhas, chegando a 32,21% de inibição. Comparando-se os resultados, percebe-se que não houve diferença significativa entre os extratos de folhas e galhos antes da extração de óleo essencial (Tabela 4). No entanto, houve

diferença significativa quando ao comparar os extratos antes e após a extração de óleo essencial, e entre folhas e galhos após a extração do óleo essencial. Considerando que os óleos essenciais têm características apolares, não se solubilizando em água, notou-se que a extração do óleo essencial influenciou diretamente na atividade antioxidante da fase hexânica dos extratos dos resíduos de folhas e galhos, pois houve uma diminuição significativa na atividade antioxidante desta fase, podendo-se inferir que as substâncias responsáveis por tal atividade podem ter sido extraídas juntamente com o óleo essencial.

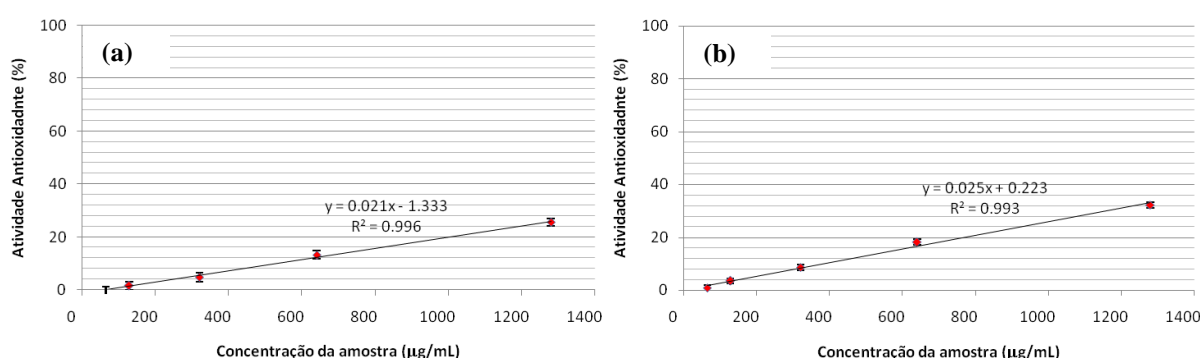


Figura 38. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hexânicas dos extratos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos de *A. canelilla*.

A Tabela 5 apresenta os resultados de atividade antioxidante para a fase diclorometânica de folhas e galhos de *A. canelilla*, e folhas e galhos após a extração de óleo essencial.

Tabela 5. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração das fases diclorometânicas dos extratos de *A. canelilla*.

| Extrato [] µg/mL | % Inibição | | | | | | | |
|----------------------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|--|
| | FDCMF | | FDCMG | | FDCMRF | | FDCMRG | |
| 0 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 ± 0.00 | |
| 4 | 0.42 ± 0.39 | | 0.15 ± 1.26 | | 2.36 ± 0.20 | | -0.62 ± 1.82 | |
| 8 | 0.28 ± 0.50 | | 1.29 ± 2.74 | | 3.32 ± 0.45 | | -0.46 ± 1.26 | |
| 16 | 1.12 ± 0.42 | | 0.64 ± 0.23 | | 3.78 ± 0.96 | | 0.54 ± 0.01 | |
| 32 | 2.86 ± 0.34 | | | | 4.52 ± 0.84 | | -0.01 ± 0.85 | |
| 64 | 6.18 ± 1.31 | | 2.08 ± 0.53 | | 6.25 ± 1.10 | | 0.76 ± 1.02 | |
| 128 | 14.02 ± 0.57 | | 5.79 ± 1.79 | | 9.09 ± 0.40 | | 2.32 ± 1.42 | |
| 320 | 24.43 ± 0.17 | | 20.29 ± 4.91 | | 14.77 ± 1.08 | | 5.29 ± 1.23 | |
| 640 | 44.07 ± 0.38 | | 31.39 ± 0.70 | | 23.95 ± 1.75 | | 11.01 ± 0.00 | |
| 1280 | 73.34 ± 0.55 | | 53.05 ± 0.01 | | 40.76 ± 0.76 | | 19.83 ± 0.80 | |

FDCMF = Fase diclorometânica dos extratos de folhas; FDCMG = Fase diclorometânica dos extratos dos galhos; FDCMRF = Fase diclorometânica dos extratos dos resíduos de folhas; FDCMRG = Fase diclorometânica dos extratos dos resíduos de galhos.

A fase diclorometânica de folhas apresentou um percentual de inibição relativamente alto, chegando a 73,34% em 1280 $\mu\text{g/mL}$, porém em concentrações abaixo de 16 $\mu\text{g/mL}$, apresentou valores que não foram detectados pelo método. A melhor correlação encontrada foi de 64 a 1280 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 39a). A fase diclorometânica de galhos mostrou-se linear no mesmo intervalo de concentrações (Figura 39b), porém apresentou valores de inibição menores que os das folhas.

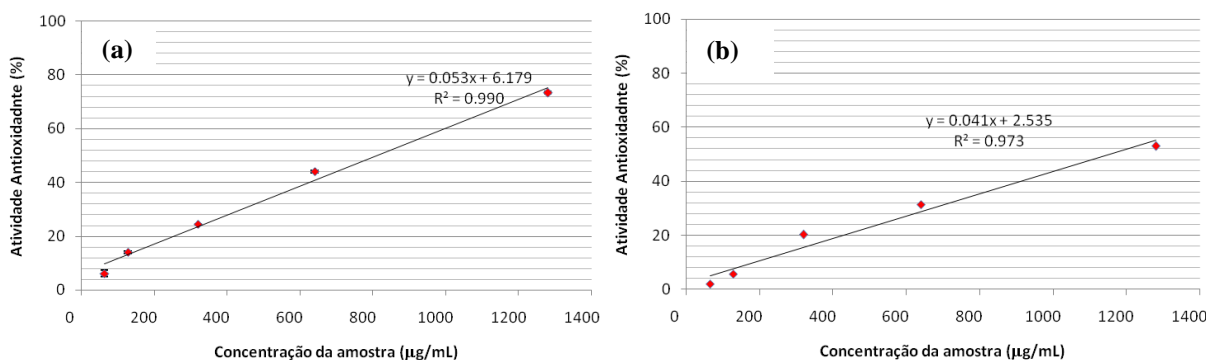


Figura 39. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases diclorometânicas dos extratos de (a) folhas e (b) galhos de *A. canelilla*.

Analisando as fases diclorometânicas das folhas e galhos (Figuras 40a e 40b) após a extração de óleo essencial, percebeu-se que os valores foram significativamente menores que antes da hidrodestilação, e ainda apresentaram atividades diferentes entre folhas e galhos. Os constituintes químicos responsáveis pela atividade podem ter sido extraídos com o óleo essencial e os diferentes valores de atividade antioxidante encontrados só poderão ser explicados por meio da caracterização química de cada extrato.

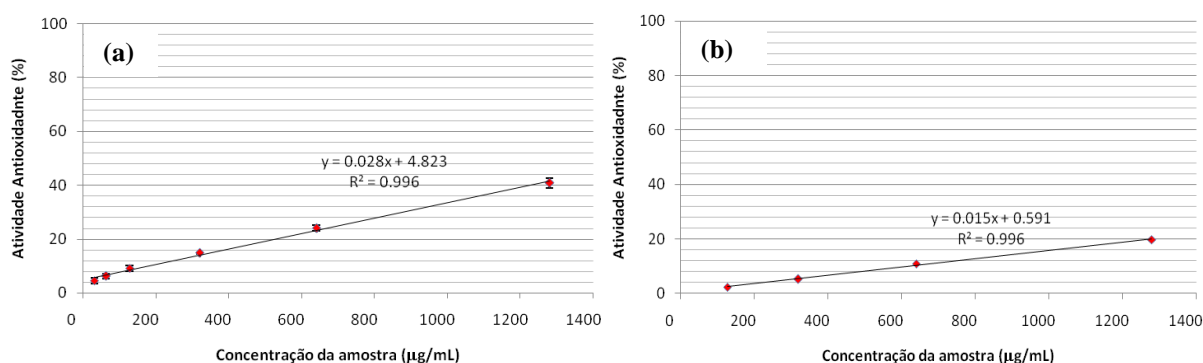


Figura 40. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases diclorometânicas dos extratos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos *A. canelilla*.

A Tabela 6 apresenta os resultados de atividade antioxidante para a fase hidroalcoólica de folhas e galhos de *A. canelilla*, e de folhas e galhos após a extração de óleo essencial.

Tabela 6. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH• expressos em média ± desvio padrão da média em função da concentração das fases hidroalcoólicas dos extratos de *A. canelilla*.

| Extrato [] µg/mL | % Inibição | | | | | | | |
|----------------------|------------|---------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | FHAF | | FHAG | | FHARF | | FHARG | |
| 0 | 0.00 | ± 0.00 | 0.00 | ± 0.00 | 0.00 | ± 0.00 | 0.00 | ± 0.00 |
| 4 | -0.27 | ± 0.82 | 2.07 | ± 2.27 | -0.64 | ± 1.05 | -0.96 | ± 0.58 |
| 8 | 0.63 | ± 0.55 | 1.54 | ± 0.89 | 1.89 | ± 3.58 | -0.64 | ± 0.56 |
| 16 | 1.48 | ± 0.36 | 1.96 | ± 1.22 | 2.11 | ± 0.95 | -0.69 | ± 0.10 |
| 32 | 5.55 | ± 1.21 | 6.56 | ± 0.61 | 9.14 | ± 6.33 | 0.63 | ± 1.10 |
| 64 | 11.69 | ± 2.59 | 13.76 | ± 1.79 | 14.14 | ± 1.82 | 1.00 | ± 2.42 |
| 128 | 36.17 | ± 16.53 | 28.84 | ± 3.36 | 29.01 | ± 3.03 | 6.72 | ± 1.68 |
| 320 | 60.06 | ± 18.79 | 60.86 | ± 4.21 | 57.41 | ± 5.54 | 27.16 | ± 1.96 |
| 640 | 80.57 | ± 0.36 | 78.83 | ± 0.33 | 78.88 | ± 0.39 | 29.81 | ± 6.33 |
| 1280 | 82.16 | ± 0.13 | 77.98 | ± 0.54 | 79.88 | ± 0.32 | 54.21 | ± 7.33 |

FHAF = Fase hidroalcoólica do extrato das folhas; FHAG = Fase hidroalcoólica do extrato dos galhos; FHARF = Fase hidroalcoólica do extratos dos resíduos das folhas; FHARG = Fase hidroalcoólica do extrato dos resíduos de galhos.

As fases hidroalcoólicas dos extratos de *A. canelilla* apresentaram excelente atividade antioxidante, tendo em vista que nas folhas (Figura 41a), o percentual de inibição chegou a 82,16%, e nos galhos (Figura 41b) a 77,98%. Esses resultados, portanto, não se diferem estatisticamente, podendo-se afirmar que ambos possuem características químicas semelhantes, e que possivelmente, a atividade antioxidante está associada a uma mesma molécula ou classe de substâncias.

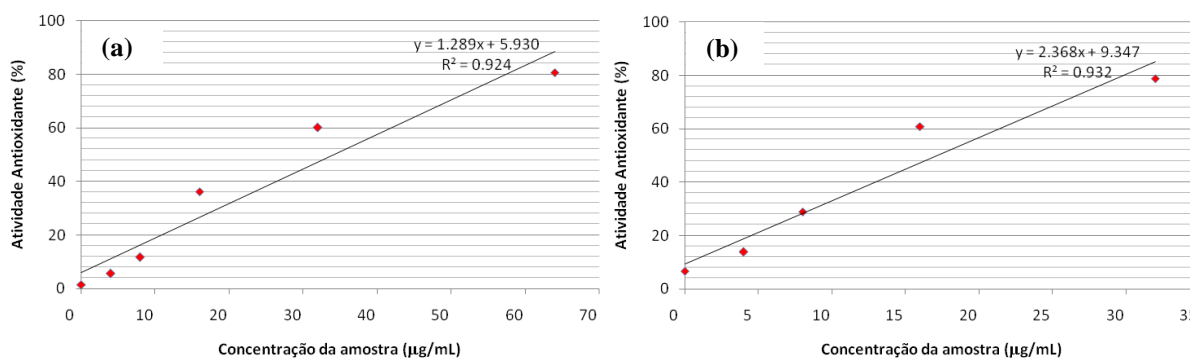


Figura 41. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hidroalcoólicas dos extratos de (a) folhas e (b) galhos de *A. canelilla*.

As fases hidroalcoólicas dos extratos dos resíduos de folhas e galhos (Figura 42a e 42b) apresentaram os maiores coeficientes de regressão de 16 a 640 µg/mL. Para as folhas, a extração do óleo essencial não alterou seu potencial antioxidante, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os resultados antes e após a hidrodestilação. Entretanto, o

percentual de inibição dos galhos foi afetado pela extração do óleo essencial já que seus valores de atividade foram significativamente mais baixos ($p < 0,05$).

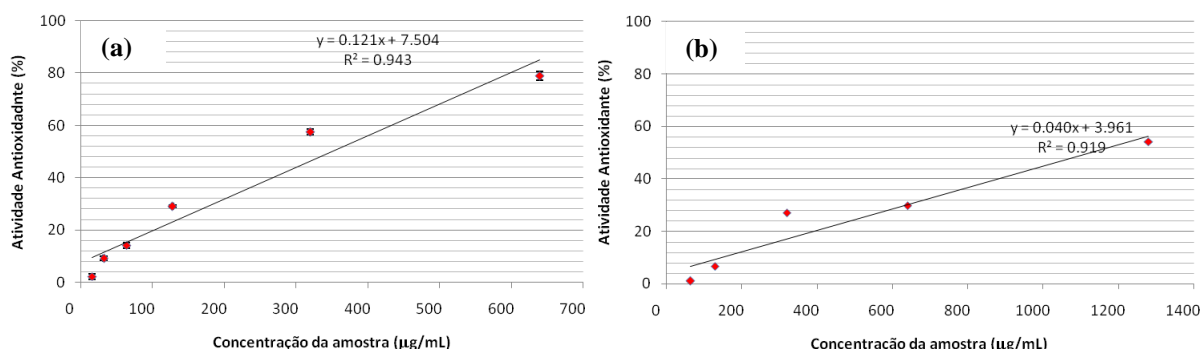


Figura 42. Curvas da atividade antioxidante em função da concentração das fases hidroalcoólicas dos extratos dos resíduos de (a) folhas e (b) galhos de *A. canelilla*.

As Tabelas 7, 8 apresentam os resultados da atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas e dos galhos, respectivamente. Durante todo o ensaio, realizado após 30 minutos (OEF30), 60 minutos (OEF60) e 90 minutos (OEF90), não foram detectadas atividades de inibição do radical DPPH· nos óleos essenciais de folhas e galhos. Portanto o método não foi eficiente para encontrar um potencial antioxidante nos óleos essenciais e no hidrolato nas concentrações estudadas.

Tabela 7. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH· expressos em média \pm desvio padrão da média em função da concentração do óleo essencial das folhas de *A. canelilla*.

| Óleo [] µg/mL | % Inibição | | | | | |
|-------------------|------------|-------------|-------|------------|-------|------------|
| | OEF30 | | OEF60 | | OEF90 | |
| 0 | 0,00 | \pm 0,00 | 0,00 | \pm 0,00 | 0,00 | \pm 0,00 |
| 4 | -4,54 | \pm 10,14 | 1,52 | \pm 1,76 | 0,75 | \pm 2,36 |
| 8 | -7,60 | \pm 11,52 | -0,79 | \pm 3,19 | -0,86 | \pm 2,11 |
| 16 | -4,37 | \pm 9,58 | -0,82 | \pm 1,90 | -0,86 | \pm 3,10 |
| 32 | -4,08 | \pm 9,56 | -1,05 | \pm 1,94 | -0,72 | \pm 5,40 |
| 64 | -6,24 | \pm 8,01 | -0,86 | \pm 1,98 | -3,55 | \pm 6,07 |
| 128 | -3,69 | \pm 9,47 | 0,20 | \pm 2,41 | -7,09 | \pm 2,45 |
| 320 | -2,77 | \pm 9,17 | 0,44 | \pm 2,12 | 0,02 | \pm 2,39 |
| 640 | -2,31 | \pm 9,43 | 0,85 | \pm 2,23 | 0,70 | \pm 3,04 |
| 1280 | -1,64 | \pm 9,46 | 1,01 | \pm 1,37 | 0,71 | \pm 2,52 |

OEF30 = Análise dos óleos essenciais de folhas em 30 minutos; OEF60 = Análise dos óleos essenciais de folhas em 60 minutos; OEF90 = Análise dos óleos essenciais de folhas em 90 minutos.

Tabela 8. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH· expressos em média \pm desvio padrão da média em função da concentração do óleo essencial dos galhos de *A. canelilla*.

| Óleos [] $\mu\text{g/mL}$ | % Inibição | | | | | |
|-------------------------------|------------|------------|-------|------------|-------|------------|
| | OEG30 | | OEG60 | | OEG90 | |
| 0 | 0,00 | \pm 0,00 | 0,00 | \pm 0,00 | 0,00 | \pm 0,00 |
| 4 | 2,31 | \pm 1,94 | -4,77 | \pm 4,27 | -7,28 | \pm 8,02 |
| 8 | 3,09 | \pm 0,74 | -1,49 | \pm 3,47 | -4,54 | \pm 5,71 |
| 16 | 1,45 | \pm 1,69 | -2,62 | \pm 2,89 | -5,22 | \pm 6,93 |
| 32 | 0,81 | \pm 1,21 | -3,25 | \pm 5,25 | -5,44 | \pm 3,64 |
| 64 | -1,13 | \pm 1,71 | -5,39 | \pm 3,53 | -8,41 | \pm 5,07 |
| 128 | -0,62 | \pm 1,65 | -0,79 | \pm 2,76 | -8,06 | \pm 6,58 |
| 320 | 2,31 | \pm 1,62 | -0,98 | \pm 2,59 | -2,03 | \pm 4,57 |
| 640 | 2,26 | \pm 1,56 | -0,98 | \pm 2,59 | -2,86 | \pm 5,71 |
| 1280 | 2,01 | \pm 1,76 | -1,09 | \pm 3,03 | -2,45 | \pm 5,11 |

OEG30 = Análise dos óleos essenciais dos galhos em 30 minutos; OEG60 = Análise dos óleos essenciais dos galhos em 60 minutos; OEG90 = Análise dos óleos essenciais dos galhos em 90 minutos.

O hidrolato (Tabela 9) resultante da hidrodestilação apresentou percentuais de inibição do radical DPPH· de até 14,31% em média, nas análises em 30, 60 e 90 minutos quando analisado sem diluição. As substâncias de caráter polar encontradas nos extratos etanólicos brutos também estão presente no hidrolato, em menor quantidade. Sendo assim, este estudo pode demonstrar um potencial biotecnológico para o aproveitamento deste resíduo.

Tabela 9. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH· expressos em média \pm desvio padrão da média em função da concentração do hidrolato de *A. canelilla*.

| Hidrolato [] % (v/v) | % Inibição | | | | | |
|--------------------------|------------|------------|-------|------------|-------|------------|
| | HID30 | | HID60 | | HID90 | |
| 0 | 0,00 | \pm 0,00 | 0,00 | \pm 0,00 | 0,000 | \pm 0,00 |
| 0,39 | -0,46 | \pm 1,61 | 0,08 | \pm 0,11 | -0,67 | \pm 1,49 |
| 0,78 | 0,31 | \pm 0,44 | -0,21 | \pm 0,40 | -0,67 | \pm 0,36 |
| 1,56 | 0,00 | \pm 0,15 | -0,05 | \pm 0,71 | -1,13 | \pm 0,69 |
| 3,13 | 3,19 | \pm 0,73 | 0,16 | \pm 0,16 | -0,87 | \pm 0,85 |
| 6,25 | 2,78 | \pm 0,16 | 0,05 | \pm 0,50 | -3,64 | \pm 3,94 |
| 12,5 | 3,60 | \pm 0,64 | 1,21 | \pm 0,65 | -0,16 | \pm 1,31 |
| 25,0 | 5,20 | \pm 0,08 | 3,93 | \pm 0,41 | 2,70 | \pm 0,99 |
| 50,0 | 8,74 | \pm 0,38 | 8,29 | \pm 0,50 | 7,49 | \pm 1,46 |
| 100,0 | 14,40 | \pm 0,45 | 14,47 | \pm 0,69 | 14,06 | \pm 0,36 |

HID30 = Análise do hidrolato em 30 minutos; HID60 = Análise do hidrolato em 60 minutos; HID90 = Análise do hidrolato em 90 minutos.

Silva et al. (2007), ao analisar extratos metanólicos de *A. canelilla*, encontraram alta atividade antioxidante, com concentrações eficientes equivalentes aos deste trabalho. Analisando os óleos essenciais do tronco, folhas e galhos, os autores perceberam que, embora menor que nos extratos, havia atividade antioxidante relevante em seus estudos ($CE_{50} = 223,81 \pm 1,88 \mu\text{g/mL}$). Analisaram também a atividade antioxidante do composto majoritário 1-nitro-2-feniletano encontrando a $CE_{50} = 792,50 \pm 9,97$ levando-nos a conclusão de que o potencial antioxidante da espécie não é devido exclusivamente a este composto. A diferença nos resultados pode ser explicada levando em consideração a amostra vegetal que foi coletada em diferentes regiões (Ulinópolis-PA e Novo Airão-AM) por Silva et al. (2007) em relação a este trabalho (Manaus-AM). O estudo da composição química neste caso faz-se necessário para caracterizar as substâncias presentes nos óleos essenciais e extratos etanólicos dos troncos, folhas e galhos para uma melhor avaliação dos resultados.

De acordo com Soares et al. (2008) os compostos fenólicos são substâncias com grande potencial antioxidante, pertencentes às classes de taninos e flavonóides. São formados no metabolismo secundário de vegetais, possuindo funções de defesa contra o ataque de pragas. Silva et al. (2007) ao analisarem os óleos essenciais de folhas e galhos finos de *A. canelilla* descreveram a presença do terpeno β -cariofileno. Associado com compostos fenólicos, o β -cariofileno tem seu potencial antioxidante aumentado através do efeito sinérgico (ADAMS, 2001), o que pode ter sido um dos responsáveis pela boa atividade antioxidante descrita pelos autores.

A realização de diferentes testes para a avaliação da atividade antioxidante se faz necessária, juntamente com a caracterização química dos componentes dos óleos e extratos, para a obtenção de respostas mais precisas sobre a interação dos compostos presentes na amostra com os diferentes radicais gerados durante a reação.

Tendo em vista os resultados observados, os extratos etanólicos brutos e a fase hidroalcoólica dos extratos de folhas e galhos de *A. canelilla* podem ser incorporados em estudos de desenvolvimento de produtos cosméticos combatentes de radicais livres. Uma outra alternativa a ser incluída nestas pesquisas, é a utilização do hidrolato, que se mostrou se certa forma eficiente na inibição do radical DPPH.

5.2 ENSAIO ANTIMICROBIANO

As soluções de óleos essenciais, hidrolato e extratos da planta foram testadas frente aos fungos *Candida albicans* (patógeno humano), *Corynespora cassiicola* (fitopatógeno do tomate), *Didymella bryoniae* (fitopatógeno da melancia), e às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativo) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo). As amostras foram avaliadas quanto à presença de halo de inibição do crescimento microbiano e os resultados estão apresentados na Tabela 10 e comparados ao controle.

Tabela 10. Resultado dos ensaios antimicrobianos das soluções de *A. canelilla*.

| Soluções (2 mg/mL) | Microrganismos | | | | |
|-----------------------|------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> | <i>D. bryoniae</i> | <i>C. cassiicola</i> |
| OEF | - | - | + | + | - |
| OEG | - | - | + | + | - |
| Hidrolato | - | - | - | - | - |
| EBEF | - | - | - | - | - |
| FHEF | - | - | - | - | - |
| FDCMEF | - | - | - | - | - |
| EBEG | - | - | - | - | - |
| FHEG | - | - | - | - | - |
| FDCMEG | - | - | - | - | - |
| EBEFR | - | - | - | - | - |
| FHEFR | - | - | - | - | - |
| FDCMEFR | - | - | - | - | - |
| EBEGR | - | - | - | - | - |
| FHEGR | - | - | - | - | - |
| FDCMEGR | - | - | - | - | - |

(+) indica teste positivo e (-) indica teste negativo. OEF = Óleo essencial das folhas; OEG = Óleo essencial dos galhos; EBEF = Extrato bruto etanólico das folhas; FHEF = Fase hexânica dos extratos das folhas; FDCMEF = Fase diclorometânica dos extratos das folhas; EBEG = Extrato bruto etanólico dos galhos; FHEG = Fase hexânica dos extratos dos galhos; FDCMEG = Fase diclorometânica dos extratos dos galhos; EBEFR = Extrato bruto etanólico dos resíduos das folhas; FHEFR = Fase hexânica dos extratos dos resíduos das folhas; FDCMEFR = Fase diclorometânica dos extratos dos resíduos das folhas; EBEGR = Extrato bruto etanólico dos extratos dos resíduos dos galhos; FHEGR = Fase hexânica dos extratos dos resíduos dos galhos; FDCMEGR = Fase diclorometânica dos extratos dos resíduos dos galhos.

De todas as soluções testadas, apenas os óleos essenciais de folhas e galhos se mostraram eficaz frente a *C. albicans* e *D. bryoniae*. Observa-se que em ambos os casos, os óleos essenciais apresentaram efetividade de inibição, caracterizado pela formação de halos

de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 20 mm. Entre os resultados obtidos, ressalta-se que a atividade mostrada pelos óleos essenciais de *A. canelilla* foi eficiente quanto à atividade fungistática, tendo em vista que após alguns dias as cepas voltaram a crescer, desaparecendo o halo de inibição inicialmente observado. A alta atividade dos óleos essenciais de *A. canelilla* pode ser verificada quando comparam-se os diâmetros dos halos de inibição do crescimento da levedura *C. albicans* (27-33 mm) frente à ação do cetoconazol usado como controle positivo (23-25 mm) (Figura 43).

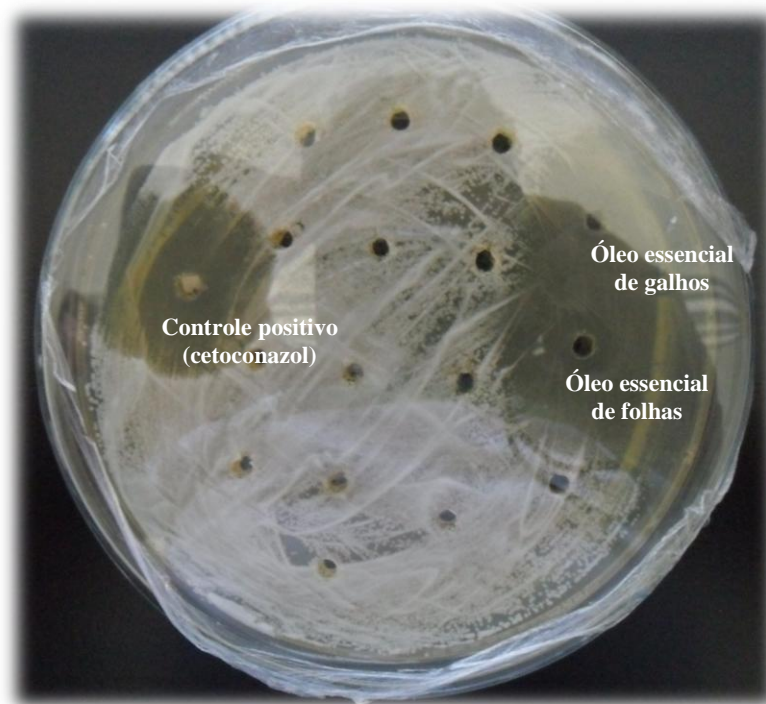


Figura 43. Ensaio antimicrobiano frente à *C. albicans* apresentando halos de inibição nos poços contendo óleos essenciais e cetoconazol (controle positivo).

Os óleos essenciais de folhas e galhos também tiveram uma notável atividade frente ao fungo *D. bryoniae*, fitopatógeno da melancia, tendo em vista seu halo de inibição de 25-30 mm em comparação ao controle negativo (solução de Tween a 1%) cujo halo não ultrapassou 10 mm. Nota-se também, de acordo com a Figura 44, que o hidrolato diminuiu a velocidade de crescimento do fungo, pois pode-se visualizar na placa um poço com a área ao redor esbranquiçada (hidrolato) e outro ponto com o fungo bem desenvolvido (solução de Tween 1%) após 48 h de crescimento fúngico.

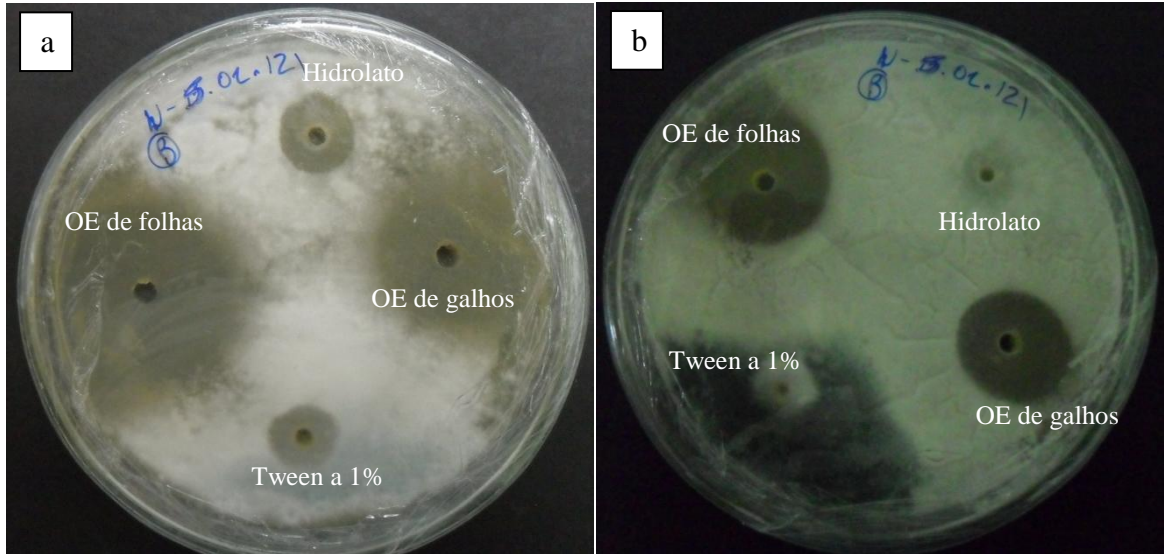


Figura 44. Ensaio antimicrobiano frente ao fungo *D. bryoniae* apresentando halos de inibição nos poços contendo os óleos essenciais. (a) após 24 h e (b) após 48 h. OE = Óleo essencial.

Não houve atividade antimicrobiana em nenhum extrato de *A. canelilla* testado. Os óleos essenciais não apresentaram atividade frente às bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*, tampouco ao fungo *C. cassicola*. A Figura 45 apresenta o ensaio de atividade contra *P. aeruginosa*, mostrando um halo de inibição apenas para o controle positivo.

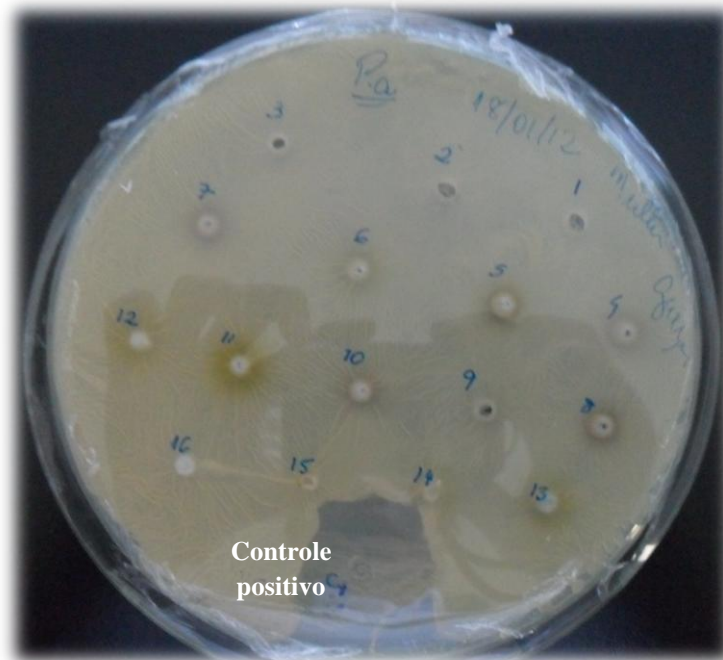


Figura 45. Ensaio antimicrobiano frente à bactéria *P. aeruginosa* apresentando halo de inibição apenas para o controle positivo.

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência das plantas, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (LIMA et al., 2006).

Segundo Oger et al. (1994), a alta toxicidade do óleo essencial de *A. canelilla* contra *C. albicans* (MIC 170 µg/mL) e *Aspergillus fumigatus* (MIC 1500 µg/mL) se deve ao composto majoritário 1-nitro-2-feniletano, isolado a partir de extratos hexânicos das cascas do tronco. Possivelmente, o mesmo componente é o responsável pela toxicidade contra *D. bryoniae* observada neste trabalho.

Considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados, pode-se inferir que a pesquisa de busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal mostra-se de relevante significância. É possível observar o potencial antibiótico que os produtos vegetais possuem, e por consequência, a real possibilidade de aplicação destes produtos na prevenção e tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica. Porém, é necessário citar a necessidade de realização de estudos de cunho toxicológico e clínico como suporte de segurança para o uso destes produtos como fármacos ou cosmeceuticos.

5.3 CITOTOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Os resultados de mortalidade dos náuplios de *Artemia salina* expostos ao hidrolato de *Aniba canelilla* estão listados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados do percentual de mortalidade das larvas de *A. salina* em função das concentrações do hidrolato de *A. canelilla*.

| [Hidrolato] | | Mortalidade | | | |
|-------------|----|-------------|----|-------|------------|
| % (v/v) | | Réplicas | | Total | Percentual |
| 0,0 | 1 | 0 | 2 | 3 | 6,67 |
| 0,1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2,22 |
| 1,0 | 4 | 1 | 2 | 7 | 15,56 |
| 10,0 | 15 | 15 | 15 | 45 | 100,00 |
| 100,0 | 15 | 15 | 15 | 45 | 100,00 |

O hidrolato de *A. canelilla* apresentou-se altamente tóxico frente às larvas de *Artemia salina*. As concentrações testadas foram de 100% (hidrolato puro) seguida de diluições sucessivas com razão igual a 10, seguindo uma progressão geométrica decrescente até 0,1%. Os dados de percentual de mortalidade foram expressos em função da concentração para a determinação da concentração letal a 50% da população (CL₅₀) (Figura 46). Os resultados demonstram linearidade em relação à concentração do hidrolato na faixa de 0% a 10%, sendo utilizados para a construção da curva, visto que a partir da concentração de 10% a mortalidade já era de 100% das larvas.

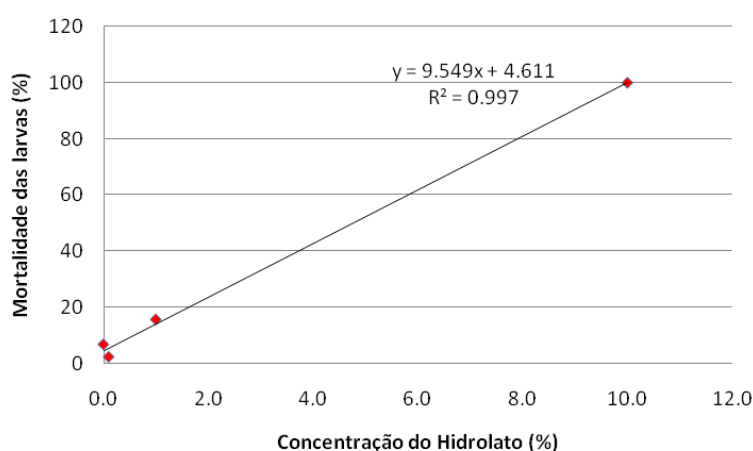


Figura 46. Curva apresentando o percentual de mortalidade de *A. salina* em função das concentrações do hidrolato de *A. canelilla* mostrando a equação da reta utilizada para o cálculo da CL₅₀.

A CL₅₀ do hidrolato, de acordo com equação da reta obtida, foi de 5,72%, sendo considerado um baixo valor (altamente tóxico), levando em consideração que se trata de um resíduo líquido que é geralmente descartado nos rios pelas indústrias de óleos essenciais.

Souza et al. (2007) analisaram o hidrolato de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) utilizando as concentrações de 12,5%, 25% e 50 %, e perceberam que na concentração a 12,5% ainda existiam larvas vivas, porém debilitadas, considerando o hidrolato ativo frente ao crustáceo. Esse resultado é diferente do encontrado neste trabalho, onde a partir de 10% não se encontravam mais larvas sobreviventes. Silva et al. (2007), ao analisar óleos essenciais extraídos das cascas do tronco, bem como o 1-nitro-2-feniletano isolado de *A. canelilla*, observaram uma alta atividade citotóxica frente à *A. salina*, com CL₅₀ igual a $21,61 \pm 1,21$ e $20,37 \pm 0,99$ µg/mL, respectivamente. Por outro lado, os autores verificaram que os extratos metanólicos da madeira apresentaram CL₅₀ igual a $91,38 \pm 7,20$ µg/mL, mostrando uma citotoxicidade 4 vezes menor, demonstrando a grande correlação entre o composto majoritário

1-nitro-2-feniletano encontrado no óleo essencial com a bioatividade. Contudo, como todos apresentaram a CL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$, foram considerados ativos. Tendo em vista que certa quantidade de óleo essencial encontra-se dispersa na água resultante da hidrodestilação, estes dados justificam a bioatividade do hidrolato de *A. canelilla*.

Estudos comparativos efetuados no Instituto Nacional do Câncer (EUA) apontam que, em geral, a alta toxicidade (ou seja, baixa CL_{50}) de substâncias frente a larvas de *Artemia* é correlacionada à alta inibição (ou baixa concentração letal mediana (CL_{50})) *in vitro* em linhagens de células provenientes de tumores sólidos. Tendo em vista esses resultados, pode-se afirmar que o hidrolato de folhas e galhos de *A. canelilla* (H.B.K) Mez possui substâncias potencialmente citotóxicas e antitumorais (ANDERSON et al., 1991). Por outro lado, uma baixa toxicidade pode ser uma boa característica para utilização de extratos vegetais em ambientes naturais, por exemplo, para o controle da população de caramujos (NUNES et al., 2008).

Assim como o trabalho de Souza et al. (2007) alerta, deve-se tomar um cuidado especial no descarte deste resíduo no meio ambiente, ou na tentativa de se agregar valor a este sub-produto, tendo em vista que o hidrolato possui substâncias ativas, e se for lançado ou utilizado sem tratamento prévio, pode causar danos principalmente ao ambiente aquático e à saúde humana.

5.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

5.4.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos registrados nos aquários dos grupos Controles e Tratamento não apresentaram diferença significativa entre os eles quanto à concentração de oxigênio dissolvido e temperatura. As águas apresentaram um aumento significativo no pH no grupo que continha o hidrolato (Tabela 12), porém ainda dentro dos limites aceitáveis. Esses parâmetros são importantes para o monitoramento da água, reduzindo assim a mortalidade dos peixes causada por variações bruscas destes parâmetros durante as 96 horas de experimento, além de eliminar outras variáveis que possam alterar os resultados.

Também foi observada elevada produção de muco e leve expansão do lábio inferior. A expansão do lábio inferior é uma característica sintomática de hipóxia, apesar dos níveis de

oxigênio apresentarem-se normais. Situação similar foi descrita por Oliveira (2003), que trabalhou com os metais cobre e chumbo presentes na água de formação do petróleo.

Tabela 12. Características físico-químicas das águas dos aquários experimentais utilizados durante os experimentos de exposição aguda ao hidrolato de *A. canelilla*.

| Grupos de Exposição | Parâmetros físico-químicos | | |
|---|----------------------------|-----------------------|------------|
| | pH | O ₂ (mg/L) | Temp. (°C) |
| Controle 1 (Água) | 7,0 ^a ± 0,3 | 6,8 ± 0,6 | 26,7 ± 1,9 |
| Controle 2 (Água + DMSO 0,025%) | 7,0 ^a ± 0,3 | 6,0 ± 1,7 | 26,7 ± 2,0 |
| Tratamento (Hidrolato 1% + DMSO 0,025%) | 7,4 ^b ± 0,4 | 6,9 ± 0,6 | 26,6 ± 1,9 |

Letras minúsculas representam a comparação estatística entre os grupos

5.4.2 Parâmetro genotóxico

A porcentagem de anormalidades nucleares foi significativamente maior no grupo Tratamento (4,05 ± 0,08%) em relação aos grupos Controle 1 (2,07 ± 0,40%) e Controle 2 (1,60 ± 0,48%) (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados de Anormalidade Nucleares Eritrocíticas (ANE) de *Colossoma macropomum* após 96 h de exposição ao hidrolato de *A. canelilla* expressos em média ± desvio padrão da média.

| Parâmetro | Grupos de Exposição | | |
|-----------|--------------------------|---------------------------------------|---|
| | Controle 1 (Água) | Controle 2 (Água + DMSO 0,025%) | Tratamento (Hidrolato 1% + DMSO 0,025%) |
| ANE (%) | 2,07 ^a ± 0,40 | 1,60 ^a ± 0,48 | 4,05 ^b ± 0,88 |

Letras minúsculas representam a comparação estatística entre os grupos.

A análise das anormalidades nucleares eritrocíticas tem sido geralmente utilizada como indicador genotóxico, para avaliar o efeito da exposição do animal à substâncias químicas tóxicas (PACHECO e SANTOS, 1998). Por outro lado, os animais podem produzir

anormalidades nucleares naturalmente, por um erro no processo de divisão celular (OLIVEIRA, 2005).

Os mecanismos de formação das anormalidades nucleares não são completamente conhecidos. No entanto, a exposição de peixes a ambientes poluídos também pode induzir a um estresse oxidativo e à peroxidação lipídica, e dependendo do tempo de exposição e da concentração dos poluentes, o processo de biotransformação dessas substâncias pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). As EROs são mediadoras na indução de genotoxicidade e citotoxicidade, pois podem reagir com ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e proteínas, danificando as células (OLIVEIRA, 2003).

5.4.3 Parâmetros hematológicos

A concentração de hemoglobina (Hb) foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo Controle 1 ($3,81 \pm 0,40$ g/dL) em relação ao Tratamento ($6,57 \pm 1,02$ g/dL), embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos Controle 2 ($5,19 \pm 0,70$ g/dL) e o Tratamento (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados dos parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após 96 h de exposição expressos em média \pm desvio padrão da média.

| Parâmetros | Grupos de Exposição | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|---|-------------|
| | Controle 1 (Água) | | Controle 2 (Água + DMSO 0,025%) | | Tratamento (Hidrolato 1% + DMSO 0,025%) | |
| Hb (g/dL) | 3,81 ^a | \pm 0,87 | 5,19 ^{ab} | \pm 0,70 | 6,57 ^b | \pm 1,02 |
| Ht (%) | 14,50 ^a | \pm 2,78 | 18,70 ^b | \pm 1,48 | 19,75 ^b | \pm 1,84 |
| MetaHb (%) | 74,28 | \pm 7,17 | 71,64 | \pm 16,46 | 77,95 | \pm 5,68 |
| Glicose (mg/dL) | 33,60 | \pm 5,86 | 36,00 | \pm 2,74 | 41,67 | \pm 8,50 |
| RBC (10^6 cél/mm ³) | 1,00 | \pm 0,84 | 1,07 | \pm 0,55 | 1,69 | \pm 1,52 |
| HCM (μ g) | 38,15 | \pm 8,75 | 48,67 | \pm 6,57 | 38,92 | \pm 6,05 |
| VCM (μ m ³) | 145,00 | \pm 27,84 | 175,31 | \pm 13,91 | 116,94 | \pm 10,88 |
| CHCM (%) | 26,56 | \pm 5,84 | 27,83 | \pm 3,76 | 33,23 | \pm 3,75 |

Letras minúsculas representam a comparação estatística entre os grupos.

Os valores da concentração de hemoglobina podem ser afetados na presença de algum xenobiótico dependendo da concentração e tempo de exposição (ESTRIDGE e REYNOLDS, 2011). Alguns trabalhos como o de Veintemilla (2006) relatam a diminuição na concentração de hemoglobina em tabaquis sob exposição crônica ao fenantreno. Dede et al. (2002) inocularam amostras de petróleo cru, querosene e gasolina em ratos, e após 3 meses, observaram uma significativa redução na concentração de hemoglobina. A baixa taxa de hemoglobina pode ser causada por um incremento na taxa de destruição da hemoglobina ou por um decréscimo na taxa de síntese (JEE et al., 2004).

Em relação a este trabalho, não foi observado uma diminuição, e sim um aumento na concentração de hemoglobina. Considerando que houve um aumento na produção de muco nos peixes, o mesmo pode ter dificultado as trocas gasosas, sendo necessário um aumento na síntese de hemoglobina para compensar a falta de oxigênio, tendo em vista que a concentração de oxigênio dissolvido nos aquários estava dentro dos valores normais. O mesmo foi observado por Oliveira (2003). Contudo, não se pode atribuir o aumento da concentração de hemoglobina unicamente à exposição ao hidrolato de *A. canelilla*, pois este efeito foi observado também no grupo Controle 2, onde havia solução de DMSO a 0,025%.

A porcentagem de hematócrito também apresentou diferença estatística no grupo Controle 1 ($14,50 \pm 2,78\%$) em relação aos grupos Controle 2 ($18,70 \pm 1,48\%$) e Tratamento ($19,75 \pm 1,84\%$), sendo estes dois últimos iguais estatisticamente. Esses dados corroboram o fato de que a exposição dos indivíduos ao hidrolato a 1% de *A. canelilla* e ao DMSO a 0,025% provoque um ajuste fisiológico, maximizando a transferência de oxigênio do meio ambiente para o tecido. Estes parâmetros, hemoglobina e hematócrito, aumentaram significativamente nos grupos expostos, indicando um investimento do organismo em captar oxigênio na presença das soluções.

As porcentagens de metahemoglobina (MetaHb) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos Controle 1 ($74,28 \pm 7,17\%$), Controle 2 ($71,64 \pm 16,46\%$) e Tratamento ($77,95 \pm 5,68\%$) demonstrando que a presença das substâncias acrescentadas (DMSO e hidrolato) não influenciou na biodisponibilidade de ferro à hemoglobina. Segundo Domingos (2006), a elevação deste parâmetro também está relacionada com o estresse oxidativo. No estado normal, o ferro inserido no grupo “heme” da hemoglobina encontra-se no estado reduzido ou ferroso (Fe^{2+}). Entretanto, situações de estresse que elevam a

concentração de produtos com potencial oxidativo, oxidam o ferro, mudando-o para o estado férrico (Fe^{3+}), tornando a hemoglobina não funcional, assim denominada metahemoglobina.

A concentração de glicose também não foi alterada entre os grupos Controle 1 ($33,60 \pm 5,86$ mg/dL), Controle 2 ($36,00 \pm 2,74$ mg/dL) e Tratamento ($41,67 \pm 8,50$ mg/dL), mantendo-se em valores estatisticamente iguais. Apesar do aparente aumento observado no grupo Tratamento, não foi evidenciado estresse nos animais pela exposição aguda ao hidrolato, assim como outros parâmetros hematológicos (RBC, HCM, VCM e CHCM) indicaram que não houve diferenças significativas entre os grupos.

5.5 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR DA EMULSÃO COSMÉTICA

As emulsões caracterizadas como macroscopicamente estáveis após 24 h da formulação, acrescida de hidrolato, extrato glicólico e óleo essencial de *A. canelilla*, foram submetidas aos estudos preliminares de estabilidade, por um período de 15 dias (ANVISA, 2004). As amostras foram examinadas macroscopicamente e submetidas aos testes de centrifugação, ciclo gela-degela, estresse térmico e refrigerador. Foram feitas as análises de pH, densidade aparente e densidade relativa. Os resultados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Valores dos parâmetros físico-químicos observados durante os ensaios de estabilidade preliminar da emulsão cosmética.

| Amostras | Aspecto | Densidade Aparente (g/mL) | | | Densidade Relativa (g/mL) | | | pH | | |
|-------------------|---------|---------------------------|---|------|---------------------------|---|------|-------|---|------|
| Controle | N | 0.95 | ± | 0.00 | 0.95 | ± | 0.00 | 5.45 | ± | 0.07 |
| Ciclo gela-degela | N | 0.97 | ± | 0.00 | 0.97 | ± | 0.00 | 4.59* | ± | 0.08 |
| Estresse térmico | H | 0.97 | ± | 0.01 | 0.97 | ± | 0.01 | 5.01* | ± | 0.08 |
| Refrigerador | N | 0.96 | ± | 0.00 | 0.96 | ± | 0.00 | 4.98 | ± | 0.23 |
| Contrifugação | N | 0.97 | ± | 0.01 | 0.97 | ± | 0.02 | 5.46 | ± | 0.27 |

N = normal; H = heterogêneo

As emulsões submetidas aos ensaios de estabilidade demonstraram semelhança, no que se refere à cor, odor e aparência, em relação às emulsões recentemente elaboradas, independente das condições e períodos de armazenamento (Figura 47).

Na avaliação do aspecto, primeiramente foram definidas quais as características desejáveis para o produto. Dentre as características organolépticas as qualidades desejáveis foram: homogeneidade, brilho, macio, fino e opacidade. Dentre os defeitos aceitáveis e os defeitos sérios, incluem-se: para homogeneidade, o defeito sério é o produto se apresentar heterogêneo; para o brilho, o defeito aceitável é mate e o defeito sério é opaco; para a qualidade macio, o defeito sério é fibroso; para a qualidade fino, o defeito sério é grosso; para opacidade, o defeito aceitável é translúcido ou perolado e o defeito sério é opalescente. Como defeito sério, em quaisquer produtos, são inaceitáveis as bolhas de ar (CEFALI, et al., 2008).



Figura 47. Emulsão cosmética apresentando aspectos homogêneo, brilhante e fino, após a preparação.

A homogeneidade foi perdida e o produto adquiriu um aspecto heterogêneo, opaco e fibroso, tidas como defeitos sérios, apenas após o estresse térmico, que visa acelerar interações físico-químicas entre as matérias-primas, com formação ou destruição de compostos através do aumento de temperatura num reduzido espaço de tempo (RIEGER, 1996). Após o estresse térmico obteve-se um pH estatisticamente diferente do controle. Neste quesito, o produto não se mostrou estável, sendo necessária alteração em sua composição.

O aspecto de um fitocosmético, em relação à homogeneidade e coloração do produto, é importante do ponto de vista comercial, uma vez que pode influenciar a compra, por parte do consumidor, que não se sente atraído pela aparência do produto (ISAAC et al., 2008).

Os ensaios de centrifugação são os primeiros testes de caráter eliminatório que objetivam verificar possíveis instabilidades, como: separação de fase, coalescência, entre outras, pelo aumento da mobilidade das partículas como consequência do aumento da força da

gravidade (ANVISA, 2004). De acordo com os resultados, a formulação demonstrou-se estável, não apresentando cremeação, tampouco separação de fases.

O procedimento de centrifugação é eficaz na determinação da instabilidade dos produtos emulsificados, já que a simulação de aumento da força de gravidade pode promover separação de componentes de diferentes densidades, como nas fases óleo e água. Diversos valores de rotação e tempo de centrifugação são citados na literatura, entretanto, o uso da ultracentrifugação não é recomendado. Velocidades de rotação moderadas entre 2000 e 5000 rpm, durante curto período, são muito úteis para verificar o comportamento das gotículas emulsionadas frente à força da gravidade (RIEGER, 1996).

As densidades da formulação não apresentaram variação significativa. Os valores medidos durante os ensaios de estabilidade preliminar não diferem entre si nos produtos elaborados.

O pH das emulsões em estudo foi ajustado para $5,45 \pm 0,07$, visando adequar o produto à via de administração, e acompanhado durante os estudos de estabilidade. Os resultados (Tabela 15) demonstram que as emulsões armazenadas durante os 14 dias em refrigerador, bem como as submetidas à centrifugação, não apresentam variação significativa de pH, quando comparadas com o pH do controle, referente às emulsões recentemente obtidas ($p > 0,05$). Entretanto, observa-se uma ligeira diminuição do pH dos sistemas armazenados sob estresse térmico e em ciclos gela-degela, sendo indicativos de instabilidade. Como pode ser verificado, os valores não sofreram alteração maior que 10%. Porém, os valores ficaram abaixo de 5,5 e 6,5, tornando-os incompatíveis com o pH cutâneo. Valores baixos de pH podem estar relacionados ao aparecimento de irritação dérmica cumulativa (LEONARDI, 2002), e ocorrer devido à degradação de qualquer componente do fitocosmético.

O pH de uma formulação deve garantir a estabilidade dos ingredientes da formulação, sua eficácia e segurança (ANVISA, 2004), bem como ser compatível com os fluidos biológicos de acordo com a via de administração pretendida. A maior estabilidade dos sistemas dá-se quando estes são mantidos dentro de uma pequena variação de pH. Desta forma, a diminuição progressiva da estabilidade dá-se quando o pH se afasta de seu limite ótimo (GENNARO e REMINGTON, 1999).

Apesar do valor do pH não ser uma medida tão sensível à instabilidade quando comparado à condutividade elétrica, alterações deste durante o período de estocagem nas diferentes temperaturas podem indicar um processo de instabilidade. Segundo Masmoudi et

al. (2005), a diminuição do pH pode representar uma oxidação da fase oleosa com formação de hidroperóxidos, ou mesmo a hidrólise de triglicerídeos levando à formação de ácidos graxos.

Emulsões fisicamente estáveis são melhores preparadas por meio da presença de uma camada condensada de emulsionante na interface óleo/água; e, os filmes interfaciais complexos, obtidos mediante a mistura de um agente emulsionante solúvel em água com outro solúvel em óleo, permitem obter emulsões com resultados mais satisfatórios (AULTON, 2005).

Logo, um estudo aprofundado da estabilidade das emulsões deve ser conduzido, objetivando antever possíveis alterações das amostras ao armazená-las em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer; permitindo, assim, obter informações sobre a estabilidade do produto em menor tempo possível (ANVISA, 2004).

6 CONCLUSÕES

Os resultados indicam a potencialidade do emprego de *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez, por meio da utilização dos extratos etanólicos, hidrolato e óleos essenciais obtidos de suas folhas e galhos para pesquisa e 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. canelilla* possuem potencial antioxidante que podem ser incorporados em formulações cosméticas anti-radicaís livres pois possuem concentrações eficientes abaixo de 500 µg/mL. Uma forma de se obter melhores resultados é realizar partições líquido-líquido ressuspensando os extratos etanólicos secos em etanol:água (1:3) particionando em *n*-hexano e diclorometano, afim de obter a fase hidroalcoólica, que demonstrou os melhores resultados de percentual de inibição do radical DPPH.

➤ A utilização de extratos dos resíduos sólidos (material vegetal) da hidrodestilação de óleos essenciais pode ser aproveitada em formulações cosméticas anti-radicaís livres, desde que sejam utilizadas as fases hidroalcoólicas da partição líquido-líquido, tendo em vista que houve um aumento significativo nas concentrações eficientes dos extratos brutos em relação a fase hidroalcoólica.

➤ Os extratos etanólicos das folhas e suas partições mostraram-se mais eficiente que os extratos etanólicos dos galhos e suas partições na inibição do radical DPPH, devido à maior concentração de substâncias antioxidantes de caráter polar nas folhas de *A. canelilla*.

➤ Os óleos essenciais de folhas e galhos de *A. canelilla* não apresentaram potencial antioxidante frente a metodologia utilizada devendo-se investigar tal potencial por meio de outras técnicas analíticas.

➤ O hidrolato de *A. canelilla* possui potencial antioxidante que pode ser aproveitado pelas indústrias de cosméticos, ao invés de ser descartado como resíduo da indústria de óleos essenciais.

➤ Os óleos essenciais obtidos de folhas e galhos de *A. canelilla* possuem ação antifúngica contra *Candida albicans* e podem ser utilizados em formulações cosméticas com ativo natural, como sabonetes líquidos íntimos, após a investigação da interação entre seus componentes. Os óleos essenciais demonstraram atividade antifúngica também contra *Didymella bryoniae*, que é um fitopatógeno da melancia, possuindo um bom potencial

biotecnológico na elaboração de agrotóxicos naturais, tendo em vista a baixa toxicidade ambiental em relação aos defensivos sintéticos.

➤ Os hidrolatos e os extratos etanólicos, bem como suas partições, da planta íntegra e dos resíduos sólidos, não apresentaram quaisquer atividades contra os fungos e as bactérias testadas, no entanto não se deve descartar a possibilidade de se encontrar atividades contra outras cepas fúngicas e bacterianas de interesse médico e agroindustrial.

➤ Os hidrolatos demonstraram uma alta atividade citotóxica frente as larvas de *Artemia salina* apresentando sua concentração letal em 5,72% (v/v). Considerando que este ensaio tem uma boa correlação com atividade anticâncer, pode-se afirmar que os hidrolatos de *A. canelilla* possuem potencial a ser investigado nessa linha de pesquisa.

➤ O hidrolato de *A. canelilla* pode gerar riscos ao ambiente aquático onde são lançados, pois na concentração de 1% promoveu o aumento de anormalidades nucleares eritrocíticas em *Colossoma macropomum* (tambaqui), possuindo efeitos genotóxicos que podem levar à mutações em nível molecular, caso esse efeito seja constante.

➤ A exposição do *C. macropomum* ao hidrolato a 1% também gerou mudanças fisiológicas por meio de alterações nas concentrações de hemoglobina e no micro-hematócrito evidenciando dificuldade respiratória ocasionada na presença do DMSO e acentuada na presença do hidrolato de *A. canelilla*. Todos os outros parâmetros hematológicos avaliados não tiveram seus valores alterados na presença do xenobiótico.

➤ A formulação cosmética acrescida de óleo essencial, hidrolato e extrato glicólico de *A. canelilla* mostrou-se macroscopicamente estável em todos os testes durante o ensaio de estabilidade preliminar, exceto após estresse térmico que apresentou separação de fases e diminuição nos valores de pH. No ensaio que envolveu alteração drástica de temperatura, o ciclo gela-degela, a emulsão também apresentou diminuição nos valores de pH. Tendo em vista esses resultados, a formulação avaliada não pode 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Allured: Card Stream I L, 2001.

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. 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.

ALVARENGA, M. A.; BROCKSON, U.; CASTRO, C. O.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Neolignans from *Aniba burchelli*. *Phytochemistry*, v. 16, p. 1797-1799, 1977.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. *Biologia*. v. 2, 3.ed. São Paulo: Moderna, 2010.

ANDERSON, J. E. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreena. *Phytochemical Analysis*, v. 2, p.107-111, 1991.

ANDRÉA, M. M. *Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos*. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/index.htm>. Acesso em: 4 de agosto de 2011.

ANGÉLICO, E. C. *Avaliação das atividades antibacterianas e antioxidante de Croton heliotropiifolius Kunt e Croton blanchetianus Baill*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Saúde Tecnologia Rural. Universidade Federal de Campina Grande. Patos. Paraíba. 2011.

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

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 para avaliação de segurança de produtos cosméticos*. Brasília, 2003.

ARAÚJO-JÚNIOR, C. P. *Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas*. Dissertação de mestrado em Química. Universidade Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; SANTOS-FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Revista de Patologia Tropical*, v. 33, p. 55-64. 2004.

ASEN, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. *Journal of Biological Research*, v. 9, p. 113-114, 2008.

AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 677, 2005.

AZEVEDO, A. F; CHASIN, A. A. M. (Coords.). *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Carlos: RiMa, 2004. 340p.

BAKER, F.J.; SILVERTON, R.F.; PALLISTER, C.J. *Baker e Silverton's introduction to medical laboratory technology*. 7.ed. London: Edward Arnold publishers, 2001. 448p.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. A. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANHOS, E. F. Atividade antimicrobiana de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) e seus fungos endofíticos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2011. 99p.

BARROS, A. L. N. *Análise de Perfumes*. 2007. Monografia (Conclusão de Curso de Farmácia), Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2007.

BASTOS, A. M. Os paus-rosa da indústria da essência. *Rodriguésia*, v. 16, p. 45-54, 1943.

BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

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.

BRANDÃO, V. M.; OLIVEIRA, C. P. F.; SILVA, M. N. P.; FIGUEIREDO, R. O.; DOMINGOS, F. X. V.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. *Atividade de enzima glutathione S-transferase como biomarcador de exposição ao petróleo em peixes Amazônicos*. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 2009. Disponível em <http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/5971.htm>. Acessado em: 09 de agosto de 2011.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 344, de 25 de março de 2004. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, nº 87, de 07 de abril de 2004.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as

condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, nº 53, de 18 de março de 2005, Seção 1, p. 58-63. 2005.

BRITO, A. F. R. *Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de Ocotea Porosa (Nees) Barroso e Nectandra megapotamica (Spreng). Mez.* 2009. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BUCHILI, L. Radicais livres e antioxidantes. *Cosmetics & Toiletries*, v. 14, n. 2, p. 54-57. 2002.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W., ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 3, p. 357-364. 2006.

CAMPANHOLO, T. **Comércio eletrônico e estratégia competitiva: estudo de caso na indústria de cosméticos.** Dissertação de mestrado em Biotecnologia e Gestão Industrial. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment os the piscine micronuclei test in situ biological indicator of chemical contaminats effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVERA, M. C. C. DE; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, Á. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 23-25, 2000.

CEFALI, L. C.; CHIAR, 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.

CESAR, A.; SILVA, S. L. R.; SANTOS, A. R. *Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição.* 4.ed. Santos: Universidade Santa Cecília – UNISANTA, 1997.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Qualidade do solo.* Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/informacoesB%C3%A1sicas/Vegeta%C3%A7%C3%A3o/8-Bioindicadores>>. Acessado em: 5 de agosto de 2011.

CHAAR, J. S. Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba dukei* Kostermans. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2000. 125p.

CHAPMAN, P. M. Emerging substances - Emerging problems? *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 6, p. 1445-1447, 2006.

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, 2007a.

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRANCO, Y. O. Toxicologia dos cosméticos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 1, p. 144-54, 2007b.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. CRC Press: London, 1993. 441p.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L.; Venezenin: a new bioactive Annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica*. *Journal of Natural Products*, v. 58, n. 4, p. 532-539, 1995.

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

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

DEDE, E. B.; IGBOH, N. M.; AYALOGU, O. A. Chronic toxicity study of the effect of crude petroleum (Bonny light), kerosene and gasoline on rats using haematological parameters. *Journal of applied sciences & environmental management*, v. 6, n. 1, p.60-63, 2002.

DELL, B. B.; MCCOMB, A. J. Plant resins - Their formation, secretion and possible functions. *Advances in Botanical Research*, v. 6, p. 277-316, 1979.

DOMINGOS, J. C. P. R. **Respostas metabólicas e genéticas do acará-açu, *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae) mediante exposição ao petróleo.** Dissertação de mestrado em Genética Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. 2006.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 308-316, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R.; J. Dos; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 446-452, 2006.

DUARTE, M. C. T. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p. 197-200, 2007.

ESTRIDGE, B. H.; REYNOLDS, A. P. *Técnicas Básicas de Laboratório Clínico*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 800p.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERRARI, M. *Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba*. 1998. 147p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

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.

FINE, M. J.; SMITH, M. A.; CARSON, C. A. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, v. 2, n. 275, p. 134-41, 1996.

FONSECA, A. L. **A Biologia da Espécie *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia* silvestre (Cladocera, Crustacea) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o Comportamento Destes em Testes de Toxicidade Aquática com Efluentes Industriais**. São Carlos: USP, 1991. 210p.

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

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. *Cosméticos a Química da Beleza*. Sala de Leitura, 2009. 38p.

GASPARRI, S. *Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus**. 2005. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GENNARO, A. R. e REMINGTON, G. A. R.: *A ciência e a prática da farmácia* 20 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1999. 2208p.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. *Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

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

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M; MAGALHÃES, M. T; MAIA, J. G. S; MENDES, P. H; ROCHA, A. I.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazonica*, v. 11, n. 1, p. 143-148, 1981.

GOULDING, M.; CARVALHO, M. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 1, n. 2, p.107-133, 1982.

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, ano 2, n. 1, 2003.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford Science Publications, 2000. 936p.

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. *Macroinvertebrate biomarkers - Links to toxicosis and changes in populations or communities*. Relatório final, CRCFE, Canberra, 2000. Disponível em: <<http://freshwater.canberra.edu.au/publications.nsf/f8748e6acfab1b7fca256f1e001536e1/2ebee656260e342bca256f0f00401f21?OpenDocument>> Acessado em: 11 de novembro de 2011.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. *Drug and Cosmetic Industry*, v. 103, n. 12, p. 35-38, 1988.

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

IDSON, B. Stability testing of emulsions, II. *Drug and Cosmetic Industry*, v. 142, n. 2, p. 38-43, 1993b.

INTERAMINENSE, L. D. F. L.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 25, n. 6, p. 661-669, 2010.

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

JEE, J. H.; KIM, S. G.; KANG, J. C. Effects of growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 304, p. 123-136, 2004.

JESUS, T. B. D.; CARVALHO, C. E. V. D. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

JUERGENS, U. R.; STOBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. *European Journal of Medical Research*, v. 3, p. 407-412, 1998.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, v. 498, p. 61-77, 2001.

KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Standardization of Haemoglobinometry. In: DE BOROVICZÉNY, C. G. (Ed.). *Erythrocytometric Methods and Their Standardization*. Transactions of the Standardizing Committee and Proceedings of Symposium 18 of the 9th Congress of the European Society of Haematology, Lisbon, August 1963. New York: Basel, 1964. 124 p.

KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G. W.; RODRIGUEZ, E. The Chemistry of Biologically Active Constituents Secreted and Stored in Plant Glandular Trichomes. In: RODRIGUEZ, E. (Ed.). *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. New York: Plenum Press, 1984. p. 187-241.

KIRSCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT A.; BOECK M. D.; DECORDER I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*, v. 504, p. 137-148, 2002.

KLEPACKI, L. A. **Avon: a história da primeira empresa do mundo voltada para a mulher**. Rio de Janeiro: BestSeller, 2006. 276p.

KNEIFEL, W.; CZECH, E.; KOOP, B. Microbial contamination of medicinal plants. *Planta Medica*, v. 68. p. 5-15, 2002.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, v. 27, p. 969-978, 1988.

LEE, K. Current development in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *Jornal of Natural Products*, v. 64, p. 273-283, 2004.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, v. 544, p. 43-64, 2003.

LEITE, J. P. V. *Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas*. São Paulo: Atheneu, 2009. 328p.

LEONARDI, G. 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 de Dermatologia*, v. 77, n. 5, 2002.

LIMA, C. G.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; PIANNOVSKI, A. R.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 89, n. 3, p. 239-245, 2008.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA, M. P.; SILVA, T. M. D.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. *Acta Amazonica*, v. 34, n. 2, p. 329-330, 2004.

LOPES, S.; ROSSO, S. **Bio: volume 3**. 1ª ed. SãoPaulo:Saraiva, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais no Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

LUPE, F. A. *Estudo da Composição Química de Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas da Amazônia*. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MAIA, J. G. S.; TAVEIRA, F. S. N.; ZOHBI, M. G. B.; SANTOS, A. S.; LUZ, A. I. R. Óleo essencial de casca-preciosa. *XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, p. 197, Florianópolis, 1996.

MAIA, J. G. S.; ZOHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. *Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2000.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; DIAS, M. I.; BERNARDO, F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, p. 149-153, 2001.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. *Florestae e Ambiente*, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MASMOUDI, H. LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *International Journal Pharmacognosy*, v. 289, n. 1 e 2, p. 117-131. 2005.

MATSUMOTO, S. T; MANTOVANI, M. S; MALAGUTTI, M. I. A; DIAS, A. L; FONSECA, I. C; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in on root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and ractionation. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry*, London: Academic Press, v. 6, 1991a. p.1-36.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. (Ed.) *Studies in Natural Product Chemistry*, v. 9, Amsterdam: Elsevier, 1991b. p. 383-409.

MELO, C. T.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L.; LIMA, V. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, F. M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, B. G. S.; SOUSA, F. C. Anxiolytic-like effects of (*o*-methyl)-*N*-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 451-454, 2006.

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.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N.; Studies on the pharmacological activity of Amazonian *Euphorbiaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, p. 143-162, 1988.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M.; *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*, v. 123, n. 3194, p. 464-468, 1956.

MILIAUSKAS, G.; VAN BEEK, T. A.; VENSKUTONIS, P. R.; LINSEN, J. P. H.; WAARD, P. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. *European Food Research and Technology*, v. 218, p. 253-261, 2004.

MORAES, 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, 1972.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. *Medicinal Plants of Brazil*. Michigan: Reference Publications, 2000. 501p.

MURRAY, P. R. *Microbiologia Médica*. 4.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 776p.

NASCIMENTO G. G. F.; LUCATELLI, J. F. P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 247-256, 2000.

NAVES, Y. R.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Sur l'huile essentielle d' *Ocotea teleiandra*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 44, p. 1121-1123, 1961.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxicas e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18 (suplem.), p.718-723, 2008.

OGER, J. M.; DUVAL, O.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J.; GUINAUDEAU, H. (R)-(+)-Noranicanine a new type of trioxxygenated benzylisoquinoline isolation and synthesis. *Heterocycles*, v. 34, n. 1, p. 17-20, 1992.

OGER, J. M.; FARDEAU, A.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; FOURNET, A. Novel isoquinoline alkaloids from Bolivian Laureaceae: *Aniba canelilla* (H. B. K.), *Canadian Journal of Chemistry*, v. 71, n. 8, p. 1128-11353, 1994a.

OGER, J. M.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; BOUCHARA, J. P.; FOURNET, A. *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez Essential Oil: Analysis of Chemical Constituents, Fungistatic Properties. *Journal Essential Oil Reseach*, v. 6, p. 493-497, 1994b.

OLIVEIRA, A. M. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) alimentado com dietas suplementadas por frutos e sementes de áreas alagáveis.** Dissertação de mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. 2005.

OLIVEIRA, C. P. F.; **Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818).** Dissertação de mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Manaus, 2003.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 77-82, 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 40, p. 71-76, 1998.

PENNA, C.; MARINO S-VIVOT. E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 37-40, 2001.

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.

PORTO, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, v. 97, p. 287-292, 2005.

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, S. I. R.; KNAKIEVICZ, T.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.. Toxicidade e geonotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, p. 171-176, 2006.

PRICE, K. S.; WAGGY, G. T.; CONWAY, R. A. J. Brine shrimp bioassay and seawater BOD of petrochemicals. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, v. 46, n. 1, p. 63-77, 1974.

PRITHIVIRAJ, B.; BAIS, H.; WEIR, T.; SURESH, B.; NAJARRO, E.; DAYAKAR, B.; SCHWEIZER, H.; VIVANCO, J. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 9, p. 5319-5328, 2005.

RAGGI, L. *Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano*. 2008. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

RIBEIRO, L. R. *Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

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

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

ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R.; Fundamentals of cosmetic product safety testing. *Cosmetics & Toiletries*, v. 111, p. 79-86. 1996.

ROSS, G. M.; MCMILLAN, T. J.; WILCOX, P.; COLLINS, A. R. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (comet assay): Technical Aspects and Applications. Report on the 5 th

LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research. *Mutation Research*, v. 337, p. 57-60, 1995.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. Comunicado técnico online, n. 127. Fortaleza: Embrapa, 2007.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L.; Annonaceous acetogenins. *Journal of Natural Products*, v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

SAHPAZ, S.; BORIS, C. H.; LOIEAU, P. M.; CORTES, D.; HACQUEMILLER, R.; LAURENS A.; CAVÉ, A.; Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* Seeds. *Planta Medica*, v. 60, n. 6, p. 538-540. 1994.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. *Teste de micronúcleo em células humanas in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra, p. 201-220, 2003.

SAMARASEKERA, R.; KALHARI, S. K. Insecticidal activity of essential oils of *Ceylon cinnamomum* and *Cymbopogon* species against *Musca domestica*. *Journal of Essential Oil Research*, v. 18, p. 352-354, 2006.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; SUMMERBELL, R. C.; FLANNIGAN, B.; MILLER, J. D. Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: FLANNIGAN, B.; SAMSON, R. A.; MILLER, J. D. (EdS.). *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. New York: Taylor & Francis, 2001. p. 287-292.

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.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 8, p. 121-137, 2002.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby e Grimes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 215-219, 2007.

SARTORI, M. R. K. *Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da Acmele brasiliensis Spreng (Wedelia paludosa) Astaraceae*. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHIMID, W. *The micronucleus test for cytogenetics analysis*. In: HOLLANENDER, A. Principles and methods for their detection. Plenum Press: New York, v. 4, p. 31-53, 1975.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. *Cosméticos à base de produtos naturais*. Relatório de estudo de mercado. Brasília: ESPM, 2008.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. 2.ed. Florida: CRC Press, 2003. 576p.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, J. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 277-283, 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, J. R. A.; CARMO, D. F. M.; LEON, L. L.; SILVA, B. O.; REIS, É. M. R.; FERREIRA, J. L. P.; MACHADO, G. M. C.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SILVA-JÚNIOR, C.; SASSON, S.; CALDINI-JÚNIOR, N. *Biologia*. 10.ed. v. 2. São Paulo: Saraiva, 2010. 576p.

SILVA, M. F. *Nomes vulgares de plantas amazônicas*. Manaus: INPA, 1977. 222p.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 28, n. 3, p. 727-732, 2008.

SORGELOOS, P.; REMICHE, W. C.; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests. A critical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 2, p. 249-255, 1978.

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*. Botucatu, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2007.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. Free Radical *Biology and Medicine*, v. 2, p. 321-336. 1995.

SUDAM - SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DA AMAZÔNIA. *O extrativismo do Pau-rosa (Aniba Duckei Kosterm. – Aniba rosaeodora Duckei)*. Aspectos sócio-econômicos, a silvicultura da espécie, v. 3, n. 1/4, p. 5-55, Belém, 1972.

TAVEIRA, F. S. N.; LIMA, W. M.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2003.

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

TULLIO, V.; NOSTRO, A.; MANDRAS, N.; DUGO, P. BANCHE, G.; CANNATELLI, M. A.; CUFFINI, A.M.; ALONZO, V. CARLONE, N. A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 6, p. 1544-1550. 2007.

VEINTEMILLA, C. A. C. *Impactos do fenantreno sobre o tambaqui Colossoma macropomum Cuvier, 1818: CL₅₀, crescimento e hematologia*. 2006. 58p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais), Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2006.

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Symposium on Plants as Animal Foods: a case of catch 22? *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 63, p. 621-629, 2004.

WERFF, H. W. D.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 8, p. 419-432, 1996.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research*, 410, p. 223-226. 1998.

WINTROBE, M.M. 1934 Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematologica*, v. 51, p. 32-49.

YOUNGSON, R. *Como combater os radicais livres*. O programa de saúde dos antioxidantes. Rio de Janeiro: Campus, 1995. 151p.

ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; MENDES, N. M.; OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-Trypanosoma cruzi activity. *Phytomedicine*, v. 2, p. 47-50, 1995.

ZAMONER, M. *Bioindicadores, relatores ambientais*. Divulgação científica. Disponível em: <http://www.protexto.com.br/texto.php?cod_texto=371>. Acessado em: 9 de novembro de 2011.